



УДК 577.152.351*11'135.547.466

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ
ИЗ *E. COLI* В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ
N-АЦИЛИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ И ДИПЕПТИДОВ

Швадас В. К., Галаев И. Ю., Семилетов Ю. А.,
Коршунова Г. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. П. Белозерского
и химический факультет

Пенициллинацилаза* (пенициллинамидогидролаза, КФ 3.5.1.11) из *E. coli* способна энантиоселективно гидролизовать фенилацетильные производные ряда L-аминокислот с примерно одинаковой эффективностью [1, 2]. В виде иммобилизованных препаратов этот фермент может быть использован для разделения рацематов аминокислот, например фенилглицина [3]. Однако до сих пор в литературе нет данных о взаимодействии пенициллинацилазы с N-ацилированными дипептидами. Представляет несомненный интерес выяснить возможности использования пенициллинацилазы для снятия защиты аминогруппы при синтезе пептидов, например удаления фенилацетильного остатка с дипептидов в мягких условиях.

N-Фенилацетильные производные дипептидов были получены ацилированием соответствующих дипептидов фенилацетилхлоридом по методике, описанной для получения N-фенилацетильных производных аминокислот [4]. Амид N-фенилацетилглицина был впервые получен аммонолизом метилового эфира N-фенилацетилглицина по стандартной методике получения амидов аминокислот [5]. Эфир был получен этерификацией N-фенилацетилглицина в метаноле в присутствии хлористого тионила в качестве катализатора. В работе использовали фенилацетилхлорид (Merck, ФРГ), глицин и дипептиды (Reanal, Венгрия) и высокоочищенный препарат пенициллинацилазы. За ферментативным расщеплением N-ациламидной связи следили по методу, предложенному для определения аминопенициллазной активности [6]. Коэффициенты экстинкции для продуктов взаимодействия о-фталевого альдегида с образующимися в ходе реакции пептидами определяли в отдельном эксперименте, используя свободные пептиды.

В отдельном эксперименте с помощью хроматографии в тонком слое на силикофоле в системах изопропанол — 25%-ный аммиак — вода (14 : 1 : 5) и n-бутанол — вода — уксусная кислота (4 : 1 : 1) при использовании в качестве свидетелей соответствующих свободных дипептидов и аминокислот было показано, что пенициллинацилаза катализирует расщепление только фенилацетамидной связи. Кинетические параметры ферментативных реакций определяли при анализе начальных скоростей. Результаты кинетических экспериментов обрабатывали по методу наименьших квадратов на компьютере РДР 8/Е.

* Наиболее употребительным названием фермента в литературе установилось название «пенициллинацилаза». По характеру гидролизуемой связи пенициллинацилаза аналогична ацилазам (N-ациламиноамидогидролазам) и отличается от них лишь тем, что способна отщеплять N-ацильную часть пенициллинов.

**Субстратная специфичность пенициллинацилазы в ряду производных
N-ацилированных аминокислот и дипептидов общей формулы
C₆H₅CH₂CO-X (25° С, рН 7,5)**

X	$K_m \cdot 10^5, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$(k_{кат}/K_m) \cdot 10^{-5}, M^{-1}c^{-1}$
Gly	17,0±0,6	47±2	2,76±0,03
Gly-NH ₂ *			1,8±0,1
Gly-OCH ₃			1,1±0,1
Gly-Gly	27±5	40±10	1,4±0,1
Ala-Ala	11±1	12±1	1,09±0,02
Abu-Gly	9,2±0,9	11,7±0,6	1,27±0,05
Val-Gly**		8·10 ⁻²	
Leu-Gly**		10 ⁻³	
Gly-D, L-Nle	24±4	24±2	1,0±0,1
Gly-D, L-Met	8±1	13±1	1,63±0,05

* Раздельно определить $k_{кат}$ и K_m не удалось из-за низкой растворимости субстрата.

** Приведена оценка верхней границы величины $k_{кат}$.

В таблице приведены значения кинетических параметров реакций ферментативного гидролиза фенилацетильных производных дипептидов и их простейших аналогов — фенилацетилглицинамида и метилового эфира фенилацетилглицина. На основании представленных результатов можно сделать следующие выводы:

1) модификация карбоксильной группы субстрата при ее превращении в амид или сложный эфир приводит к уменьшению каталитической эффективности действия ($k_{кат}/K_m$) пенициллинацилазы в 2—5 раз;

2) природа N-концевой аминокислоты дипептида существенным образом влияет на эффективность ферментативного гидролиза. Пенициллинацилаза примерно с одинаковой эффективностью гидролизует фенилацетилированные пептиды с N-концевыми глицином, L-аланином и L-α-аминомасляной кислотой, однако дальнейшее увеличение радикала N-концевой аминокислоты дипептида приводит к резкому падению скорости гидролиза;

3) природа C-концевой аминокислоты слабо влияет на эффективность гидролиза, катализируемого пенициллинацилазой.

Таким образом, показана возможность использования пенициллинацилазы для снятия фенилацетильной группы ряда N-ацилированных пептидов. Обнаружено, что участок связывания бокового радикала N-концевой аминокислоты фенилацетилированного дипептида в активном центре пенициллинацилазы способен вмещать лишь этильную группу. В то же время не установлено, влияет ли связывание бокового радикала C-концевой аминокислоты дипептида на активном центре пенициллинацилазы на протекание ферментативной реакции. Остаются открытыми вопросы, способен ли этот фермент катализировать гидролиз N-ациламидной связи в более длинных пептидах и какова стереоспецифичность его действия в этих реакциях. Высокая энантиоселективность пенициллинацилазы в реакциях гидролиза фенилацетильных производных аминокислот [1—3] позволяет рассчитывать на возможность энантиоселективного снятия фенилацетильной группы при синтезе соответствующих пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галаев И. Ю., Клесов А. А., Швабас В. К. Тез. докл. II Всес. симпоз. «Получение и применение иммобилизованных ферментов». г. Лбовая, 1977, с. 33.
2. Lucinto G., Romeo A., Rossi D. *Experientia*, 1965, v. 21, p. 317—318.
3. Ямсков И. А., Будаев М. В., Лобарева Л. С., Даванков В. А. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 1, с. 86—91.
4. Birnbaum S. M., Levintow L., Kingsley R. B., Greenstein J. P. *J. Biol. Chem.*, 1952, v. 194, № 2, p. 455—470.

5. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965, с. 624.
6. Галаев И. Ю., Швядас В. К., Арен А. К., Березин И. В. Прикл. биохим. и микробиол., 1980, т. 16, № 2, с. 281-283.

Поступила в редакцию
14.III.1983

SUBSTRATE SPECIFICITY OF PENICILLIN ACYLASE FROM *E. COLI* TOWARDS N-ACYLATED AMINO ACID DERIVATIVES AND DIPEPTIDES

SHVYADAS V. K., GALAEV I. Yu., SEMILETOV Yu. A., KORSHUNOVA G. A.

Chemical Department and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The substrate specificity of penicillin acylase (EC 3.5.1.11) from *E. coli* towards N-acylated amino acid derivatives and dipeptides was studied. Carboxylic group modification in N-phenylacetyl amino acids decreases the enzyme catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) 2-5 fold. The locus of the binding site in the enzyme active center responsible for the binding of the N-terminal amino acid side chain of dipeptide can accommodate only ethyl group. It was not established whether binding of the side chain of the C-terminal amino acid affects the course of the enzymatic reaction.