

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2005

А. Е. Новикова^{1,*}, О. С. Анисимова², К. Ф. Турчин², С. А. Фомина¹,
М. Г. Луниц¹, Е. В. Дегтерева²

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

¹ ЗАО "Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика" (АГРИ), Москва, anovikova_agri@yahoo.com;

² ФГУП "Центр по химии лекарственных средств — Всероссийский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт", Москва

Предложен модифицированный метод асcc-tag-ВЭЖХ для ускоренного анализа пролина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в культуральных жидкостях. Продемонстрировано влияние концентрации L-изолейцина, добавленного в ростовую среду, на накопление ГАМК и подтверждено ее накопление в культуральных жидкостях штаммов *E.coli* с помощью методов масс-спектрометрии и ЯМР.

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) является нейромедиатором и широко применяется в медицине в качестве природного транквилизатора, а также как лекарственное средство при сосудистых заболеваниях головного мозга. Известны химические методы синтеза ГАМК [1], микробиологические способы получения ГАМК с использованием бактерий *E. coli* [2] и *Arthrobacter simplex* ATCC 15799 [3]. В то же время имеется лишь одно сообщение о том, что ауксотрофные по L-изолейцину бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, могут продуцировать ГАМК в условиях выращивания бактерий в питательной среде, содержащей значительное количество L-изолейцина [4].

Биосинтез ГАМК из глутамата в *Escherichia coli* катализируется двумя изоферментами — декарбоксилазами глутаминовой кислоты — *GadA* и *GadB*, кодируемыми генами *gadA* и *gadB* соответственно [5]. Штаммы-продуценты L-пролина — ауксотрофы по изолейцину — обладают повышенным пулом глутамата — структурного предшественника как L-пролина, так и ГАМК [4]. Поэтому при проведении ферментации с целью продукции пролина, ГАМК является нежелательной примесью, к тому же образование ГАМК снижает конверсию пролина из глюкозы, поскольку на пути биосинтеза пролина часть глутамата расходуется на синтез ГАМК. С другой стороны, на основе штаммов-продуцентов пролина могут быть получены продуценты ГАМК — при изменении условий ферментации в сторону благоприятствования биосинтезу ГАМК (повышение концентрации изолейцина в среде). Механизм влияния изолейцина на экспрессию генов путей биосинтеза ГАМК и пролина пока неизвестен. Возможно, концентрация изолейцина влияет на уровень синтеза одного из глобальных клеточных регуляторов [5].

Традиционно аминокислоты, в том числе и ГАМК, определяют с помощью классического анализатора

с пост-колоночной нингидриновой реакцией [6]. Также используются методы с предколоночной дериватизацией, например, с получением производных аминокислот: с 4-диметиламиноазобензол-4'-сульфонил (дабсил) хлоридом [7] или дансил хлоридом [8], поглощающих в УФ или видимой области спектра. В отличие от аминокислотного анализатора эти методы не требуют специализированного прибора и могут быть воспроизведены на любом градиентном жидкостном хроматографе с UV-VIS детектором. Для более чувствительного электрохимического детектирования получают производные аминокислот с *ortho*-фталевым альдегидом [9, 10]. Но считается, что для электрохимического детектирования характерна высокая восприимчивость к загрязнению и, вследствие этого, быстрое изнашивание рабочего электрода, что вызывает увеличение фона и возникновение неожиданных артефактов [11]. Широко распространены методы, основанные на получении флюоресцирующих производных аминокислот, например, с тем же *ortho*-фталевым альдегидом [12–16], с последующим их разделением на колонках C18. Было также показано, что ГАМК можно успешно анализировать с помощью метода асcc-tag, в основе которого лежит получение флюоресцирующих производных аминокислот с 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидил-карбаматом [17]. Однако по этому методу время анализа составляет более 30 мин, что для рутинного анализа является довольно продолжительным. Поэтому на основе метода асcc-tag была разработана методика, позволяющая анализировать ГАМК в полученных образцах за 20 мин.

Таким образом, целью настоящего исследования являлось установление факта накопления ГАМК и проведение анализа культуральных жидкостей микроорганизмов, продуцирующих это соединение.

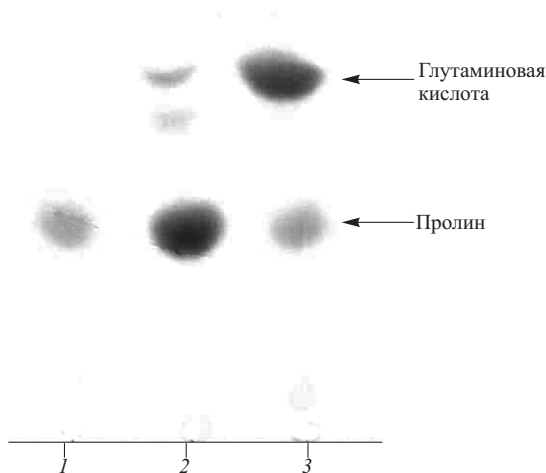


Рис. 1. Хроматограмма культуральной жидкости штамма *E. coli* 4–71 (пробирочная ферментация): 1 — стандарт пролина; 2 — накопление аминокислот в культуральной жидкости штамма при добавлении в ростовую среду 200 μг изолейцина; 3 — накопление аминокислот в культуральной жидкости штамма при добавлении в ростовую среду 50 μг изолейцина

Экспериментальная химическая часть

В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США): L-глутаминовая кислота, L-серин, L-глицин, L-аспарагиновая кислота, L-глутаминовая кислота, L-гистидин, L-треонин, L-аргинин, L-аланин, L-пролин, L-ГАМК, L-α-аминомасляная кислота. Также были использованы реактивы: аммония ацетат (Aldrich, США), уксусная кислота (Merck, Германия), ацетонитрил (Криохром, Россия), аммиак водный (Реахим, Россия). Для получения производных аминокислот с 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидил-карбаматом использовали набор Accq-Fluor™ (Waters, США). Для проведения анализа методом accq-tag использовали концентрат Accq-tag Eluent A (Waters, США). Все растворы приготавливали с использованием воды Milli-Q, стандартные растворы держали при температуре + 4 °С.

Для ТСХ были использованы пластинки Sorbfil (Сорбполимер, Россия), подвижная фаза состояла из следующих компонентов этанол — вода — аммиак,

14:5:1. $R_f(\text{пролин}) = 0,291$; $R_f(\text{глутаминовой кислоты}) = 0,455$; $R_f(\text{ГАМК}) = 0,273$.

Для бумажной хроматографии были использованы листы FN11 (Filtrak, Германия), подвижная фаза представляла собой смесь бутанол — уксусная кислота — вода = 4:1:1. $R_f(\text{пролин}) = 0,176$; $R_f(\text{глутаминовой кислоты}) = 0,078$; $R_f(\text{ГАМК}) = 0,224$. Для окрашивания использовали 1% (масс./об.) раствор нингидрина в ацетоне [18].

В работе был использован хроматограф высокого давления (Waters, США) со спектрофлуориметром серии 1100 (Agilent, США). Выбранный диапазон детектирования: длина волны возбуждения 250 нм, диапазон спектра испускания 300 – 560 нм. Разделение методом accq-tag проводили на колонке Nova-Pak™ C18 150 × 3,9 мм, 4 мкм (Waters, США) при температуре + 40 °С. В хроматограф вводили 5 мкл образца. Получение производных аминокислот и их разделение проводилось согласно методике фирмы Waters [17, 19]. Во втором случае разделение проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1 × 50 мм, 5 мкм. Подвижная фаза содержала 10 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ с pH 4,5 (доведение уксусной кислотой). Условия градиента представлены в табл. 1. Скорость подачи элюента составляла 1 мл/мин. В хроматограф вводили 3 мкл образца.

Масс-спектры снимались на масс-спектрометре SSQ-710 (Finnigan, США) в следующих условиях: энергия ионизирующих электронов – 70 эВ, температура ионизационной камеры 150 °С. При получении спектров электронного удара образцы нагревались со скоростью подъема температуры 163 °/мин до 350 °С.

Спектры ЯМР были сняты на спектрометре UNITY + 400 (Varian, США) с рабочей частотой 400 МГц на ядре ^1H . В качестве растворителя была использована тяжелая вода (D_2O), в качестве внутреннего стандарта — сигнал остаточных протонов растворителя (HOD) δ 4,67.

Экспериментальная биологическая часть

Штамм 702ilvA (ВКПМ В-8012) и полученный на его основе штамм 4–71 являются дефицитными по

Таблица 1
Таблица градиента для разделения на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18

Время	V , мл/мин	%		
		A	B	C
0,0	1	100	0	0
0,4	1	99	1	0
12,0	1	96,3	3,7	0
12,1	1	0	60	40
15,0	1	0	60	40
15,2	1	100	0	0
20,0	1	100	0	0

Примечание. A – 10 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 4,5; B – CH_3CN ; C – H_2O

Таблица 2
Массовые числа, характерные для ГАМК в спектре ЭУ

γ -ГАМК	
M/z	фрагмент
104	$[\text{MH}]^+$
103	$[\text{M}]^+$
86	$[\text{M-OH}]^+$
85	$[\text{M-H}_2\text{O}]^+$
84	$[\text{M-H}_2\text{O-H}]^+$
73	$[\text{M-NH}_2\text{CH}_2]^+$
69	$[\text{M-OH-NH}_3]^+$
56	$[\text{M-NH}_2\text{CH}_2\text{-OH}]^+$
45	$[\text{COOH}]^+$
43	$[\text{NH}_2\text{CH=CH}_2]^+$

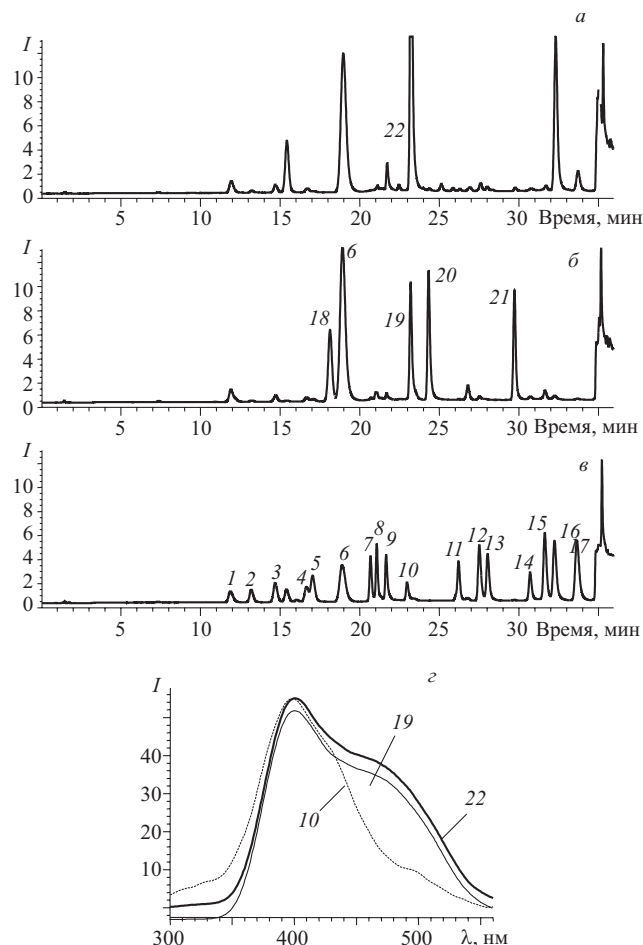


Рис. 2. Хроматограммы культуральных жидкостей (accq-tag метод): а) штамм *E. coli* 4 – 71 (разведение в 100 раз); б) смесь стандартов аминокислот по 1 мг/л каждой; в) смесь стандартов 16 аминокислот; з) спектры флюоресценции. 1 — аспаратат, 2 — серин, 3 — глутамат, 4 — глицин, 5 — глицин, 6 — NH₃, 7 — аргинин, 8 — треонин, 9 — аланин, 10 — пролин, 11 — тирозин, 12 — валин, 13 — метионин, 14 — лизин, 15 — изолейцин, 16 — лейцин, 17 — фенилаланин; 18 — гомосерин, 19 — ГАМК, 20 — α-аминомасляная кислота, 21 — орнитин, 22 — исследуемое соединение в культуральной жидкости

гену *ilvA*, и обладают способностью к продукции L-пролина [4]. Питательная среда для ферментации содержала 60 г/л глюкозы, 25 г/л сульфата аммония, 2 г/л КН₂РО₄, 1 г/л MgSO₄, 0,1 мг/мл тиамин и 25 г/л мела (рН 7,2). L-изолейцин добавляли в различных концентрациях. Глюкозу и мел стерилизовали раздельно. 2 мл питательной среды были помещены в пробирки и инокулированы одной петлей микроорганизма. Выращивание проводили при 30 °С в течение 3 дней с перемешиванием.

Результаты и их обсуждение

При работе с продуцентом пролина первичную оценку содержания аминокислот в культуральной жидкости проводили методом ТСХ. На одном из этапов разделения было обнаружено, что при добавлении избыточного количества изолейцина в ростовую среду продуцента пролина, нуждающегося в изолейцине,

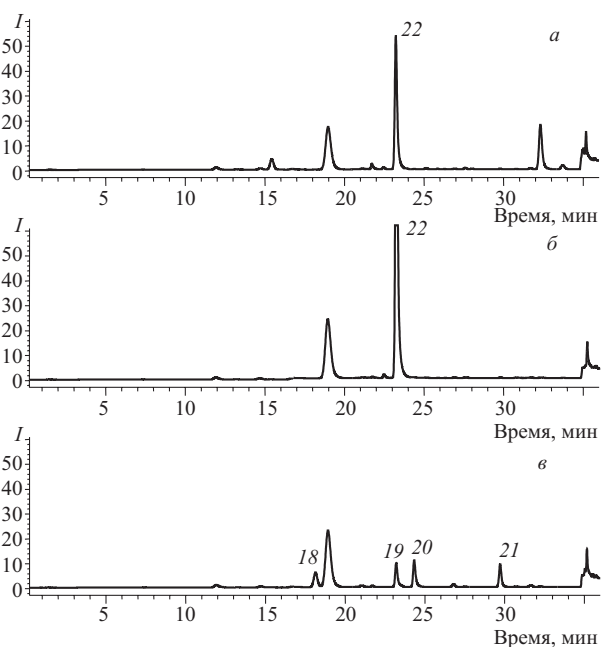


Рис. 3. Хроматограммы (accq-tag метод): а) культуральная жидкость штамма *E. coli* 702ilvA (разведение в 100 раз); б) образец, выделенный из культуральной жидкости штамма *E. coli* 702ilvA с помощью бумажной хроматографии; в) смесь стандартов аминокислот (по 1 мг/л каждой). 18 — гомосерин, 19 — ГАМК, 20 — α-аминомасляная кислота, 21 — орнитин, 22 — исследуемое соединение в культуральной жидкости

продукция пролина резко падала или вовсе отсутствовала, при этом происходило накопление другого соединения, которое после разделения с помощью ТСХ и проявления нингидрином давало темно-синее окрашивание (рис. 1). Таким образом, возникла необходимость идентифицировать это соединение.

Для этого образец, в котором, по данным ТСХ, содержалось исследуемое соединение, был проанализирован с помощью ОФВЭЖХ в системе для разделения аминокислот (accq-tag метод). Поскольку используемое оборудование давало возможность получить также и спектр флюоресценции производного 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидил карбамата с этим соединением, то по данным о времени удерживания и спектральным характеристикам можно было с большей долей вероятности говорить о том, что в культура-

Таблица 3
Количество L-пролина, L-глутаминовой кислоты и ГАМК, продуцируемое штаммами *E. coli* 702ilvA и 4-71 при разных концентрациях L-изолейцина в питательной среде

Штаммы <i>E. coli</i>	4 – 71		702ilvA	
L-изолейцин в исходной среде, мг/л	50	200	50	200
	Накопление продуктов, г/л			
L-пролин	13,1	3,5	8,2	0
L-глутаминовая кислота	2,4	0,3	0	0
ГАМК	0	6,1	0	7,0

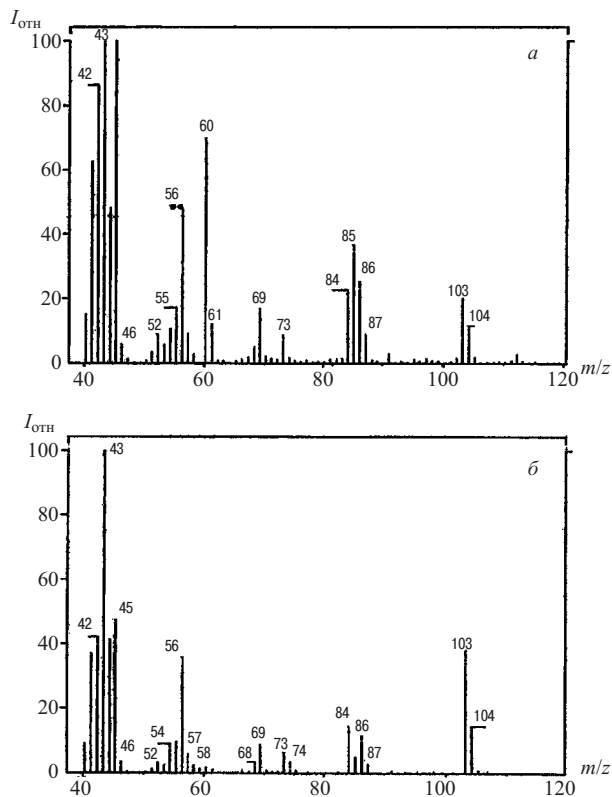


Рис. 4. Масс-спектры ЭУ: а) образец, выделенный из культуральной жидкости штамма *E. coli* 702ilvA; б) стандарт ГАМК

льной жидкости полученного штамма накапливается ГАМК (рис. 2).

Для подтверждения правильности идентификации ГАМК было проведен анализ с помощью методов ЯМР и масс-спектрометрии. Исследуемое соединение было выделено из культуральной жидкости с помощью препаративной бумажной хроматографии. После разделения компонентов исходного образца зона хроматограммы, содержащая исследуемое вещество, была элюирована водой и проверена с помощью метода асccq-tag. Как видно из рис. 3, выделенная зона в основном содержала исследуемое вещество и не содержала в существенных количествах посторонних соединений.

Масс-спектр электронного удара выделенного соединения был сопоставлен с масс-спектром ГАМК.

В масс-спектре ГАМК (табл.2) наблюдается интенсивный пик молекулярного иона (103), распад которого связан со ступенчатым отрывом из него H_2O , OH , NH_2CH_2 групп. Кроме того, в условиях масс-спектрометрирования ГАМК легко циклизуется с потерей воды в пирролидон-2, о чем свидетельствует соответствующий рост интенсивности пика иона 85 по мере нагрева образца.

Как показано на рис. 4, масс-спектр ЭУ выделенного образца практически совпадает с масс-спектром ГАМК. Наблюдающиеся в нем пики имеют те же массовые числа и относительные интенсивности, в процессе съемки при нагревании образца также растет интенсивность пика 85 $[M-H_2O]^+$. Кроме того в

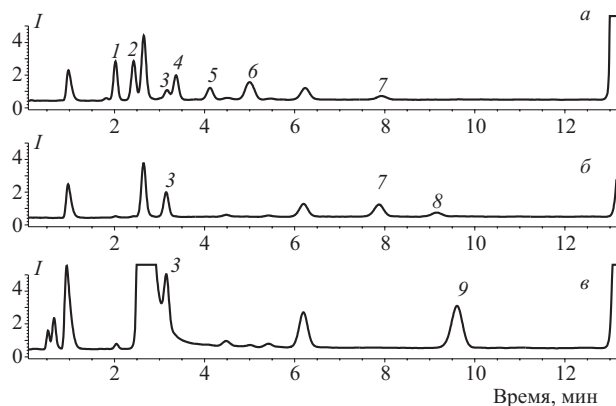


Рис. 5. Разделение смеси аминокислот на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 ($t = 42\text{ }^\circ\text{C}$): а) 1 — серин, 2 — глицин + аспарагиновая кислота, 3 — глутаминовая кислота, 4 — гистидин, 5 — треонин, 6 — аргинин + аланин, б) 7 — пролин, 8 — ГАМК, в) 9- α -аминомасляная кислота

масс-спектре выделенного образца наблюдаются пики, очевидно, принадлежащие спектру уксусной кислоты: 60 $[M]^+$, 45 $[M-CH_3]^+$, 43 $[M-OH]^+$. Присутствие последней объясняется наличием этого компонента в подвижной фазе, попадающей в образец на этапе очистки методом бумажной хроматографии.

В спектре ЯМР 1H выделенного образца наблюдаются 4 основных сигнала: 2 триплета примерно равной интенсивности (принятой за 2 протонных единицы, п.е.) при δ 2,87 и 2,16, и перекрывающиеся между собой квинтет при δ 1,75 и синглет при δ 1,78. На основании приведенных спектральных данных и с учетом метода получения и выделения образцов, 2 триплета и квинтет были отнесены к 3-м группам метиленовых протонов ($-CH_2CH_2CH_2-$) ГАМК, а синглет — к протонам группы CH_3 уксусной кислоты (или ее соли), присутствующей в виде примеси в количестве 0,7–0,9 моль на моль ГАМК. Дополнительно был получен спектр смеси образца со стандартом ГАМК. В спектре этой смеси новых сигналов не было обнаружено, а интенсивности 2-х триплетов и квинтета выросли по сравнению с интенсивностью синглета. Это однозначно доказывает изначальное присутствие ГАМК в образце и подтверждает правильность предложенного отнесения сигналов. Помимо указанных выше основных сигналов в спектре ЯМР 1H образца в области δ 3,0–4,0 были обнаружены малоинтенсивные сигналы ряда неидентифицированных примесей, молярная доля каждой из которых не превышала 3–4 %.

Таким образом, с помощью масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР было однозначно доказано наличие ГАМК в культуральной жидкости изучаемых штаммов микроорганизмов.

В дальнейшем был проведен анализ штаммов, способных продуцировать пролин, на предмет накопления ГАМК в культуральной жидкости при разных исходных концентрациях изолейцина. Для этого была разработана методика на базе метода асccq-tag для

ускоренного анализа образцов на содержание пролина и ГАМК. При использовании традиционного метода assq-tag для проведения анализа содержания ГАМК требуется не менее 40 минут. Liu H. с соавторами [17] предложили условия, в которых измерение концентрации ГАМК проводят в течение 33 мин.

Для сокращения времени анализа нами были изменены условия хроматографирования, а именно: была использована более короткая колонка — 2,1 × 50mm (Zorbax Eclipse XDB-C18), вместо концентрата А (Waters) в качестве буфера был использован 10 мМ раствор CH₃COONH₄ (рН 4,5). Эти условия позволили получить более качественное разделение пролина и ГАМК. В [17] было также исследовано влияние рН и температуры на удерживание ГАМК. Аппроксимируя опубликованные в этой работе данные, мы выбрали более низкий рН — 4,5 вместо 4,8. Однако в выбранных условиях при температуре 25 °С не разделялись ГАМК и α-аминомасляная кислота. Нагревание колонки до 42 °С позволило разделить эти соединения, не ухудшив разделение ГАМК и пролина (рис. 5). Таким образом были выбраны условия, позволяющие проводить анализ ГАМК за 20 мин. Кроме того, по полученным спектрам флюоресценции производных аминокислот было показано, что фиксирование сигнала при 395 нм позволяет анализировать пролин, а наибольшая чувствительность по ГАМК достигается на длине волны испускания — 470 нм (рис. 6, а, б). Ми-

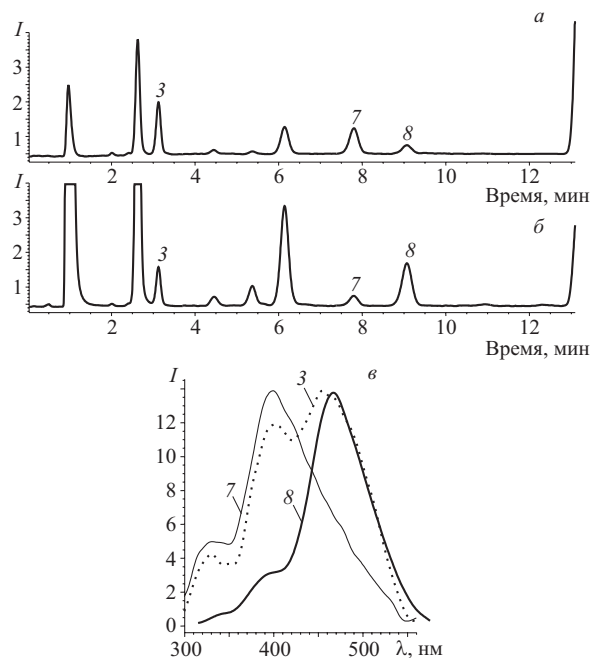


Рис. 6. Разделение смеси аминокислот на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 ($t = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$) при длине волны испускания: а) 395 нм; б) 470 нм; в) спектр флюоресценции. 3 — глутаминовая кислота, 7 — пролин, 8 — ГАМК

нимально определяемая концентрация ГАМК в этом случае составила 0,2 мг/л. Калибровочная зависи-

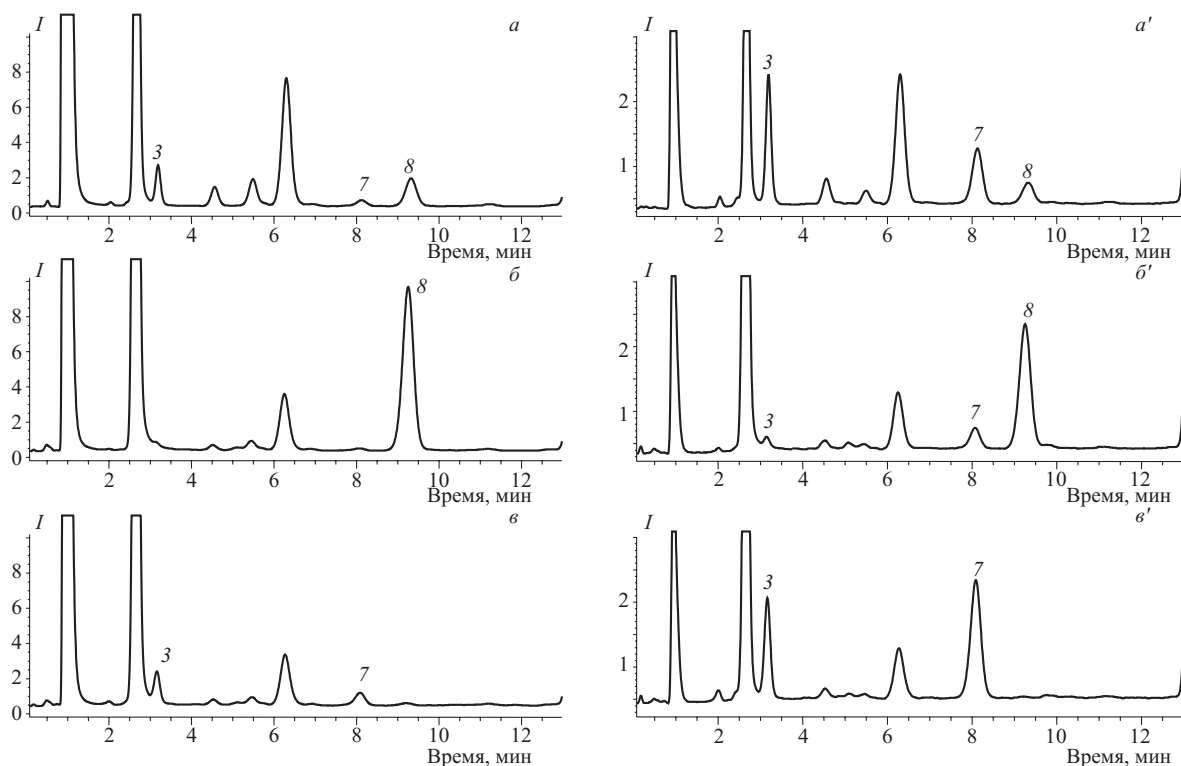


Рис. 7. Хроматограммы культуральных жидкостей, полученных на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 ($t = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$). а – а') смесь стандартов аминокислот (глутаминовая кислота 5 мг/л, пролин 4 мг/л, ГАМК 1 мг/л); б – б') штамм *E. coli* 4 – 71 с добавлением 200 μг изолейцина в ростовую среду (разведение в 1000 раз); в – в') штамм *E. coli* 4 – 71 с добавлением 50 μг изолейцина в ростовую среду (разведение в 1000 раз). Детектирование при длине волны испускания 470 нм (а, б, в) и 395 нм (а', б', в'). 3 — глутаминовая кислота, 7 — пролин, 8 — ГАМК

мость носила линейный характер в диапазоне рабочих концентраций 0,5 – 10 мг/л.

На рис. 7 и в табл. 3 на примере штаммов *E. coli*, дефицитных по гену *ilvA*, показано, что при добавлении изолейцина в концентрации 200 μ у них проявляется способность к накоплению ГАМК. Разница в уровнях накопления пролина, глутаминовой кислоты и ГАМК у штаммов 4 – 71 и 702*ilvA* связана с различными мутациями в гене *proB** — ключевом гене биосинтеза пролина, кодирующим глутамилкиназу.

Таким образом было установлено, что ауксотрофные по L-изолейцину бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, могут продуцировать ГАМК.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. Garmaise, *Canad. J. Chem.*, **34**, 742 – 748 (1956).
2. Патент РФ № 2143002; *Бюл. изобрет.*, № 35 (1999).
3. Е. М. Губарев, *Биохимия*, **25**(2), 261 – 263 (1960).
4. Патентная заявка РФ № 2002116774; *Бюл. изобрет.*, № 5 (2004).
5. M. J. Mahan, J. M. Schlauch, J. J. Mekalanos, *Environmental regulation of virulence gene expression in Escherichia, Salmonella and Shigella spp.* In: *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and molecular biology*, 2nd edn., F. C. Neidhart, (ed.). American Society for Microbiology Press, Washington, DC (1996), pp. 2803 – 2815.
6. S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein, *Anal. Biochem.*, **30**, 1185 – 1191 (1958).
7. T. Abe, Y. Kurozumi, W. Yao, et al., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **712**(1 – 2), 43 – 49 (1998).
8. A. M. Swensen, J. Golowasch, A. E. Christie, et al., *J. Exp. Biol.*, **203**, 2075 – 2092 (2000).
9. D. W. Richter, P. Schmidt-Garcon, O. Pierrefiche, et al., *J. Physiol.*, **514**, 567 – 578 (1999).
10. Y. Qu, L. Arckens, E. Vandenbussche, et al., *J. Chromatogr. A*, **798**(1 – 2), 19 – 26 (1998).
11. J. Kehr, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **708**(1 – 2), 49 – 54 (1998).
12. T. P. Piepponen, A. Skujins, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **757**(2), 277 – 283 (2001).
13. L. Bianchi, L. Della Corte and K. F. Tipton, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **723**(1 – 2), 47 – 59 (1999).
14. A. Melani, L. Pantoni, C. Corsi, et al., *Stroke*, **30**(11), 2448 – 2454 (1999).
15. W. M. Blaszczyk, H. Straub, C. Distler, *Neuroreport*, **15**(7), 1141 – 1144 (2004).
16. J. Garduno, S. Elenes, J. Cebada, et al., *J. Neurosci.*, **22**(21), 9176 – 9184 (2002).
17. H. Liu, M. C. Sanuda-Pena, J. D. Harvey-White, et al., *J. Chromatogr. A*, **828**, 383 – 395 (1998).
18. Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиотт, К. Джонс, *Справочник биохимика*, Мир, Москва (1991), сс. 388 – 390.
19. *Waters accq-tag chemistry package. Instruction manual. Millipore Corporation (1993)*, pp. 1 – 9.

Поступила 04.11.04

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF γ -AMINOBUTIRIC ACID IN CULTURE MEDIUM OF GABA- PRODUCING STRAINS

A. E. Novikova^{1*}, O. S. Anisimova², K. F. Turchin², S. A. Fomina¹, M. G. Lunts¹, E. V. Degterev²

¹ Closed Joint Stock Company “Ajinomoto-Genetika Research Institute”, Moscow, Russia,

* e-mail: anovikova_agri@yahoo.com;

² Federal State Unitary Concern “Centre of Chemistry of Drugs – All-Russian Research Chemical-Pharmaceutical Institute”, Moscow, Russia

The new modification of accq-tag-HPLC method for the rapid analysis of L-proline and GABA in culture medium is presented. We have shown the influence of the concentration of L-isoleucine added to culture medium on GABA accumulation. Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the culture broth of *E. coli* strains is proved using mass-spectroscopy and NMR methods.