

Abstrakt

Penicilin-G-acylasy (PGA) se řadí mezi enantioselektivní enzymy katalyzující hydrolýzu stabilní amidické vazby v rámci širokého spektra substrátů majících často velký aplikační potenciál. PGA z mikroorganismů *Escherichia coli* (PGA^{Ec}) a *Achromobacter* sp. CCM4824 (PGA^A) byly použity pro katalýzu enantioselektivních hydrolýz sedmi vybraných N-fenylacetylovaných (N-PhAc) racemických směsí α/β -aminokyselin. Prokázali jsme, že PGA^A vykazovala vyšší stereoselektivitu pro trojici (S)-enantiomerů: N-PhAc- β -homoleucin, N-PhAc- α -terc-leucin a N-PhAc- β -leucin. Dále byl zkonstruován homologní model PGA^A, který byl použit pro molekulární modelování interakcí se stejnými substráty. *In-silico* experimenty zreprodukovaly experimentálně získaná data z enzymaticky katalyzovaných enantioselektivních hydrolýz, což potvrdilo věrohodnost připraveného homologního modelu. Stejný přístup jsme použili pro ověření enantiopreference PGA^A vůči sedmi novým substrátům s aplikačním potenciálem, přičemž pro pětici z nich byla predikována vysoká enantioselektivita PGA^A.

PGA^A byla dále použita v kineticky řízených syntézách β -laktamových antibiotik (SSBA). Enzym byl prokazatelně účinnější při syntéze ampicilinu a amoxicilinu (vyšší S/H poměr a akumulace produktu) oproti PGA^{Ec}. Analogicky k predikci enantioselektivity PGA^A vůči novým substrátům bylo molekulární modelování aplikováno na syntézy SSBA katalyzované PGA^A. Abychom zlepšili parametry syntéz SSBA, provedli jsme *in-silico* cílenou aminokyselinovou záměnu v pozicích Phe24 β a Phe146 α homologního modelu PGA^A. Jako perspektivní modifikace se jevila záměna Phe24 β →Cys, neboť vzdálenost mezi aminoskupinou nukleofilu (N) a karbonylovou skupinou acyl-donoru (AD) se zkrátila z 4,1 na 3,3 Å při syntéze amoxicilinu. Následně byl připraven expresní systém nesoucí mutovaný *pga*^A gen kódující tuto aminokyselinovou záměnu. Purifikovaná rekombinantní PGA^APhe β 24Cys vykazovala v případě syntézy amoxicilinu i ampicilinu podobné hodnoty u všech parametrů jako PGA^A.

Rekombinantní PGA^APhe β 24Cys byla dále použita pro syntézu amoxicilinu za molárního poměru AD/N 1,05 používaného v průmyslu a koncentrace nukleofilu: 1) nad 400 mM a 2) 160 mM.

Účinnost PGA^APhe β 24Cys při syntéze amoxicilinu za koncentrací nukleofilu nad 400 mM a molárního poměru AD/N 1,05 byla studována také ve své stabilizované formě, a sice v podobě CLEA. Hodnota S/H stabilizované formy vzrostla oproti rozpustné formě přibližně o 8 % (z hodnoty 4,9 na 5,0), avšak stupeň konverze se zvýšil výrazně, a to z 22 na 61 %.