

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО АЦИЛИРОВАНИЯ 7-АМИНОЦЕФАЛОСПОРАНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ С3 ПРОИЗВОДНЫХ

© 2022 г. А. В. Скляренко¹, И. А. Groshkova¹, *, Н. А. Горбунов¹, С. В. Яроцкий¹

¹ФГБУ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”
(НИЦ – “Курчатовский институт”), Москва, 123182 Россия

*e-mail: ingagrosh@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2022 г.

После доработки 18.06.2022 г.

Принята к публикации 20.06.2022 г.

Сопоставлены по эффективности оптимизированные процессы ацилирования 7-аминоцефалоспороановой кислоты (7-АСА) и ее С3 производных 7-амино-3-[2-метил-1,3,4-тиадиазол-5-ил]-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты (ТДА) и 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспороановой кислоты (7-ТМСА) метиловыми эфирами 1(Н)-теразолилуксусной и D-манделовой кислот (METzAA и МЕМА), катализируемого иммобилизованной синтетазой цефалоспоринов-кислот (IECASA). Эти процессы являются биокаталитическими стадиями двух различных химико-биокаталитических путей синтеза цефазолина (CEZ) и цефамандола (CFM). Биокаталитическое ацилирование 7-АСА с образованием полупродуктов синтеза антибиотиков протекают более эффективно, чем ацилирование соответствующих С3 производных 7-АСА с образованием CEZ и CFM, как по достигаемому выходу продукта, так и по возможности получения его высокой концентрации в реакционной смеси. При этом синтетазная способность IECASA наиболее высока в процессе ацилирования 7-АСА с помощью METzAA. Показано, что химико-биокаталитический синтез CEZ и CFM путем прямого биокаталитического ацилирования 7-АСА с последующей химической модификацией полупродуктов по С3 положению β-лактаманного ядра является перспективной заменой традиционного пути, использующего биокаталитическое ацилирование производных 7-АСА с замещенной 3-ацетокси группой.

Ключевые слова: биокаталитический синтез, кинетически-контролируемый синтез, синтез с ацильным переносом, синтаза цефалоспоринов-кислот, цефазолин, цефалоспорины, цефамандол

DOI: 10.56304/S0234275822040147

Насущной задачей биотехнологии является разработка и внедрение биокаталитических технологий получения цефалоспоринов взамен экологически опасных и энергозатратных методов традиционного химического синтеза [1, 2]. Ключевым β-лактаманым полупродуктом для производства большинства полусинтетических цефало-

спориновых антибиотиков является 7-аминоцефалоспороановая кислота (7-АСА), производимая в промышленных масштабах по современным биокаталитическим технологиям [3, 4]. Введение различных заместителей в С3 и С7 положение β-лактаманного ядра 7-АСА позволяет получать полусинтетические цефалоспорины, варьируя их активность, спектр действия и устойчивость к действию β-лактамаз [4]. Несмотря на значительные успехи генетической инженерии в области целенаправленного изменения специфичности ферментов, в настоящее время невозможен полный отказ от традиционных химических трансформаций при модификации 7-АСА в пользу процессов, катализируемых ферментами (биокаталитических процессов) [5].

На рис. 1 представлена схема двух возможных химико-биокаталитических путей получения полусинтетического цефалоспориана, различающихся последовательностью осуществления химической модификации 7-АСА по С3-положению β-лакта-

Список сокращений: 7-АСА – 7-аминоцефалоспороановая кислота; ТДА – 7-амино-3-[2-метил-(1,3,4-тиадиазол-5-ил)-тиометил]-3-цефем-4-карбоновая кислота; 7-ТМСА – 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспороановая кислота; CASA – синтаза цефалоспоринов-кислот (Cephalosporin-acid synthetase); CEZ – цефазолин; CFM – цефамандол; IECASA – иммобилизованная синтаза цефалоспоринов-кислот; METzAA – метиловый эфир 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты; МЕМА – метиловый эфир D-манделовой кислоты; TzAA – 1(Н)-тетразолилуксусная кислота; МА – манделовая кислота; АА – ацилирующий агент; БК – биокатализатор; КА – ключевая аминокислота; КК – карбоновая кислота; ПА – пенициллинацилаза; ФБ – фосфатный буфер; ЭГ – этиленгликоль.

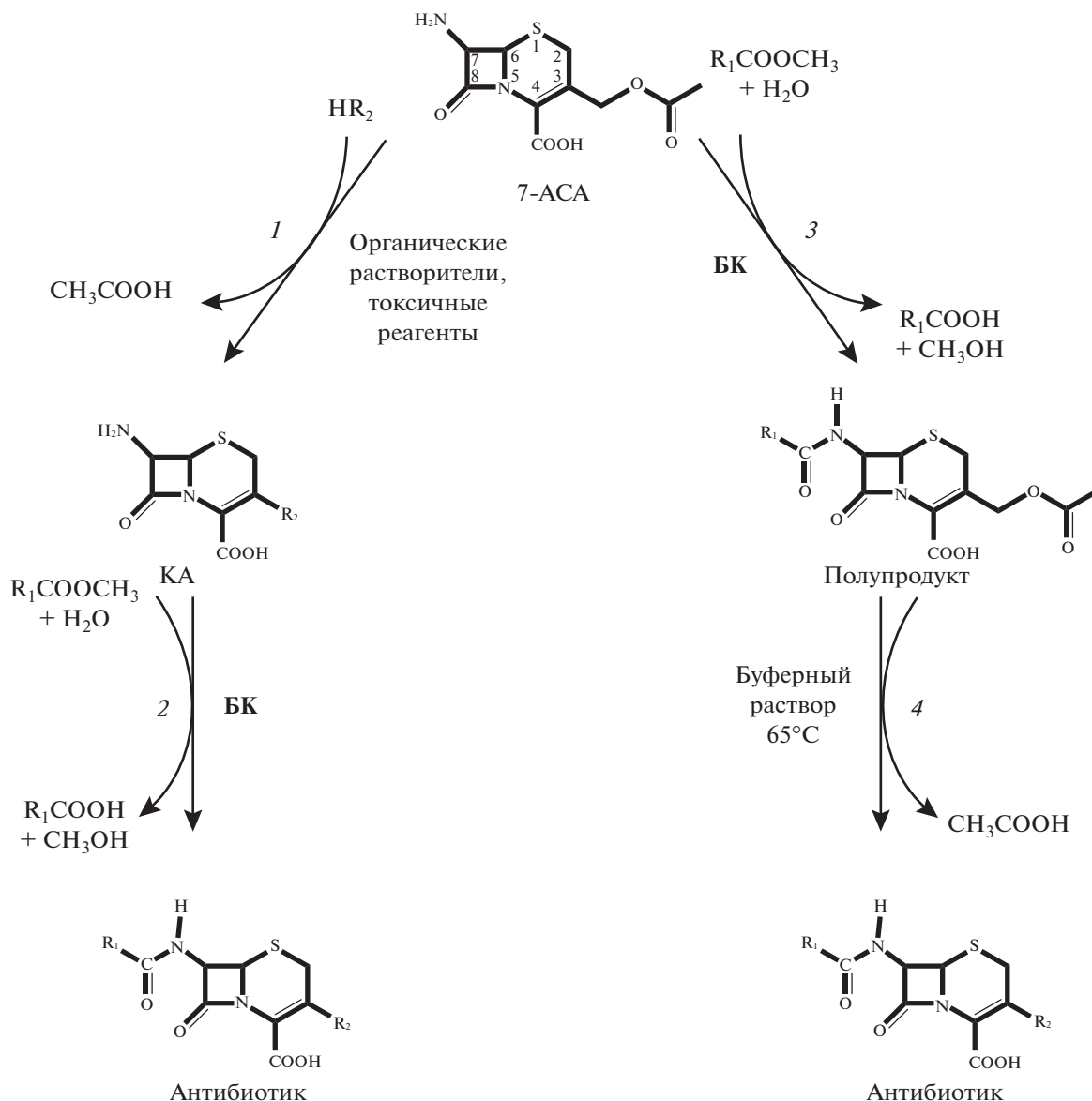


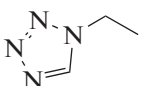
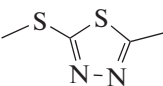
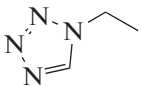
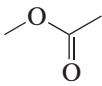
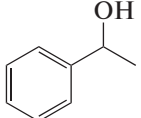
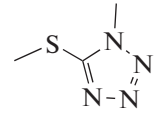
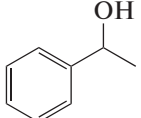
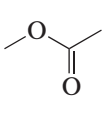
Рис. 1. Химико-биокаталитические пути синтеза цефалоспориновых антибиотиков из 7-АСА [13, 14] 1 – химический синтез КА из 7-АСА, 2 – биокаталитический синтез цефалоспоринового антибиотика из КА, 3 – биокаталитический синтез полупродукта из 7-АСА, 4 – химический синтез антибиотика из полупродукта. R_1 и R_2 для CEZ и CFM см. табл. 1.
Fig. 1. Chemical-biocatalytic pathways for synthesis of cephalosporin antibiotics from 7-ACA [13, 14] 1 – chemical synthesis of KA from 7-ACA, 2 – biocatalytic synthesis of cephalosporin antibiotic from KA, 3 – biocatalytic synthesis of semi-product from 7-ACA, 4 – chemical synthesis of antibiotic from semi-product. R_1 and R_2 for CEZ and CFM see Table 1.

ного ядра (трансформации 1 и 4) и биокаталитического ацилирования свободной аминогруппы 7-АСА подходящим ацилирующим агентом (АА) для введения заместителя в С7 положение (трансформации 2 и 3). Традиционный химико-биокаталитический подход к синтезу цефалоспоринов основан на использовании пути, включающего трансформации 1 и 2.

Целью настоящей работы является сопоставление эффективности трансформаций 2 и 3, осуществляемых методом кинетически-контролиру-

емого синтеза [6–8], при получении двух цефалоспориновых антибиотиков – цефазолина (CEZ) и цефамандола (CFM) (см. табл. 1), а также оценка перспективности каждого из химико-биокаталитических путей (рис. 1) для разработки технологий получения этих антибиотиков с использованием в качестве биокатализатора (БК) иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот (CASA, КФ 3.5.1.11) [6, 7, 9], продуцируемой рекомбинантным штаммом *Escherichia coli* (*E. coli*) ВКПМ В-12316.

Таблица 1. Сопоставляемые биокаталитические трансформации 2 и 3 (согласно схеме на рис. 1)**Table 1.** Comparing biocatalytic transformations 2 and 3 (see scheme, picture 1)

Продукт	R ₁	R ₂	Ключевая аминокислота (КА)	Ацилирующий агент (АА)
Цефазолин			7-амино-3-[2-метил-(1,3,4-тиадиазол-5-ил)-тиометил]-3-цефем-4-карбоновая кислота (ТДА)	Метилловый эфир 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты
Полупродукт S-р CEZ			7-АСА	МЕТzАА
Цефамандол			1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспоровая кислота	Метилловый эфир D-манделовой кислоты
Полупродукт S-р CFM			7-АСА	МЕМА

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

В работе использованы коммерческие образцы: 7-АСА (97%)¹, Anhui BBCA Pharmaceutical, Китай, ТДА (98%), Pinguan Sihuan Pharmaceutical Co., Ltd., (Китай), 7-ТМСА (96.5%), Shandong Sihuan Pharmaceutical Co., Ltd., (Китай), натриевые соли CEZ (98.0%) и CFM (99.0%), Sigma-Aldrich, (США), МЕТzАА (98.0%) и МЕМА (99.0%), Sigma-Aldrich, D-манделовая кислота (МА) (99.0%) и 1(Н)-тетразолилуксусная кислота (ТzАА) (99.9%), Sigma-Aldrich. Лабораторные образцы стандартов полупродуктов синтеза цефазолина (S-р CEZ) (94.8%) и цефамандола (S-р CFM) (97.0%) любезно предоставлены Сычуаньским индустриальным институтом антибиотиков (Китай).

Биокатализатор для процессов синтеза цефалоспоринов получали путем иммобилизации CASA из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12316 на эпокси-активированном макропористом акрилатном носителе SepLite LX-1000EP (Sunresin New Materials, Китай), согласно описанному ранее методу [10]. Стандартную синтетазную активность образцов иммобилизованного фермента (IECASA) определяли по начальной скорости реакции синтеза CEZ [10] из ТДА и МЕТzАА. Для экспериментов по синтезу цефалоспоринов использовали образцы IECASA со стандартной синтетазной активностью от 300 до 420 МЕ/г влажного биокатализатора при содержании в нем сухих веществ 32–37%.

¹ В скобках приведена чистота используемых препаратов, определенная методом ВЭЖХ.

За единицу синтетазной активности (1 МЕ) принимали количество биокатализатора, которое обеспечивает образование 1 мкмоль CEZ в минуту при его синтезе в растворе, содержащем 60 мМ ТДА и 240 мМ МЕТzАА при pH 7.5 и 30°C.

Проведение процессов биокаталитического синтеза цефалоспоринов

Биокаталитические трансформации осуществляли методом кинетически-контролируемого синтеза, называемого также синтезом с ацильным переносом. При этом свободную С7 аминогруппу КА, содержащую радикал R₂ в положении С3 β-лактама, ацилируют АА, в качестве которого чаще всего выступает эфир карбоновой кислоты (КК), несущий радикал R₁ [7, 8]. Помимо целевого ферментативного процесса синтеза β-лактамного продукта в системе протекают две побочные гидролитические ферментативные реакции: гидролиз ацила-мидной связи β-лактамного продукта и гидролиз эфирной связи АА с образованием соответствующей КК. В результате баланса скоростей этих трех процессов в системе устанавливается кинетически-контролируемое равновесие, определяющее максимальный достигаемый выход целевого цефалоспориона [11, 12].

Для проведения биокаталитических процессов использовали стеклянный реактор вместимостью 75 мл, оборудованный механической мешалкой и снабженный системами поддержания температуры и pH. Динамику биокаталитического синтеза в пробках, отбираемых из реакционных смесей, изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа фирмы Gilson (США) и хроматографической колонки Spherisorb ODS, 250 × 4 мм с

диаметром частиц 7.5 мкм. Содержание целевого цефалоспоринового продукта, КА, АА и КК определяли при проведении анализа в изократическом режиме с мобильной фазой, состоящей из 0.05 М фосфатно-аммонийного буфера, рН 4.0, содержащего метанол.

Все процессы синтеза β-лактамов проводили при 30°C в 0.3 М фосфатно-натриевом буфере (ФБ) с добавлением или без добавления этиленгликоля (ЭГ). Методики биокаталитического синтеза цефалоспоринов, катализируемого IECASA, и контроля каждого из процессов описаны ранее: синтез CEZ из TDA и METzAA [10], синтез S-р CEZ из 7-АСА и METzAA [13], синтез CFM и S-р CFM из 7-ТМСА и 7-АСА с использованием в качестве ацилирующего агента МЕМА [14].

Степень трансформации КА в целевой продукт (η^τ , %), рассчитывали на основании анализа кри-вых накопления цефалоспоринов по формуле:

$$\eta^\tau = \frac{C_{\text{прод}}^\tau}{C_{\text{КА}}^0} \times 100, \quad (1)$$

где:

$C_{\text{прод}}^\tau$ — текущая концентрация продукта, мМ;

$C_{\text{КА}}^0$ — начальная концентрация КА, мМ.

Максимальный достигаемый выход цефалоспори-на от КА ($\eta^{\text{макс}}$, %), а также удельную начальную скорость его накопления ($V_{\text{уд}}^0$, мМ/мин МЕ) определяли для экспериментов, проведенных при $C_{\text{КА}}^0 = 150$ мМ [15]. Величину $V_{\text{уд}}^0$ рассчитывали по начальному линейному участку кривой накопления β-лактаминового продукта как отношение начальной скорости его образования к концентрации фермента в реакционной смеси (C_E , МЕ/мл). Величину $\eta^{\text{макс}}$ рассчитывали как среднее значение η^τ на плато, где степень трансформации КА в целевой продукт достигает максимального значения. Максимальную достигаемую концентрацию целевого продукта в конечной реакционной смеси ($C^{\text{макс}}$, мМ) рассчитывали из соотношения:

$$C^{\text{макс}} = \frac{C_{\text{КА}}^0 \eta^{\text{макс}}}{100}. \quad (2)$$

Изучение операционной стабильности IECASA

Динамику инактивации IECASA изучали при проведении серии последовательных циклов биокаталитического синтеза S-р CEZ с использованием одного и того же образца БК.

Циклы синтеза S-р CEZ путем биокаталитического ацилирования ключевой аминокислоты

7-АСА ацилирующим агентом METzAA осуществляли в стеклянном термостатируемом реакторе вместимостью 50 мл, оборудованном фильтрующим дном, механической мешалкой и системой вакуумной фильтрации, а также системами контроля и поддержания рН и температуры. Для испытаний использовали образец IECASA с исходной активностью $A_{\text{БК}}^0 = 960$ МЕ/г сух. и содержащий в нем сухих веществ 30%. В реактор помещали 1.1 г влажного БК, что в первом цикле синтеза обеспечивало концентрацию активного фермента в реакционной смеси $C_E = 9$ МЕ/мл, при которой максимальный выход S-р CEZ от КА ($\eta^{\text{макс}}$, %) достигался за 35 мин.

Синтез S-р CEZ проводили в следующих условиях: 30°C, 0.3М ФБ, объем реакционной смеси $V_{\text{р.см}} = 35$ мл, исходная концентрация 7-АСА $C_{\text{КА}}^0 = 180$ мМ, исходная концентрация METzAA $C_{\text{АА}}^0 = 540$ мМ, то есть при трехкратном мольном избытке АА над КА ($X^0 = 3.0$ М/М).

Раствор КА готовили перед проведением каждого цикла синтеза. Для этого при 30°C аликвоту 7-АСА (6.3 ммоль) растворяли в 27 мл 0.3 М ФБ рН 8.3 при постепенном добавлении 2 М раствора гидроксида натрия до рН 7.0. В реактор, содержащий БК, вносили аликвоту METzAA (18.9 ммоль) и добавляли раствор КА, начиная тем самым процесс синтеза. Синтез S-р CEZ проводили при постоянном умеренном перемешивании реакционной смеси при 30°C в спонтанно устанавливаемомся градиенте рН от исходного значения рН 7.0 до рН 6.0 с последующим поддержанием рН 6.0 добавлением 2 М раствора гидроксида натрия. Продолжительность реакции постепенно увеличивали с 35 до 45 мин, с тем, чтобы выход S-р CEZ не снижался из-за постепенной инактивации IECASA. Синтез S-р CEZ останавливали, удаляя конечную реакционную смесь из реактора под вакуумом, промывали БК 3.5 мл 0.3 М ФБ, рН 7.0 и объединяли фильтрат и промывные воды. В реакторе проводили следующий цикл синтеза S-р CEZ с тем же образцом БК.

В объединенном фильтрате методом ВЭЖХ в изократическом режиме определяли концентрацию S-р CEZ и рассчитывали выход продукта синтеза относительно 7-АСА. Для анализа использовали ту же хроматографическую систему, что и для анализа проб при изучении динамики биокаталитического синтеза цефалоспоринов [13]. Время удерживания S-р CEZ — 7–8 мин.

Через каждые 4–8 циклов из реактора отбирали пробу промытого БК для определения его остаточной активности: $A_{\text{БК}}^N$, МЕ/г сух. Рассчитывали относительную остаточную активность после проведения N циклов синтеза ($A_{\text{отн}}^N$, %):

$$A_{\text{отн}}^N = \frac{A_{\text{БК}}^N}{A_{\text{БК}}^0} \times 100. \quad (3)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биокаталитические трансформации с использованием IECASA осуществляли методом кинетически-контролируемого синтеза, называемого также синтезом с ацильным переносом. При этом свободную С7 аминогруппу КА, содержащую радикал R₂ в положении С3 β-лактама, ацилируют АА, в качестве которого выступает эфир карбоновой кислоты (КК), несущий радикал R₁ [7, 8]. Помимо целевого ферментативного синтеза β-лактамого продукта в системе протекают две побочные гидролитические ферментативные реакции: гидролиз ациламидной связи β-лактамого продукта и гидролиз эфирной связи АА с образованием соответствующей КК. В результате баланса скоростей этих трех процессов в системе устанавливается кинетически-контролируемое равновесие, определяющее максимальный достигаемый выход целевого цефалоспорина [11, 12].

Процессы биокаталитического синтеза СЕЗ, S-р СЕЗ, CFM и S-р CFM сопоставляли по следующим критериям: максимальный выход β-лактамого продукта от КА ($\eta^{\text{макс}}$, %), удельная начальная скорость его накопления, определенная при $C_{\text{КА}}^0 = 150$ мМ ($V_{\text{уд}}^0$, мМ/мин · МЕ), и максимальная концентрация целевого продукта, достигаемая в конечной реакционной смеси ($C^{\text{макс}}$, мМ). $\eta^{\text{макс}}$ характеризует эффективность биокаталитического процесса в целом и зависит от соотношения скоростей реакций, катализируемых ферментом: синтетазной и обеих гидролитических. В сопоставляемых процессах синтеза цефалоспоринов $V_{\text{уд}}^0$ характеризует собственно синтетазную способность IECASA, поскольку определяется по удельной начальной скорости синтеза, то есть в условиях, когда гидролитические процессы еще не оказывают существенного влияния на реакцию образования ациламидной связи β-лактамого продукта. $C^{\text{макс}}$ характеризует получаемую при биокаталитической трансформации конечную реакционную смесь с точки зрения ее пригодности для разработки процессов дальнейшей трансформации продукта или его выделения.

Сопоставление процессов биокаталитического синтеза СЕЗ, S-р СЕЗ, CFM и S-р CFM в стандартных условиях

На рис. 2а приведены кривые накопления СЕЗ, S-р СЕЗ, CFM и S-р CFM в процессах их биокаталитического синтеза, в одинаковых стандарт-

ных условиях, выбранных на основании изучения температурных и рН-зависимостей активности и стабильности IECASA [10]: 30°C, 0,3 М ФБ, $C_{\text{КА}}^0 = 150$ мМ, $X^0 = 3.0$ М/М, спонтанный градиент рН (снижение рН от значения в исходном растворе субстратов до рН 6.0 с поддержанием этого значения до конца процесса). Рассчитанные на основании результатов этих экспериментов критерии эффективности процессов синтеза цефалоспоринов, проведенных в стандартных условиях, представлены в табл. 2 (№ 1, 3, 5 и 7).

В стандартных условиях синтетазная способность IECASA ($V_{\text{уд}}^0$) при ацилировании 7-АСА и 7-ТМСА метиловым эфиром МА различается незначительно: 0.31 и 0.20 мМ/мин · МЕ, соответственно, однако выход продукта при синтезе S-р CFM существенно выше, чем CFM: 81 и 57%, соответственно, (рис. 2а, кривые 4 и 3; табл. 2, № 7 и 5). Это свидетельствует о более высокой скорости гидролиза МЕМА по сравнению со скоростью ацилирования им обеих КА, а также о значительной скорости гидролиза конечных продуктов, особенно CFM.

Ранее было показано, что IECASA демонстрирует более высокую специфичность к остатку TzAA по сравнению с остатком МА при ацилировании 7-ТМСА соответствующими метиловыми эфирами (METzAA и МЕМА) [15]. Кроме того, удельная начальная скорость ацилирования 7-АСА вдвое выше, чем ацилирования ТДА: $V_{\text{уд}}^0 = 1.9$ и 1.0 мМ/мин · МЕ соответственно. Максимальные достигаемые выходы синтеза S-р СЕЗ и СЕЗ составляют 96 и 87%, соответственно, (табл. 2, № 3 и 1), что значительно превышает эффективность синтеза S-р CFM и CFM. Более высокая эффективность процессов биокаталитического ацилирования с использованием в качестве ацилирующего агента METzAA по сравнению с использованием МЕМА в стандартных условиях наглядно продемонстрирована на рис. 2а.

Отметим, что в стандартных условиях при использовании как METzAA, так и МЕМА в качестве АА, биокаталитическое ацилирование 7-АСА осуществляется эффективнее по всем параметрам, чем ацилирование ее С3 производных (ТДА и 7-ТМСА). Известно, что кинетически-контролируемый синтез β-лактамов протекает через образование ацилферментного комплекса и промежуточного комплекса ацилфермента с нуклеофилом, в качестве которого выступает КА [7, 8]. В рамках такой кинетической схемы наблюдаемые различия эффективности синтеза, катализируемого САСА, могут являться следствием более высокой нуклеофильности аминогруппы КА и/или более выгодной стерической конфигурации промежуточного комплекса ацилфермента с нуклеофилом в случае наличия в С3 положении β-лак-

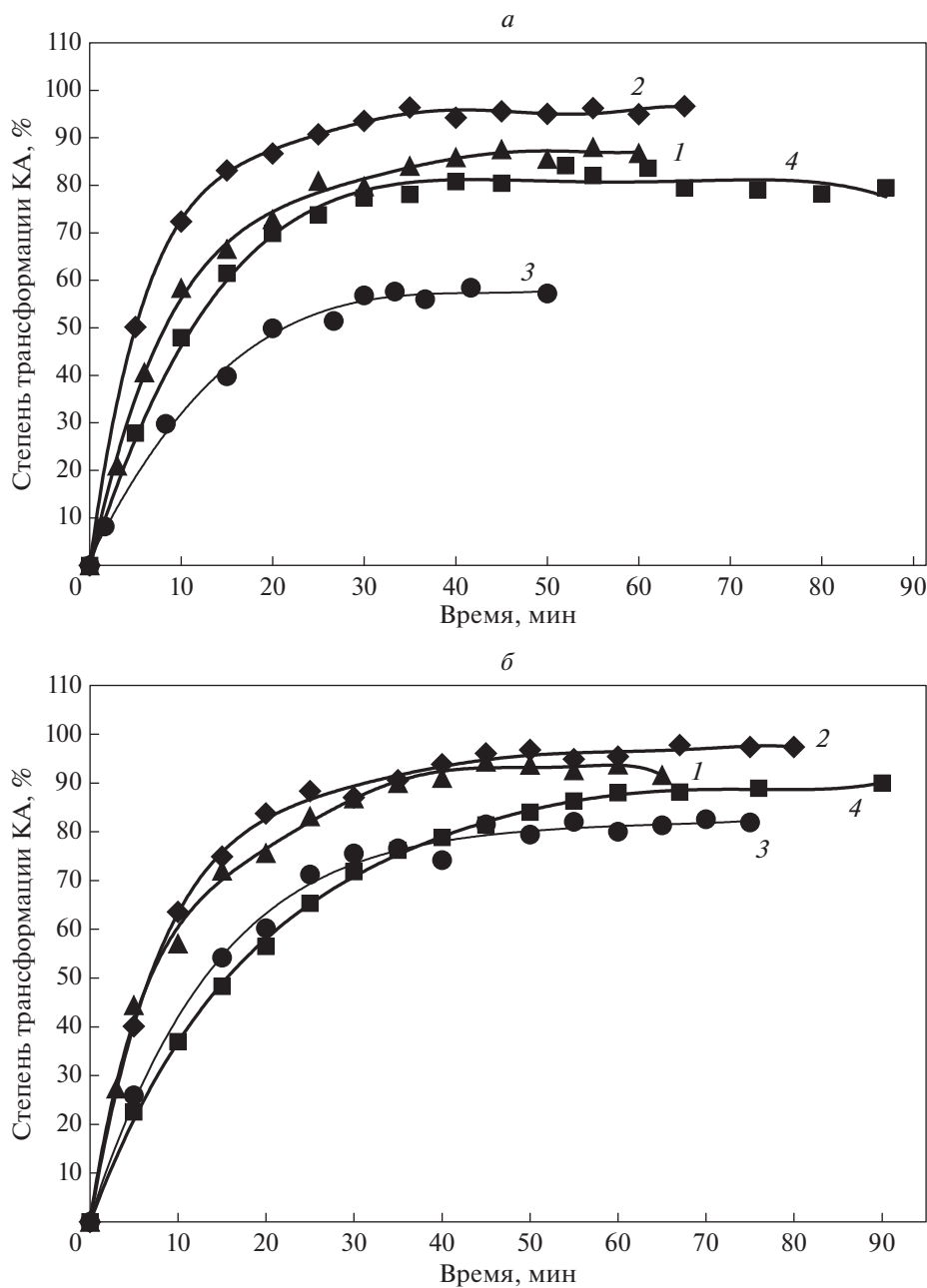


Рис. 2. Кривые накопления β-лактамовых продуктов биокаталитического синтеза, катализируемого IECASA (a) – в стандартных условиях ($C_{КА}^{\circ} = 150 \text{ мМ}$, $X^{\circ} = 3.0 \text{ М/М}$): 1 – CEZ, 2 – S-p CEZ, 3 – CFM, 4 – S-p CFM. (b) – в оптимизированных для каждого процесса условиях: 1 – CEZ ($C_{КА}^{\circ} = 200 \text{ мМ}$, $X^{\circ} = 3.4 \text{ М/М}$), 2 – S-p CEZ ($C_{КА}^{\circ} = 225 \text{ мМ}$, $X^{\circ} = 3.0 \text{ М/М}$), 3 – CFM ($C_{КА}^{\circ} = 120 \text{ мМ}$, $X^{\circ} = 3.3 \text{ М/М}$), 4 – S-p CFM ($C_{КА}^{\circ} = 170 \text{ мМ}$, $X^{\circ} = 3.3 \text{ М/М}$). Условия см. табл. 2.

Fig. 2. Curves of accumulation of β-lactam products of biocatalytic synthesis catalyzed by IECASA (a) – under standard conditions ($C_{КА}^{\circ} = 150 \text{ mM}$, $X^{\circ} = 3.0 \text{ M/M}$): 1 – CEZ, 2 – S-p CEZ, 3 – CFM, 4 – S-p CFM. (b) – under conditions optimized for each process: 1 – CEZ ($C_{КА}^{\circ} = 200 \text{ mM}$, $X^{\circ} = 3.4 \text{ M/M}$), 2 – S-p CEZ ($C_{КА}^{\circ} = 225 \text{ mM}$, $X^{\circ} = 3.0 \text{ M/M}$), 3 – CFM ($C_{КА}^{\circ} = 120 \text{ mM}$, $X^{\circ} = 3.3 \text{ M/M}$), 4 – S-p CFM ($C_{КА}^{\circ} = 170 \text{ mM}$, $X^{\circ} = 3.3 \text{ M/M}$).

Таблица 2. Параметры эффективности процессов синтеза цефалоспоринов, катализируемых IECASA, в стандартных и оптимизированных условиях
Table 2. Efficiency parameters of the synthesis of cephalosporins catalyzed by IECASA under standard and optimized conditions

№	Продукт синтеза (КА_АА)	$C_{КА}^{\circ}$, мМ	X° , М/М	$C_{ЭГ}$, % (об./об.)	C_E , МЕ/мл	рН	η_{\max} , %	C_{\max} , мМ	$V_{уд}^{\circ}$, мм/мин МЕ
1		150	3.0	0	10	8.0 → 6.0	87	130	1.0
2		150–200	3.1–3.5	0	10	Ступенчатый градиент 8.3 → 6.8 → 6.0	93.5 ± 1.5	140–190	1.3
3		150	3.0	0	10	7.0 → 6.0	96	140	1.9
4		120–275	3.0	0	10	7.0 → 6.0	96.5 ± 1.5	115–270	2.0
5		150	3.0	0	30	8.0 → 7.0	57	85	0.20
6		100–120	3.3	43	30	8.0 → 6.0	80.8 ± 1.9	80–100	—
7		150	3.0	0	30	7.4 → 6.0	81	120	0.31
8		140–170	3.3	43	30	8.0 → 6.0	88.6 ± 2.0	125–150	0.35

Примечание. Все процессы проводили в 0.3 М ФБ при 30°C. $C_{ЭГ}$ – концентрация ЭГ в реакционной смеси. Оптимизированные условия выделены жирным шрифтом.
Note. All processes were carried out in 0.3 M FB at 30°C. C_{EG} is the concentration of EG in the reaction mixture. Optimized conditions are in bold.

ма ацильной группы, вместо гетероциклических заместителей.

Сопоставление процессов биокаталитического синтеза CEZ, S-p CEZ, CFM и S-p CFM в оптимизированных условиях

Оптимизация процессов получения CFM и S-p CFM была направлена, в первую очередь, на снижение скорости протекающих при их кинетически-контролируемом синтезе гидролитических процессов. Для этого вместо водной была использована водно-органическая среда, содержащая 43% (об./об.) ЭГ [14]. Известно, что этот двухатомный спирт снижает активность воды, тем самым замедляя процессы гидролиза ацилирующего агента и целевого цефалоспорина. Синтез последнего в присутствии ЭГ тоже тормозится, но в меньшей степени, чем гидролитические реакции [8]. Соотношение гидролитических и синтезанных процессов, при кинетически-контролируемом синтезе цефалоспорина, оценивали изучая динамику изменения мольного избытка АА над КА (X^T , М/М), определяющего скорость биокаталитического процесса в текущий момент.

На рис. 3 показана динамика изменения X^T при ацилировании 7-АСА метиловым эфиром МА в водной (кривая 1) и водно-органической среде (кривая 2), а также соответствующие кривые накопления S-p CFM (кривые 3 и 4). В начале биокаталитического процесса X^T возрастает из-за быстрого расходования КА на синтез продукта. Выход кривой на плато свидетельствует об установлении динамического равновесия между снизившимся расходом КА и расходом АА, происходящим за счет процессов гидролиза АА и продукта. При этом достигается максимальный выход S-p CFM (η^{max} , %), величина которого определяется достигнутым уровнем X^T , зависящим, в свою очередь, от соотношения скоростей синтезанных и гидролитических реакций. В водной среде при $C_{КА}^0 = 150$ мМ, $X^0 = 3,0$ М/М зависимость X^T от времени имеет плато в диапазоне от 35 до 75 мин с уровнем X^T около 4 М/М (рис. 3, кривая 1), а η^{max} достигает величины 81% (рис. 3, кривая 3). В тех же условиях в среде, содержащей 43% (об./об.) ЭГ плато на зависимости X^T от времени достигается к 60 мин процесса, при уровне около 12 М/М (рис. 3, кривая 2), а η^{max} за то же время выходит на плато, достигнув величины 88% (рис. 3, кривая 4).

Оптимизация всех обсуждаемых в данной работе биокаталитических процессов, катализируемых IECASA, была направлена на обеспечение высокого выхода целевого продукта (η^{max} , %) и достижение высокой концентрации продукта в

конечной реакционной смеси (C^{max} , мМ), в частности за счет использования максимально допустимой начальной концентрации КА ($C_{КА}^0$, мМ).

Максимально возможное значение $C_{КА}^0$ (при $X^0 = 3.0-3.5$ М/М) и pH-профиль осуществления процесса выбирали на основании изученной pH-зависимости растворимости субстратов в условиях биокаталитического синтеза CEZ, S-p CEZ, CFM и S-p CFM [10, 13, 14], оптимального для функционирования IECASA диапазона pH 7.0-6.0 [10]. Кроме того, учитывали самопроизвольное снижение pH за счет накопления КК, являющейся продуктом гидролитических процессов [6, 8]. Это может приводить к выпадению в осадок непрореагировавшей КА, так как ее растворимость резко снижается при переходе из области щелочных значений pH к нейтральным [13, 14].

Разработанный способ синтеза CEZ в ступенчатом градиенте pH [10] (растворение КА при pH 8.3, а затем спонтанное снижение pH в реакционной смеси, включающее его поддержанием на двух уровнях pH 6.8 и pH 6.0), исключил выпадение в осадок непрореагировавшей TDA по мере протекания биокаталитического синтеза и позволил использовать $C_{КА}^0$ вплоть до 200 мМ при $X^0 = 3.1-3.5$ М/М [10, 13]. Растворимость 7-АСА в водной среде значительно выше, чем TDA [13], поэтому при ее ацилировании с помощью MET-zAA при синтезе S-p CEZ увеличение $C_{КА}^0$ вплоть до 275 мМ при $X^0 = 3.0$ М/М не приводило к выпадению КА в процессе синтеза несмотря на спонтанно устанавливающийся градиент pH от исходного значения pH 7.0 до pH 6.0. Это значение pH 6.0 поддерживали до конца процесса [13].

Растворимость 7-АСА в водно-органической среде, содержащей 43% (об./об.) ЭГ, выше, чем в водной среде. Однако при синтезе S-p CFM в водно-органической среде при таком же спонтанном градиенте pH допустимый диапазон исходных концентраций субстратов ограничен сверху из-за относительно низкой растворимости ацилирующего агента МЕМА. В связи с этим в оптимизированном процессе синтеза S-p CFM использовали $C_{КА}^0$ не более 170 мМ при $X^0 = 3.3$ М/М, начиная ацилирование 7-АСА при pH 8 в присутствии осадка МЕМА, который растворялся при расходовании АА по ходу процесса [14].

Растворимость 7-ТМСА в среде, содержащей 43% (об./об.) ЭГ, низка, поэтому оптимизированный процесс синтеза CFM осуществляли при $C_{КА}^0$ не более 120 мМ при $X^0 = 3.3$ М/М в спонтанном градиенте pH, начиная от pH 8.0 [14].

На рис. 4 сопоставлены зависимости эффективности синтеза CEZ [10, 13], S-p CEZ [13], CFM

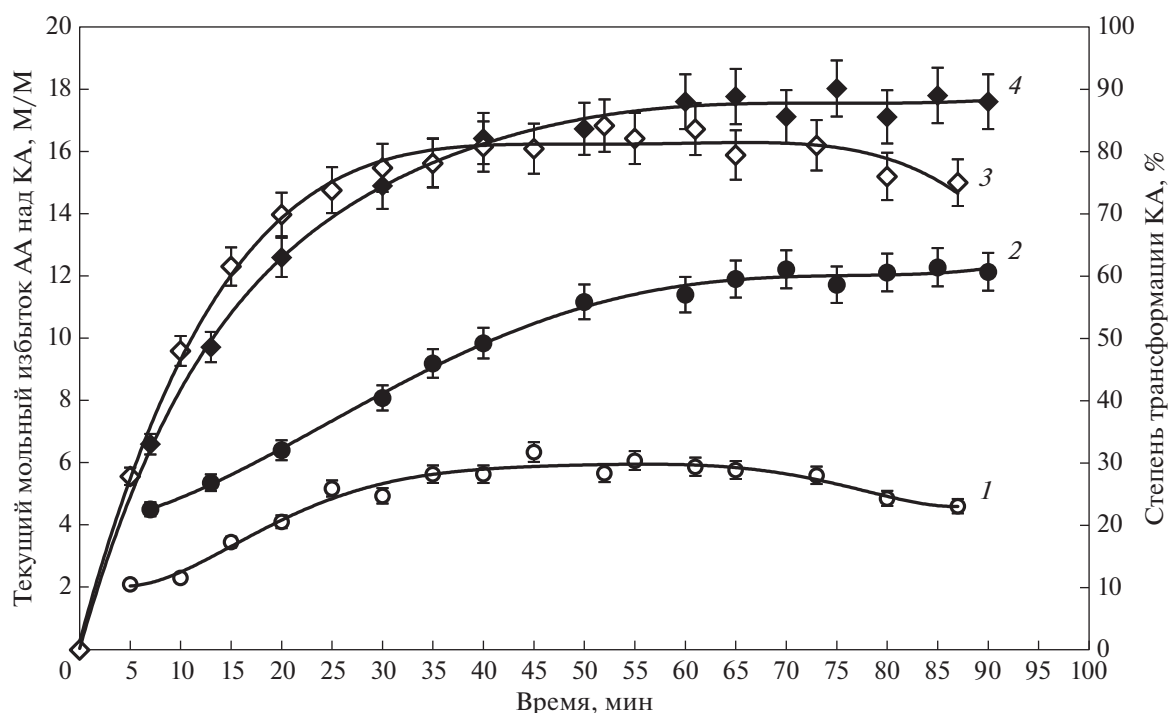


Рис. 3. Влияние текущего мольного избытка АА над КА на динамику процесса синтеза S-р CFM 1 и 2 – Зависимость текущего мольного избытка АА над КА (X^T , М/М) от времени. 3 и 4 – Кривые накопления продукта S-р CFM. Условия: 30°C, 0,3 М ФБ, $C_{КА}^0 = 150$ мМ, $X^0 = 3$ М/М. 1 и 3 – $C_{ЭГ} = 0\%$, 2 и 4 – $C_{ЭГ} = 43\%$.

Fig. 3. Influence of the current molar excess of AA over KA on the dynamics of the synthesis process of S-p CFM 1 and 2 – Dependence of the current molar excess of AA over KA (X^T , M/M) on time. 3 and 4 – S-p CFM product accumulation curves.

Conditions: 30°C, 0.3 M PB, $C_{КА}^0 = 150$ mM, $X^0 = 3$ M/M. 1 and 3 – $C_{ЭГ} = 0\%$, 2 and 4 – $C_{ЭГ} = 43\%$.

и S-р CFM [14] (по критерию η^{\max} , %) от $C_{КА}^0$ в условиях, выбранных в качестве оптимальных для каждого из процессов. Зависимости η^{\max} vs $C_{КА}^0$ имеют вид кривых с насыщением, что позволяет определить диапазон начальных концентраций КА, обеспечивающих максимальный выход цефалоспорина (см. табл. 2). Рисунок 5 демонстрирует зависимость максимальной достигаемой концентрации целевого продукта в конечной реакционной смеси (C^{\max} , мМ) от $C_{КА}^0$, мМ.

При ацилировании TDA с помощью METzAA в оптимизированных условиях стабильный высокий выход CEZ $\eta^{\max} = 93.5 \pm 1.5\%$ (среднее значение на плато) был достигнут в диапазоне $C_{КА}^0 = 150\text{--}200$ мМ (рис. 4, кривая 1), а в конечной реакционной смеси получена концентрация продукта C^{\max} от 140 до 190 мМ в зависимости от $C_{КА}^0$ (рис. 5, кривая 1). Зависимость η^{\max} от $C_{КА}^0$ для процесса ацилирования 7-АСА с помощью METzAA, осуществляемого в оптимизированных условиях,

выходит на плато, длящееся в диапазоне $C_{КА}^0$ от 120 до 275 мМ (рис. 4, кривая 2). При этом был достигнут $\eta^{\max} = 96.5 \pm 1.5\%$ (среднее значение на плато), а в конечной реакционной смеси получена концентрация продукта C^{\max} от 115 до 270 мМ при $C_{КА}^0$ в интервале 120–280 (рис. 5, кривая 2).

Процессы биокаталитического синтеза CFM и S-р CFM в оптимизированных условиях протекают менее эффективно, чем синтез CEZ и S-р CEZ. При ацилировании 7-ТМСА с помощью МЕМА в узком диапазоне $C_{КА}^0$ от 100 до 120 мМ (рис. 4, кривая 3) был достигнут выход $\eta^{\max} = 80.8 \pm 1.9\%$ (среднее значение на плато) при концентрации продукта в конечной реакционной смеси C^{\max} от 80 до 100 мМ (рис. 5, кривая 3). Ацилирование 7-АСА с помощью МЕМА протекает эффективнее, чем ацилирование 7-ТМСА: в диапазоне $C_{КА}^0$ от 140 до 170 мМ (рис. 4, кривая 4) выход составляет $\eta^{\max} = 88.6 \pm 2.0\%$ (среднее значение на плато) при концентрации продукта в конечной реак-

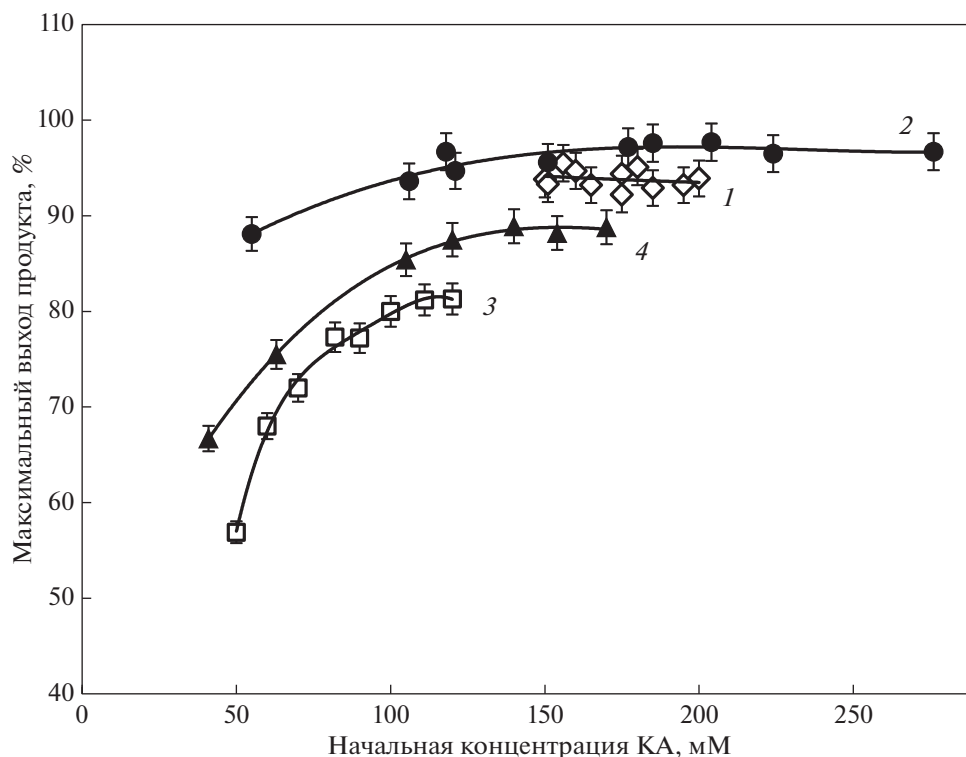


Рис. 4. Зависимость максимального выхода β-лактамого продукта $\eta^{\text{макс}}$ % от начальной концентрации КА ($C_{\text{КА}}^{\circ}$, mM) при синтезе, катализируемом IECASA 1 – синтез CEZ [10], 2 – синтез S-p CEZ [13], 3 – синтез CFM ($C_{\text{ЭГ}} = 43\%$) [14], 4 – синтез S-p CFM ($C_{\text{ЭГ}} = 43\%$) [14]. Условия: 30°C, 0,3 М ФБ, $X^{\circ} = 3.0\text{--}3.5$ М/М. 1 – ступенчатый градиент pH, 2, 3 и 4 – спонтанный градиент pH.

Fig. 4. Dependence of the maximum yield of the β-lactam product $\eta^{\text{макс}}$, % on the initial concentration of KA ($C_{\text{КА}}^{\circ}$, mM) in the synthesis catalyzed by IECASA 1 – synthesis of CEZ [10], 2 – synthesis of S-p CEZ [13], 3 – synthesis of CFM ($C_{\text{ЭГ}} = 43\%$) [14], 4 – synthesis of S-p CFM ($C_{\text{ЭГ}} = 43\%$) [14]. Conditions: 30°C, 0.3 M PB, $X^{\circ} = 3.0\text{--}3.5$ M/M. 1 – stepwise pH gradient, 2, 3 and 4 – spontaneous pH gradient.

ционной смеси $C^{\text{макс}}$ от 125 до 150 mM (рис. 5, кривая 4).

В табл. 2 (№№ 2, 4, 6 и 8) представлены оптимальные условия, выбранные для каждого из изученных биокаталитических процессов, а также достигаемые при этом показатели эффективности, данные в сравнении с соответствующими показателями для процессов, проведенных в стандартных условиях (№№ 1, 3, 5 и 7). На рис. 2 сопоставлены кривые накопления CEZ, S-p CEZ, CFM и S-p CFM в процессах их биокаталитического синтеза, осуществленных в стандартных условиях (рис. 2a) и оптимизированных для каждого процесса условиях (рис. 2b).

Отметим, что оптимизация синтеза с ацильным переносом, направленная на замедление гидролитических реакций, а также выбор рабочего диапазона начальных концентраций КА и АА и pH-профиля процесса с учетом растворимости субстратов, слабо влияет на величину параметра $V_{\text{уд}}^{\circ}$, характе-

ризующую собственно синтетазную способность IECASA в каждом из процессов (табл. 2).

Результаты, представленные в табл. 2 и на рис. 2a и 2b, свидетельствуют об успешной оптимизации изученных процессов, катализируемых IECASA, в отношении таких параметров эффективности как выход процесса ($\eta^{\text{макс}}$, %) и максимальная достигаемая концентрация целевого продукта в конечной реакционной смеси ($C^{\text{макс}}$, mM).

Наибольшее повышение $\eta^{\text{макс}}$ было достигнуто при оптимизации процесса синтеза CFM: с 57 до 80–82% (табл. 2, № 5 и 6). При этом пришлось ограничить рабочий диапазон $C_{\text{КА}}^{\circ}$ величиной 120 mM из-за снижения растворимости 7-ТМСА в присутствии ЭГ [14], поэтому в конечной реакционной смеси концентрация продукта $C^{\text{макс}}$ не может превысить 100 mM.

В оптимизированных для каждого процесса условиях при использовании как METzAA, так и

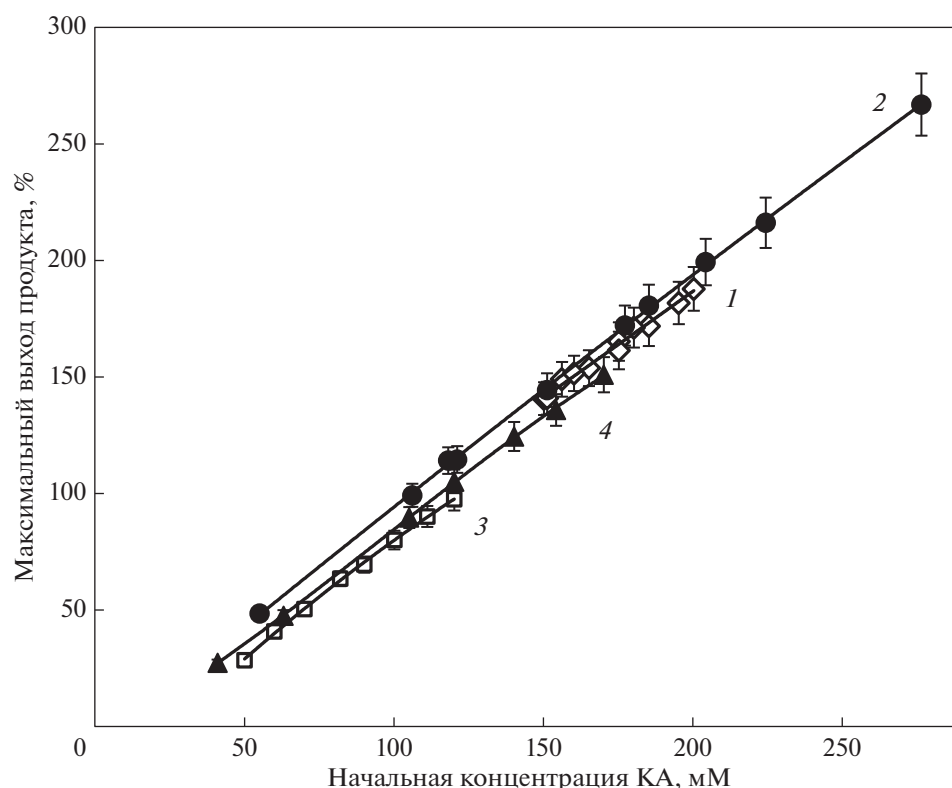


Рис. 5. Зависимость максимальной концентрации продукта в конечной реакционной смеси $C^{\text{макс}}$, mM от начальной концентрации КА ($C^{\circ}_{\text{КА}}$, mM) при синтезе, катализируемом IECASA 1 – синтез CEZ, 2 – синтез S-p CEZ, 3 – синтез CFM ($C_{\text{ЭГ}} = 43\%$), 4 – синтез S-p CFM ($C_{\text{ЭГ}} = 43\%$). Условия: 30°C , 0.3 М ФБ, $X^{\circ} = 3.0\text{--}3.5$ М/М. 1 – ступенчатый градиент pH, 2, 3 и 4 – спонтанный градиент pH.

Fig. 5. Dependence of the maximum concentration of the product in the final reaction mixture $C^{\text{макс}}$, mM on the initial concentration of KA ($C^{\circ}_{\text{КА}}$, mM) in the synthesis catalyzed by IECASA 1 – synthesis of CEZ, 2 – synthesis of S-p CEZ, 3 – synthesis of CFM, 4 – synthesis of S-p CFM. Conditions: 30°C , 0.3 M PB, $X^{\circ} = 3.0\text{--}3.5$ M/M. 1 – stepwise pH gradient, 2, 3 and 4 – spontaneous pH gradient.

МЕМА в качестве АА, биокаталитическое ацилирование 7-АСА является по всем параметрам более эффективным процессом, чем ацилирование ее СЗ производных ТДА (табл. 2, № 4 и 3) и 7-ТМСА (табл. 2, № 8 и 6). Кроме того, эффективность ацилирования 7-АСА с помощью METzAA выше, чем при использовании в качестве АА метилового эфира МА (табл. 2, № 4 и 8). Это является следствием более высокой синтетазной способности IECASA в отношении синтеза S-p CEZ ($V_{\text{уд}}^{\circ} = 0.35$ мМ/мин МЕ), по сравнению с синтезом S-p CFM ($V_{\text{уд}}^{\circ} = 2.0$ мМ/мин МЕ), а также низкой растворимости МЕМА, влияющей на выбор рабочего диапазона $C^{\circ}_{\text{КА}}$ (не более 170 мМ при $X^{\circ} = 3.3$ М/М).

Процесс ацилирования 7-АСА метиловым эфиром TzAA является наиболее успешным из всех изученных (кривая 2 на рис. 2b, 4 и 5). Для процесса,

протекавшего в стандартных условиях с выходом 96% (табл. 2, № 3), путем оптимизации удалось достичь стабильно высокого выхода 95–98% в широком диапазоне $C^{\circ}_{\text{КА}}$ вплоть до 275 мМ. При этом в конечной реакционной смеси концентрация целевого продукта составила 270 мМ (табл. 2, № 4).

Была изучена операционная стабильность IECASA путем проведения последовательных операций синтеза S-p CEZ в реакторе периодического действия с фильтрующим дном с использованием одной и той же порции БК. После проведения 50 циклов синтеза S-p CEZ с выходом продукта 95–98% остаточная активность образца IECASA составила $(79 \pm 2)\%$. Зависимость относительной остаточной активности БК от количества проведенных циклов синтеза (в полулогарифмических координатах реакции первого порядка [10]) представлена на рис. 6.

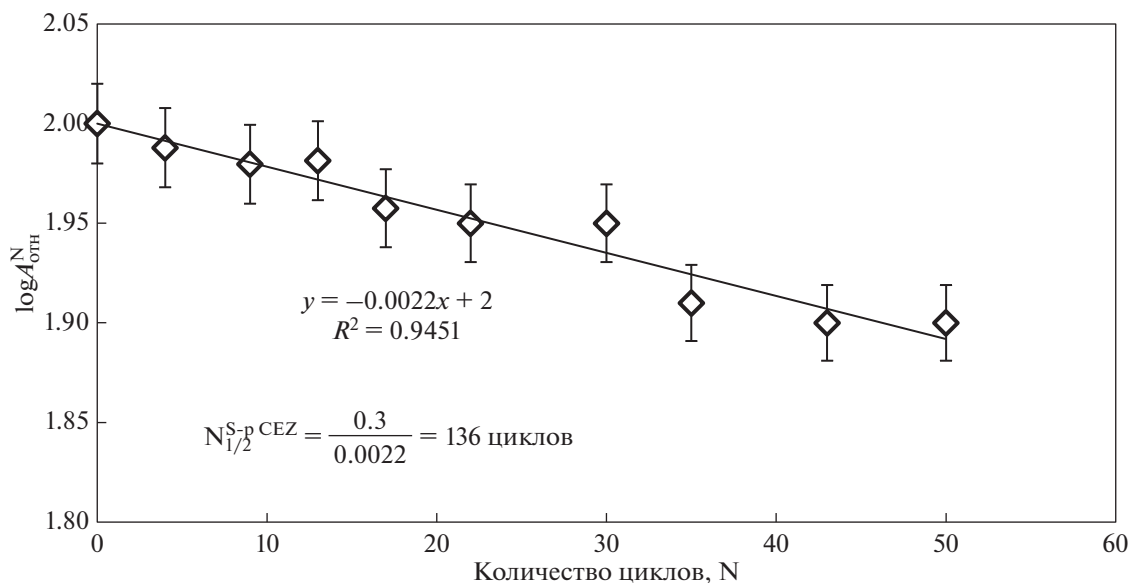


Рис. 6. Операционная стабильность IECASA в ферментативном синтезе S-p CEZ.
Fig. 6. Operational stability of IECASA in S-p CEZ enzymatic synthesis.

Рассчитанный на основании полученных данных период полуинактивации IECASA в процессе синтеза S-p CEZ составляет $N_{1/2}^{S-p CEZ} = \frac{0.3}{0.0022} = (136 \pm 7)$ циклов. Определенный нами ранее период полуинактивации IECASA в процессе синтеза CEZ в оптимизированных условиях составлял $N_{1/2}^{CEZ} = 85$ циклов [10]. Улучшение операционной стабильности IECASA является, по-видимому, результатом осуществления процесса ацилирования 7-АСА в мягких по pH условиях (от 7.0 до 6.0), близких к оптимальным для стабильности БК [10] по сравнению с ацилированием TDA.

Таким образом, процессы биокаталитического ацилирования 7-АСА метиловыми эфирами как TzAA, так и MA (рис. 1, трансформация 3) протекают более эффективно, чем ацилирование СЗ производных 7-АСА, а именно, TDA и 7-ТМСА (рис. 1, трансформация 2) как по достигаемому выходу продукта, так и по возможности получения его высокой концентрации в реакционной смеси. Химическая модификация полученных полупродуктов по СЗ положению β -лактама с образованием соответствующих цефалоспоринов (рис. 1, трансформация 4) может быть осуществлена без выделения этих полупродуктов из реакционной смеси, произведенной биокаталитическим способом, то есть в водной среде [14, 16]. При этом химическая трансформация 7-АСА в TDA или 7-ТМСА (рис. 1, трансформация 1) является вредной с экологической точки зрения, так как осуществляется в среде органических растворителей с использованием токсичных реагентов. Продукты биокаталитического ацилирования 7-АСА ме-

тиловыми эфирами TzAA и MA (рис. 1, трансформация 3) могут быть использованы не только для химической модификации в CEZ и CFM (рис. 1, трансформация 4), но и для получения других цефалоспоринов. S-p CEZ является также полупродуктом для синтеза цефтезола, а S-p CFM – для синтеза цефоницида.

В табл. 3 оптимизированные методы ацилирования 7-АСА, катализируемого IECASA, сопоставлены по выходу продукта ($\eta^{\text{макс}}$, %) и его концентрации в конечной реакционной смеси ($C^{\text{макс}}$, мМ) с описанными в литературе биокаталитическими процессами, направленными на получение полупродуктов синтеза цефалоспоринов, где в качестве БК использовалась иммобилизованная различными способами пенициллинацилаза (ПА) из *E. coli*. Выходы S-p CEZ и S-p CFM, достигнутые в данной работе, соответствуют лучшим из полученных ранее результатов. При этом проведенная нами оптимизация процессов, учитывающая pH-зависимости растворимости субстратов и

направленная на увеличение $C_{\text{КА}}^{\circ}$, позволила в 3–5 раз повысить концентрацию цефалоспорина в реакционной смеси по сравнению с литературными данными. Последний факт особенно важен для дальнейшей разработки эффективной трансформации полупродукта в целевой антибиотик (рис. 1, трансформация 4) непосредственно в реакционной смеси, получаемой при биокаталитическом синтезе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что химико-биокаталитический синтез таких цефалоспоринов как CEZ, CFM путем пря-

Таблица 3. Параметры эффективности процессов биокаталитического ацилирования 7-АСА
Table 3. Efficiency parameters of 7-ACA biocatalytic acylation

Продукт	БК	Условия процесса					Конечная реакционная смесь	
		$C_{КА}^{\circ}$, мм	X° , М/М	среда	температура, °С	время, мин	η^{\max} , %	C^{\max} , мм
S-p CEZ	IECASA	120–275	3.0	0.3 М ФБ	30	30–50	96.5 ± 1.5	115–270
	ПА из <i>E. coli</i> на глиоксил-агарозе [17]	50	3.0	Водный раствор	4	22	98.0	50
S-p CFM	IECASA	140–170	3.3	0.3 М ФБ, ЭГ (43%)	30	60	88.6 ± 2.0	125–150
	ПА из <i>E. coli</i> на глиоксил-агарозе [18, 19]	50	3.0	1 М ФБ CH ₃ OH (20%)	4	120	80.0	40
	ПА из <i>E. coli</i> , на Sepharose [16]	50	3.0	Водная двухфазная система: ПЭГ 600 (80%) и 4 М (NH ₄) ₂ SO ₄	4	120	88.0	44
	ПА из <i>E. coli</i> на глиоксил-агарозе [20]	100	0.5	1 М ФБ, CH ₃ OH (40%)	4	–	73.0	73

мого биокаталитического ацилирования 7-АСА с последующей химической модификацией полупродуктов является перспективной заменой традиционного пути, использующего биокаталитическое ацилирование производных 7-АСА с замещенной 3-ацетокси группой. Кроме того, они открывают возможность для разработки подобных технологий получения таких антибиотиков как цефтезол, цефоницид, а также других цефалоспоринов, содержащих в СЗ положении β-лактама объемный заместитель.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана Внутренним грантом НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pellis A., Cantone S., Ebert C., Gardossi L. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *N. Biotechnol.*, 2018, 40, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.005>
2. Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cesar S., Cardona-Felix, Aguilar-Gonzales C.N., Flores-Gallegos A.C. Enzymes in the Pharmaceutical Industry for β-Lactam Antibiotic Production. In: *Enzymes in Food Biotechnology - Production, Applications, and Future Prospects* [Ed. M. Kuddus]. Acad. Press, 2018, (36), 627–643. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00036-0>
3. Cabri W. Industrial Synthesis Design with Low Environmental Impact in the Pharma Industry. In: *New Methodologies and Techniques for a Sustainable Organic Chemistry*. [Ed. A. Mordini, F. Faigl]. *NATO Science Series*, 2008, 246, 119–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6793-8_6
4. Gröger H., Pieper M., Koenig B., Bayer T., Schleich H. Industrial landmarks in the development of sustainable production processes for the β-lactam antibiotic key intermediate 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). *Sustain. Chem. Pharm.*, 2017, 5, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.08.001>
5. Rudroff F., Mihovilovic M. D., Gröger H., Snajdrova R., Iding H., Bornscheuer U. T. Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis. *Nat. Catal.*, 2018, 1, 12–22. <https://doi.org/10.1038/s41929-017-0010-4>
6. Sklyarenko A.V., Eldarov M.A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of β-lactam acids (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, 51(6), 627–640. <https://doi.org/10.1134/S0003683815060150>
7. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics. Analytical review. In: *Biotechnology: state of the art and prospects for development* [Ed. G.E. Zaikov]. Nova Science Publishers, 2008, (20), 175–204.
8. Курочкина В.Б., Скляренко А.В. Ферментативный синтез бета-лактамовых антибиотиков. *Антибиотики и химиотерапия*, 2005, 50(5–6), 39–58.
9. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И., Епремян А.С., Яроцкий С.В. Рекомбинантная синтета цефалоспоринов-кислот: оптимизация экспрес-

- сии в клетках *E. coli*, иммобилизация и использование для биокаталитического синтеза цефазолина. *Биомедицинская химия*, 2015, 61(5), 646–651. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156105646>
10. Wang Lu, Sklyarenko A.V., Duanhua Li, Sidorenko A.I., Zhao C., Li J., Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of cefazolin using immobilized recombinant cephalosporin-acid synthetase as the biocatalyst. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2018, 41(12), 1851–1867. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2007-z>
 11. Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. Biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology* [Ed. M.C. Flickinger]. John Wiley & Sons, 2010, 1–32. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib640>
 12. Sheldon R.A., Brady D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. *ChemComm.*, 2018, (54), 6088–6104. <https://doi.org/10.1039/c8cc02463d>
 13. Склярёнок А.В., Грошкова И.А., Сидоренко А.И., Яроцкий С.В. Альтернативный синтез цефазолина с использованием синтетазы цефалоспоринов-кислот. *Прикл. Биохим. Микробиол.*, 2020, 56(5), 452–464. <https://doi.org/10.31857/S055510992005013X>
 14. Склярёнок А.В., Грошкова И.А., Крестьянова И.Н., Яроцкий С.В. Альтернативные пути синтеза цефамандола с использованием биокаталитического ацилирования, катализируемого иммобилизованной синтетазой цефалоспоринов-кислот. *Прикл. Биохим. Микробиол.*, 2022, 58(3), 253–263. <https://doi.org/10.31857/S0555109922030126>
 15. Склярёнок А.В., Грошкова И.А., Горбунов Н.А., Яроцкий С.В. Биокаталитический синтез новых цефалоспоринов с использованием иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот. *Биотехнология*, 2022, 38(2), 43–56.
 16. Terreni M., Ubiali D., Pagani G., Hernandez-Justiz O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Penicillin G acylase catalyzed acylation of 7-ACA in aqueous two-phase systems using kinetically and thermodynamically controlled strategies: improved enzymatic synthesis of 7-[(1-hydroxy-1-phenyl)-acetamido]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylic acid. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 36(5–6), 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.11.010>
 17. Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Pregnotato M., Terreni M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38(26), 4693–4696.
 18. Terreni M., Pagani G., Ubiali D., Fernandez-Lafuente R., Mateo C., Guisan J.M. Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of Cephamandole from Cephalosporin C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11(18), 2429–2432. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00463-2)
 19. Terreni M., Tchamkam J., Sarnataro U., Rocchietti S., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Influence of Substrate Structure on PGA-Catalyzed Acylations. Evaluation of Different Approaches for the Enzymatic Synthesis of Cefonicid. *Adv. Synth. Catal.*, 2005, 347(1), 121–128. <https://doi.org/10.1002/adsc.200404136>
 20. Fernandez-Lafuente R., Rosell C.M., Guisan J.M. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized Penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, 23(5), 305–310. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00053-2)

Comparative Study of Biocatalytic Acylation of 7-Aminocephalosporanic Acid and Its C3 Derivatives

A. V. Sklyarenko^a, I. A. Groshkova^a, #, N. A. Gorbunov^a, and S. V. Yarotsky^a

^aKurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia

#e-mail: ingagrosh@mail.ru

Abstract—The efficiency has been compared of the optimized acylation processes of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) and its C3 derivatives (7-amino-3-[2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl]-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid (TDA), and 1-methyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazolyl-7-aminocephalosporanic acid (7-TMCA)) by methyl esters of 1(H)-terazolyacetic and *D*-mandelic acids (METzAA and MEMA). These processes are catalyzed by immobilized cephalosporin-acid synthetase (IECASA) and are the biocatalytic stages of two different chemical-biocatalytic pathways for the synthesis of cefazolin (CEZ) and cefamandole (CFM). Biocatalytic acylation of 7-ACA resulting in the formation of semi-products of the synthesis of antibiotics proceeded more efficiently than acylation of the corresponding C3 derivatives of 7-ACA, leading to the formation of CEZ and CFM, in terms of both the achieved product yield and the possibility of obtaining them in high concentration in the reaction mixture. At the same time, the synthetase ability of IECASA is highest in the acylation of 7-ACA using METzAA. It was shown that the chemical-biocatalytic synthesis of CEZ and CFM by direct biocatalytic acylation of 7-ACA followed by chemical modification of the semi-product at the C3 position of the β -lactam nucleus is a promising alternative to the traditional pathway using the biocatalytic acylation of 7-ACA derivatives with a substituted 3-acetoxy group.

Keywords: biocatalytic synthesis, kinetically controlled synthesis, acyl transfer synthesis, cephalosporin-acid synthetase, cefazolin, cephalosporins, cefamandole