



УДК 577.155.3.02

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ

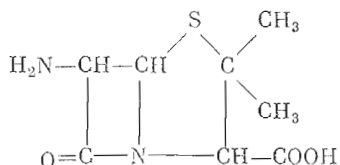
ПЕРЕНОС АЦИЛЬНОЙ ГРУППЫ НА 6-АМИНОПЕНИЦИЛЛАНОВУЮ
КИСЛОТУ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗОЙ
ИЗ *E. COLI*. КИНЕТИЧЕСКОЕ РАССМОТРЕНИЕ

Клессов А. А., Марголин А. Л., Шведас В.-Ю. К.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

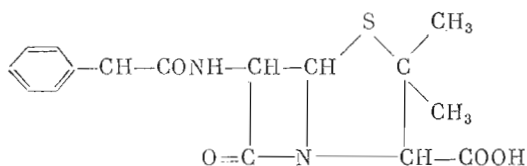
В качестве модельной системы реакций переацилирования, катализируемых пенициллинамидазой из *E. coli*, изучен ферментативный синтез бензилпенициллина из 6-аминопеницилламовой кислоты и производных фенилуксусной кислоты. Кинетика ферментативного сольволиза субстратов описывается трехстадийной схемой, по которой добавляемая 6-аминопеницилламовая кислота связывается как со свободной формой фермента, так и с фермент-субстратным комплексом и с ацилферментом. Количественное титрование фенилуксусной кислоты, образующейся в процессе конкурентного сольволиза ацилфермента (фенилацетил-пенициллинамидазы) водой и 6-аминопеницилламовой кислотой, позволило обнаружить зависимость выхода образующегося бензилпенициллина от структуры уходящей группы субстрата. Наименьший выход бензилпенициллина наблюдался при использовании *n*-карбоксы-*m*-нитроанилида фенилуксусной кислоты и наибольший — при ферментативном деацилировании *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты.

Актуальной проблемой современной биоорганической химии является разработка методов получения новых физиологически активных соединений, в частности синтеза антибиотиков пенициллинового ряда. Важное значение для поиска новых эффективных аналогов природных пенициллинов имело выделение и детальное изучение 6-аминопеницилламовой кислоты, так называемого ядра пенициллина:

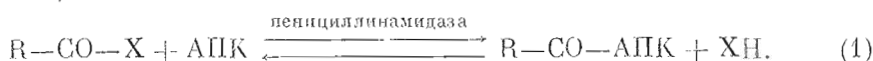


Химическое ацилирование первичной аминогруппы 6-аминопеницилламовой кислоты приводило к аналогам природных пенициллинов, большинство из которых не были получены биосинтетическим путем [1, 2]. Однако химические методы получения «полусинтетических» пенициллинов зачастую многостадийны и трудоемки. Более перспективным представляется ферментативный синтез производных пенициллинового ряда, т. е. проведение ацилирования первичной аминогруппы 6-аминопеницилламовой кислоты под действием пенициллинамидазы.

Пенициллинамидаза (пенициллинамидогидролиза, КФ 3.5.1.11) — фермент, наиболее известной каталитической реакцией которого является гидролиз бензилпенициллина (пенициллина G)



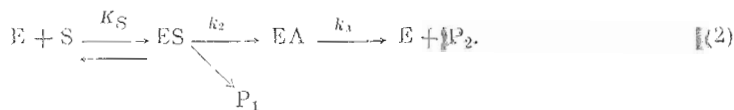
с образованием 6-аминопенициллановой и фенилуксусной кислот. Поскольку реакция гидролиза бензилпенициллина заметно обратима при определенных экспериментальных условиях [3], пенициллинамидаза может также катализировать синтез (конденсацию) бензилпенициллина из 6-аминопенициллановой и фенилуксусной кислот [3—5] или в общем случае синтез пенициллинов из 6-аминопенициллановой и соответствующей карбоновой кислот, так называемый прямой синтез. Альтернативным вариантом получения производных пенициллинового ряда является «синтез с переносом», или перенос ацильного заместителя производных карбоновых кислот (сложных эфиров, амидов, N-ацилированных аминокислот и т. п.) на первичную аминогруппу 6-аминопенициллановой кислоты (АПК):



Принципиальная возможность проведения подобных реакций, катализируемых пенициллинамидазой, была показана в работе [5, 6], хотя механизмы синтетических реакций под действием данного фермента до последнего времени в литературе не обсуждались.

Настоящая работа — вторая в серии исследований кинетико-термодинамических закономерностей синтеза антибиотиков, катализируемого пенициллинамидазой. Предыдущее сообщение [3] было посвящено изучению равновесия в реакции гидролиза-синтеза бензилпенициллина и влияния рН среды на константу равновесия реакции. В данной работе в качестве модельной реакции рассматривается перенос фенилацетильной группы на 6-аминопенициллановую кислоту и изучается влияние уходящей группы субстрата (X на схеме 1) на скорость реакции переацилирования.

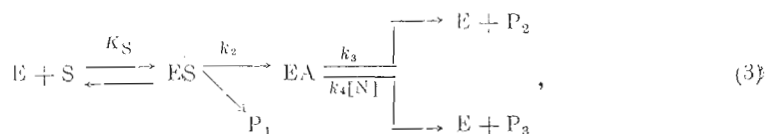
В настоящее время есть основания полагать, что пенициллинамидаза является сериновым ферментом и реакции, катализируемые пенициллинамидазой, протекают по трехстадийной схеме



Здесь ES — фермент-субстратный комплекс, EA — ацилферментное промежуточное соединение, P₁ и P₂ — основной и кислотный продукт гидролиза, K_S — истинная константа Михаэлиса, k₂ и k₃ — константы скоростей реакций ацилирования и деацилирования соответственно. Именно по этой схеме протекает реакция пенициллинамидазы с квазисубстратом — фенилметилсульфонилфторидом [7].

В реакциях гидролиза производных фенилуксусной кислоты, катализируемых пенициллинамидазой, ацилферментное промежуточное соединение должно быть фенилацетил-ферментом. В том случае, когда в реакционной системе находится эфektor, являющийся нуклеофильным агентом, способным конкурировать с водой на стадии деацилирования ацилфермента, схему трехстадийной ферментативной реакции можно записать

в следующем виде [8—11]:



где N — дополнительный нуклеофильный агент, P₃ — продукт переноса ацильной части субстрата на дополнительный нуклеофил. Если N — 6-аминопенициллановая кислота, то P₃ должен быть соответствующим пенициллином, ацилированным по первичной аминогруппе.

Важной характеристикой реакционной способности добавленного нуклеофильного агента по сравнению с водой в реакции конкурентного сольволиза ацилфермента является отношение констант k_4/k_3 (схема 3). Оно может быть найдено как титриметрическим методом, из анализа смеси продуктов, образующихся в ходе ферментативной реакции в присутствии добавленного нуклеофильного агента, так и кинетическим методом.

Титриметрический метод изучения сольволиза субстратов, катализируемого пенициллинамидазой. В качестве субстратов пенициллинамидазы использовали производные с различной уходящей группой: этиловый эфир, *n*-нитрофениловый эфир, *n*-нитроанилид и *n*-карбокси-*m*-нитроанилид фенилуксусной кислоты. Анализ констант ионизации функциональных групп данных субстратов, а также соответствующих продуктов сольволиза (P₁, P₂ и P₃, схема 3) показывает, что в условиях опыта (рН 6,0) только образующаяся фенилуксусная кислота будет титроваться щелочью [3]. Таким образом, в ходе конкурентного сольволиза ацилфермента (фенилацетил-пенициллинамидазы) в водном растворе в присутствии 6-аминопенициллановой кислоты (рК первичной аминогруппы равно 4,60 [3]) содержание фенилуксусной кислоты (продукт P₂) и бензилпенициллина (продукт P₃) можно определить с помощью титрования образующейся кислоты щелочью.

Методически данный эксперимент сводится к определению глубины реакции ферментативного гидролиза субстрата в присутствии различных концентраций 6-аминопенициллановой кислоты в качестве добавленного нуклеофильного агента. Принципы количественной обработки экспериментальных данных для подобных систем детально изложены в работе [11]. Здесь отметим только, что отношение констант нуклеофильностей k_4/k_3 (схема 3) можно определить по формуле

$$k_4/k_3 = \frac{1}{[N]} \cdot \frac{[P_3]}{[P_2]}.$$

Данная методика осложняется тем, что бензилпенициллин, образующийся в результате переноса фенилацетильной группы на 6-аминопенициллановую кислоту, сам является субстратом пенициллинамидазы. Очевидно, что в случае полного гидролиза бензилпенициллина ферментативный гидролиз исходного субстрата будет доходить до конца независимо от концентрации 6-аминопенициллановой кислоты в реакционной системе (приводя к кажущейся величине $k_4/k_3 = 0$). Для предотвращения ферментативного гидролиза образующегося бензилпенициллина (продукт P₃) в реакционную смесь предварительно добавляли фенилуксусную кислоту в такой концентрации (10^{-4} — 10^{-3} М), чтобы гидролиз бензилпенициллина был термодинамически невозможен вследствие смещения реакции в сторону синтеза [3]. В то же время продолжительность инкубации реакционной смеси была достаточно мала (30—50 мин) для осуществления ферментативной конденсации добавленных 6-аминопенициллановой и фенилуксусной кислот в сколько-нибудь заметной степени. В отдельном эксперименте было также показано, что добавление фенилуксусной кислоты не влияет

**Определение эффективной нуклеофильности
6-аминопенициллановой кислоты ($4 \cdot 10^{-6}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ М)
по отношению к воде (k_4/k_3 , схема 3) в реакциях
переацилирования производных фенилуксусной
кислоты, катализируемых пенициллинамидазой
($5 \cdot 10^{-8}$ М)**

Производные фенилуксусной кислоты ($5 \cdot 10^{-6}$ — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М)	k_4/k_3 (М ⁻¹)
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир	6900±500
Этиловый эфир	5600±300
<i>n</i> -Нитроанилид	7900±700
<i>n</i> -Карбокси- <i>m</i> -нитроанилид	1690±150

на глубину ферментативного гидролиза субстратов в отсутствие добавленного нуклеофильного агента.

При рассмотрении относительных констант нуклеофильностей (таблица) обращают на себя внимание две особенности: зависимость относительной нуклеофильности 6-аминопенициллановой кислоты от уходящей группы субстрата и необычайно высокие значения констант нуклеофильности (k_4/k_3) 6-аминопенициллановой кислоты в реакциях, катализируемых пенициллинамидазой.

Как следует из схем 2 и 3, реакция фермента с субстратами, имеющими одинаковую ацильную группу, должна приводить к образованию одного и того же ацилферментного промежуточного соединения. Следовательно, если ферментативная реакция в присутствии добавленного нуклеофила протекает по схеме 3, скорость ацильного переноса не должна зависеть от природы уходящей группы субстрата. Действительно, для первых трех субстратов в таблице различия в относительной нуклеофильности 6-аминопенициллановой кислоты в общем незначительны. Однако в реакции сольволиза *n*-карбокси-*m*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, имеющего отрицательно заряженный заместитель в уходящей группе, нуклеофильность 6-аминопенициллановой кислоты по отношению к ацилферменту (фенилацетил-пенициллинамидазе) в 3—4 раза понижена.

То, что реакционная способность добавленного нуклеофильного агента зависит от структуры уходящей группы, может служить указанием на более сложную схему процесса, чем схема 3. Например, в работе [12] было показано, что топография активного центра пенициллинамидазы зависит от структуры субстрата (в частности, от структуры его уходящей группы), по отношению к которому проводится кинетический анализ. Помимо этого данные работы [12] убедительно свидетельствуют о динамической природе активного центра пенициллинамидазы, конформация которого, по-видимому, достаточно долго сохраняется после распада фермент-субстратного комплекса и в значительной степени определяется структурой субстрата в реакционной системе. Если подобные конформационные изменения активного центра пенициллинамидазы затрагивают также участок связывания дополнительного нуклеофильного агента, то эффективная константа нуклеофильности, которая включает в себя, по-видимому, константу диссоциации комплекса ацилфермента с дополнительным нуклеофильным агентом [10, 11], тоже может зависеть от структуры субстрата, в частности от структуры уходящей группы. Из данных таблицы можно вывести практическую рекомендацию: при синтезе антибиотиков, производных пенициллинового ряда, методом ферментативного переацилирования в качестве доноров ацильной группы предпочтительнее использовать *n*-нитроанилиды соответствующих карбоновых кислот.

Представляет интерес сравнить величины относительной нуклеофильности 6-аминопенициллановой кислоты k_4/k_3 (таблица) с известными величинами k_4/k_3 для добавленных нуклеофильных агентов в реакциях,

катализируемых другими гидролазами. Реакции переацилирования, катализируемые α -химотрипсином, характеризуются значениями k_4/k_3 , максимально достигающими 50—150 M^{-1} (для кислородных нуклеофилов) [10, 11] и 150—300 M^{-1} (для азотистых нуклеофилов) [13], для трипсина 30—40 M^{-1} (для кислородных нуклеофилов) [14], для β -галактозидазы 50—150 M^{-1} (для кислородных нуклеофилов) [15], для эстеразы из печени быка 100—110 M^{-1} (для азотистых нуклеофилов) [16], для папаина 100—120 M^{-1} (кислородные нуклеофилы) и 5000—25 000 M^{-1} (азотистые нуклеофилы) [17, 18].

Как видно, нуклеофильность 6-аминопенициллановой кислоты в реакциях, катализируемых пенициллинамидазой, совпадает по порядку величины только с нуклеофильностью специфических азотистых оснований в реакциях, катализируемых тиоловым ферментом — папаином, и намного превосходит реакционную способность как кислородных, так и азотистых нуклеофилов по отношению к сериновым ферментам. Этот эффект можно объяснить повышенной поляризуемостью переходного состояния в реакциях, катализируемых пенициллинамидазой [17].

Кинетический метод изучения реакций сольволиза субстратов, катализируемых пенициллинамидазой, в присутствии 6-аминопенициллановой кислоты в качестве добавленного нуклеофильного агента. Кинетический анализ схемы 3 приводит к выводу, что скорость образования продукта P_1 (*n*-нитроанилина, *n*-нитрофенола или *n*-карбокси-*m*-нитроанилина в данном случае) в стационарном режиме протекания ферментативной реакции в присутствии дополнительного нуклеофильного агента определяется обычным уравнением Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]}{K_{m(\text{каж})} + [S]}, \quad (4)$$

где

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2(k_3 + k_4 [N])}{k_2 + k_3 + k_4 [N]}, \quad (5)$$

$$K_{m(\text{каж})} = K_S \frac{k_3 + k_4 [N]}{k_2 + k_3 + k_4 [N]}. \quad (6)$$

Так как для гидролиза большинства рассматриваемых субстратов (таблица) продукты P_1 являются хромофорами, для регистрации кинетики ферментативных реакций удобно использовать спектрофотометрические методы. Анализ выражений 5 и 6 показывает, что если скоростью лимитирующей стадией ферментативной реакции является ацилирование ($k_2 \ll \ll k_3$), то добавление нуклеофильного агента (в данном случае 6-аминопенициллановой кислоты) не должно влиять на общую, а также на максимальную скорость реакции. Если же скоростью лимитирующей стадией является деацилирование ($k_2 \gg k_3$), то максимальная скорость ферментативной реакции ($k_{\text{кат}} [E]_0$) будет возрастать с увеличением концентрации нуклеофила или линейно (при $k_2 \gg k_4 [N]$), или достигать кинетического насыщения (при $k_2 \ll k_4 [N]$).

На практике добавление 6-аминопенициллановой кислоты в реакционную систему вызывает во всех случаях уменьшение скорости образования продукта P_1 . В реакции гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты добавление 6-аминопенициллановой кислоты вызывает полное неконкурентное ингибирование (рис. 1), в реакции гидролиза *n*-нитрофенилового эфира фенилуксусной кислоты — слабое смешанное ингибирование (рис. 2) и, наконец, оказывает очень слабое влияние на кинетику гидролиза *n*-карбокси-*m*-нитроанилида фенилуксусной кислоты. Совокупность этих данных указывает на то, что схема 3 является слишком упрощенной для описания кинетики реакций, катализируемых пенициллинамидазой в присутствии добавленных нуклеофильных агентов. Более того, анализ воз-

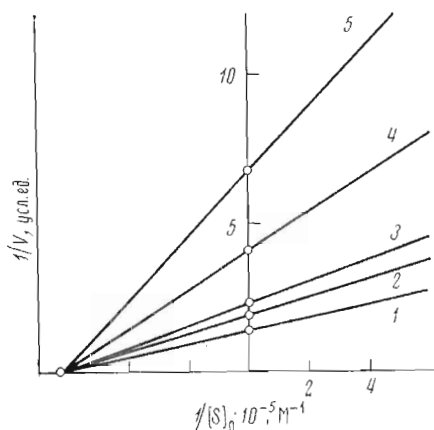


Рис. 1

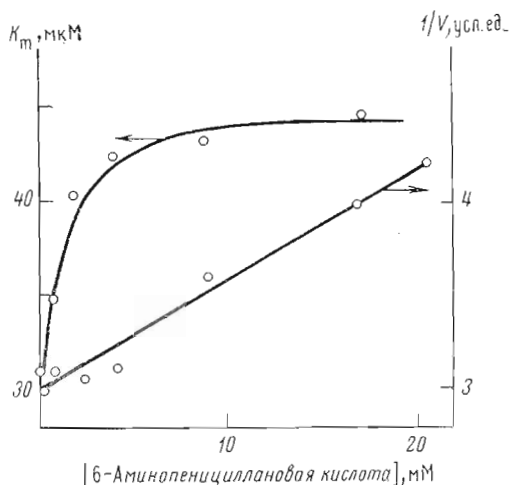


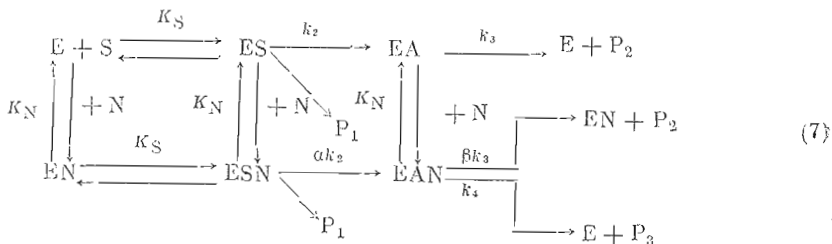
Рис. 2

Рис. 1. Влияние 6-аминопенициллановой кислоты на кинетику образования *n*-нитроанилина в реакции гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, катализируемой пенициллинамидазой. Концентрация 6-аминопенициллановой кислоты (10^{-3} М): 1 — 0; 2 — 2,4; 3 — 4,2; 4 — 8,4; 5 — 16,8

Рис. 2. Влияние 6-аминопенициллановой кислоты на величины K_m (1) и V (2) образования *n*-нитрофенола в реакции гидролиза *n*-нитрофенилового эфира фенилуксусной кислоты, катализируемого пенициллинамидазой

возможных механизмов ферментативного катализа, включающих двух- или многостадийные схемы, реакцию нуклеофильного агента не только с ацилферментом, но и с фермент-субстратным комплексом или участие нескольких форм фермента в реакции (см. [19]), свидетельствует о том, что ни в одном случае добавление нуклеофильного агента не должно приводить к уменьшению скорости образования обоих продуктов (P_1 и P_2) реакции. Это возможно лишь в том случае, если добавленный нуклеофил выступает также в качестве простого ингибитора ферментативной реакции, связываясь с активным центром.

В качестве простейшего механизма влияния 6-аминопенициллановой кислоты на кинетику реакций, катализируемых пенициллинамидазой, можно привести схему [19, 20], в которой добавленный нуклеофильный агент связывается в одинаковой степени со свободным ферментом, фермент-субстратным комплексом и ацилферментом:



Здесь K_S и K_N — константы диссоциации комплексов фермент — субстрат и фермент — нуклеофил соответственно; α и β — коэффициенты, характеризующие изменения констант скоростей ацилирования и деацилирования фермента, связанного с добавленным нуклеофильным агентом. Обработка данной схемы приводит к следующим выражениям для эффективных кинетических параметров ферментативной реакции, характеризующих

образование продукта P_1 :

$$k_{\text{кат}(\text{эфф})} = \frac{k_2 \left(1 + \frac{\alpha [N]}{K_N}\right) \left[k_3 + \frac{[N]}{K_N} (\beta k_3 + k_4)\right]}{\left(1 + \frac{[N]}{K_N}\right) \left[k_3 + k_2 \left(1 + \frac{\alpha [N]}{K_N}\right) + \frac{[N]}{K_N} (\beta k_3 + k_4)\right]}, \quad (8)$$

$$K_{m(\text{эфф})} = K_S \cdot \frac{k_3 + \frac{[N]}{K_N} (\beta k_3 + k_4)}{k_3 + k_2 \left(1 + \frac{\alpha [N]}{K_N}\right) + \frac{[N]}{K_N} (\beta k_3 + k_4)}. \quad (9)$$

Схема 7 и выражения 8 и 9 позволяют объяснить кинетические закономерности, полученные в настоящей работе. В частности, из схемы 7 следует отношение

$$\frac{[P_3]}{[P_2]} = \frac{k_4}{k_3 \left(\beta + \frac{K_N}{[N]}\right)}$$

и при $\beta = 0$

$$\frac{[P_3]}{[P_2]} = \frac{k_4}{K_N k_3} [N].$$

Таким образом, если схема 7 верна, то эффективные величины относительной нуклеофильности, приведенные в таблице и рассчитанные как тангенс угла наклона зависимости в координатах $\left(\frac{[P_3]}{[P_2]}; [N]\right)$, включают в себя также величины констант связывания добавленного нуклеофильного агента с ферментом:

$$(k_4/k_3)_{(\text{эфф})} = k_4/k_3 K_N.$$

Наряду с выдвинутой выше гипотезой о повышенной поляризуемости переходного состояния в ферментативной реакции это объясняет высокие значения нуклеофильностей β -аминопенициллановой кислоты в ферментативной реакции.

Если в реакции ферментативного гидролиза субстратов скоростью лимитирующей стадией является ацилирование ($k_2 \ll k_3$) и добавленный нуклеофильный агент блокирует стадию ацилирования в комплексе с ферментом ($\alpha \ll 1$, схема 7), то влияние нуклеофильного агента на скорость образования продукта P_1 будет формально соответствовать случаю неконкурентного ингибирования (независимо от величины β):

$$k_{\text{кат}(\text{эфф})} = \frac{k_2}{1 + [N]/K_N},$$

$$K_{m(\text{эфф})} = K_S.$$

Именно этот эффект наблюдается для влияния β -аминопенициллановой кислоты на скорость гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты (рис. 1).

Если добавленный нуклеофильный агент лишь незначительно влияет на стадию ацилирования, лимитирующую скорость ($\alpha \approx 1$, $k_2 \ll k_3$), скорость реакции практически не будет изменяться в его присутствии вплоть до высоких концентраций нуклеофильного агента. Подобный эффект наблюдается в реакции ферментативного гидролиза *n*-карбоксим-нитроанилида фенилуксусной кислоты. Наконец, смешанное ингибирование гидролиза *n*-нитрофенилового эфира фенилуксусной кислоты в присутствии β -аминопенициллановой кислоты можно объяснить тем, что для этой реакции значения констант скоростей ацилирования и деацилирования сравнимы по величине ($k_2 \approx k_3$).

Таким образом, схема реакции 7 позволяет интерпретировать экспериментальные данные по кинетике ферментативного переацилирования, катализируемого пенициллинамидазой. Знание кинетических закономерностей переноса ацильной группы, катализируемого пенициллинамидазой, необходимо для целенаправленного ферментативного синтеза различных производных пенициллинового и цефалоспоринового ряда, что является предметом дальнейшего исследования в нашей лаборатории.

Экспериментальная часть

Характеристики препарата пенициллинамидазы из *E. coli*, а также β -аминопенициллановой и фенилуксусной кислот описаны в работе [21]. *n*-Нитроанилид и *n*-нитрофениловый эфир фенилуксусной кислоты были синтезированы на кафедре химической энзимологии МГУ Т. Е. Васильевой по стандартным методикам. *n*-Карбокси-*m*-нитроанилид фенилуксусной кислоты синтезирован по методике [22].

Кинетику ферментативного гидролиза субстратов изучали титриметрически, с использованием pH-стата (Radiometer TTT-1с, Дания) при 25° (pH 6,0; 0,1 М КСl; $2 \cdot 10^{-3}$ М фосфатный буфер) или спектрофотометрически, на скоростном 16-канальном анализаторе GEMSAEC (Electro-Nucleonics, США) при 25° (pH 6,0; 0,1 М фосфатный буфер). Детали кинетического эксперимента описаны в предыдущей работе [12].

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН СССР, проф. И. В. Березину за полезное обсуждение работы, а также сотруднику кафедры химической энзимологии МГУ А. С. Белоусову за составление программ для обработки кинетических данных на компьютере РДР/8Е по методу наименьших квадратов. Авторы благодарят проф. Е. М. Савицкую и П. С. Ныс (ВНИИ антибиотиков) за любезное предоставление препарата пенициллинамидазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Manhas M. S., Bose A. K. (1969) Synthesis of penicillin, cephalosporin C and analogs, Marcel Dekker, Inc., N. Y.,
2. Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology (1972) Flynn E. H. (ed.), Acad. Press, N. Y.
3. Березин И. В., Клесов А. А., Марголин А. Л., Ныс П. С., Савицкая Е. М., Швядас В. К. (1976) Антибиотики, 21, 411—415.
4. Szentirmai A. (1965) Acta microbiol. Acad. scient. hung., 12, 395—405.
5. Cole M. (1969) Biochem. J., 115, 747—756.
6. Cole M. (1969) Biochem., J., 115, 757—764.
7. Швядас В. К. (1976) Канд. дис. «Кинетика и механизм действия пенициллинамидазы», МГУ.
8. Bender M. L., Clement G. E., Gunter C. R., Kezdy F. J. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 83, 3697—3703.
9. Berезin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) FEBS Lett., 15, 121—124.
10. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. (1971) Биохимия, 36, 108—117.
11. Клесов А. А., Андреев В. М., Березин И. В. (1974) Биохимия, 39, 1222—1230.
12. Клесов А. А., Галаев И. Ю., Швядас В. К. (1977) Биооргани. химия, 3, 663—672.
13. Inward P. W., Jencks W. P. (1965) J. Biol. Chem., 240, 1986—1996.
14. Seydoux F., Yon J., Nemethy G. (1969) Biochim. et biophys. acta, 171, 145—156.
15. Groen G. van der, Wouters-Leysen J., Yde M., De Bruyne C. K. (1973) Eur. J. Biochem., 38, 122—129.
16. Goldberg M. I., Fruton J. S. (1970) Biochemistry, 9, 3371—3378.
17. Brubacher L. J., Bender M. L. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 5871—5880.
18. Fink A. L., Gwyn C. (1974) Biochemistry, 13, 1190—1195.
19. Hinberg I., Laidler K. J. (1972) Can. J. Biochem., 50, 1334—1359.
20. Fink A. L., Bender M. L. (1967) Biochemistry, 8, 5109—5115.
21. Березин И. В., Клесов А. А., Швядас В. К., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1974) Антибиотики, 19, 880—887.
22. Kutzbach C., Rauenbuch H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 354, 45—53.

Поступила в редакцию
20.X.1976

ENZYMATIC SYNTHESIS OF ANTIBIOTICS. THE KINETICS
OF ACYL GROUP TRANSFER ONTO 6-AMINOPENICILLANIC ACID
CATALYSED BY PENICILLIN AMIDASE FROM *E. COLI*

KLYOSOV A. A., MARGOLIN A. L., SHVYADAS V. K.

*Chemistry Department, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

The synthesis of benzylpenicillin by means of an enzymatic transfer of phenylacetic acid (PAA) residue from a series of penicillin amidase substrates onto 6-aminopenicillanic acid (6-APA) has been studied. The kinetics of enzymatic solvolysis of substrates follow a three-step mechanism, whereby 6-APA binds both with the free enzyme and with the enzyme-substrate complex, as well as with the acyl enzyme intermediate. The quantitative titration of PAA, which arises as a result of competitive solvolysis of acyl enzyme (phenylacetyl-penicillin amidase) by water and 6-APA, has allowed to reveal a dependence for the yield of benzylpenicillin formation on the structure of a substrate leaving group. The minimal yield of benzylpenicillin was obtained with phenylacetic acid *p*-carboxyl-*m*-nitroanilide, whereas maximal output was gained with phenylacetic acid *p*-nitroanilide as a substrate.
