

На правах рукописи



НОВИКОВА АННА ЕВГЕНЬЕВНА

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И АНАЛИЗА
АМИНИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССАХ**

Специальность 05.11.11 – хроматография и хроматографические приборы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2008

Работа выполнена в Институте физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук и
в лаборатории № 5 Закрытого акционерного общества «Научно-
исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»)

Научный руководитель: доктор химических наук
Буряк Алексей Константинович

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Ларин Александр Васильевич
ИФХЭ РАН

кандидат химических наук
Назимов Игорь Владимирович
ИБХ РАН

Ведущая организация: Химический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита состоится « **19** » **февраля 2008** года в **14 час 00 мин**
на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
Д 002.259.04 при Институте физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук по адресу:
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 31, корп. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физической
химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук.

Автореферат размещен на сайте Института: <http://phyche.ac.ru>

Отзывы на автореферат (заверенные печатью) просим выслать по адресу:
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, д.31, корп. 4, ИФХЭ РАН
ученому секретарю Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
Д 002.259.04

Автореферат разослан « _____ » января 2008 года.

Ученый секретарь Совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций

кандидат химических наук

Л.Н. Коломиец

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биотехнологический процесс является основным способом получения многих биологически активных веществ, химический синтез которых сложен или экономически невыгоден. В частности, микробиологический способ получения аминокислот, которые играют большую роль в здравоохранении, животноводстве и пищевой промышленности, отличается существенными преимуществами, так как позволяет синтезировать аминокислоты L-формы из относительно дешевых источников углерода. Аминокислоты секретируются в среду штаммами-продуцентами, способными к эффективному биосинтезу основного продукта в результате генетического конструирования. В процессе микробиологического синтеза целевой аминокислоты могут накапливаться сопутствующие аминированные метаболиты, образующиеся как в процессе биосинтеза, так и при деградации основного продукта. Поэтому, на всех этапах биотехнологического процесса необходим аналитический контроль этих соединений.

В процессе разработки и оптимизации биотехнологического процесса необходимо контролировать не только количество целевого компонента и его известных метаболитов, но и отслеживать появление новых, не всегда предсказуемых примесей. Кроме того, аналитический контроль необходим и в процессе генетического конструирования штаммов-продуцентов для получения информации об изменении активностей ферментов, участвующих в биосинтезе целевого продукта.

Биотехнологические образцы, в частности культуральные жидкости (КЖ) штаммов-продуцентов, являются сложными смесями, содержащими компоненты исходной питательной среды, клетки микроорганизмов, продукты биосинтеза. Поэтому, при работе с реальными биологическими образцами целесообразно использовать комплексный подход, сочетающий высокоэффективные методы разделения, идентификации и количественного анализа соединений.

Используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), можно провести идентификацию соединений только по времени удерживания, что может быть недостаточным в случае неразделенных хроматографических

пиков. Дополнительную информацию могут дать спектры поглощения и флуоресценции, и, безусловно, надежность идентификации повышается при использовании масс-спектрометра (МС). Однако, для анализа с использованием масс-спектрометрического детектора существует ряд ограничений по составу подвижной фазы. Традиционно используемые в ВЭЖХ подвижные фазы, содержащие фосфатные буферы, растворы солей высокой концентрации (50 – 100 мМ) не рекомендуется использовать при работе с МС, так как это может быть причиной подавления ионизации аналитов. При этом условия хроматографирования должны обеспечивать полное разделение соединений, имеющих одинаковую молекулярную массу, и, вместе с тем, быть совместимыми с МС.

Таким образом, актуальной является разработка комплекса высокоэффективных аналитических методов, необходимых на этапе генетического конструирования штаммов-продуцентов, а также при оптимизации условий биосинтеза целевого продукта.

Цель и задачи исследований: Целью диссертационной работы являлась разработка комплекса инструментальных методов идентификации аминосоединений с использованием ВЭЖХ, ВЭЖХ/МС и высокоэффективного капиллярного электрофореза (КЭ) для исследований биотехнологических образцов, таких как КЖ бактериальных штаммов и реакционные смеси изучаемых ферментных препаратов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить влияние состава подвижной фазы на разделение N-[(6-хинолиниламино)карбонил]-производных (ХАК) аминокислот и полиаминов в условиях обращенно-фазового режима ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ);
- исследовать влияние параметров источника ионизации на интенсивность и соотношение сигналов ионов в масс-спектре ХАК-производных аминокислот и полиаминов;
- на основе проведенных исследований выбрать оптимальные условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования ХАК-производных биогенных полиаминов и аминокислот, в том числе структурных изомеров;

- с помощью метода КЭ исследовать влияние состава компонентов буфера на разделение анионов дикарбоновых и N-замещенных аминокислот и выбрать условия для определения этих соединений.

Научная новизна:

1. Исследовано влияние рН и концентрации буферного раствора на удерживание ХАК-производных аминокислот и полиаминов в зависимости от структуры соединений при разделении их в режиме ОФ-ВЭЖХ.
2. Показано влияние параметров источника ионизации: напряжения на капилляре, напряжения на конусе, напряжения на экстракторе – на интенсивность и соотношение сигналов наблюдаемых ионов в масс-спектрах ХАК-производных аминокислот и полиаминов.
3. В КЖ исследуемых штаммов, продуцирующих аминокислоты, впервые идентифицированы примеси гомоизолейцина и димера валина в виде ХАК-производных с помощью ВЭЖХ/МС.
4. Предложены условия анализа для определения с помощью метода КЭ продуктов ферментативных реакций, катализируемых путресцинтранс-аминазой, N-ацетилглутаматсинтазой, глутамат-N-ацетилтрансферазой, аргининосукцинатсинтетазой, карбамоилфосфатсинтетазой, гомосеринкиназой.

Практическая значимость работы: Разработанные ВЭЖХ и ВЭЖХ/МС методы были использованы для идентификации и анализа аминосоединений, в том числе непротеиногенных аминокислот, и полиаминов в КЖ различных штаммов-продуцентов. Полученные сведения о накоплении сопутствующих аминированных метаболитов способствуют пониманию путей биосинтеза этих соединений в генетически модифицированных микроорганизмах и позволяют снизить уровень накопления этих примесей. На основе полученных данных о накоплении полиаминов могут быть сделаны выводы об активации путей деградации соответствующих аминокислот, в том числе основного продукта, что позволяет оптимизировать процесс ферментации или селекции соответствующих штаммов-продуцентов.

Особое значение методы разделения имеют при подтверждении новых способов получения биологически активных соединений. Так, при использовании предложенных методов ВЭЖХ/МС и ВЭЖХ была подтверждена возможность получения 4-гидроксиизолейцина с помощью ферментативного

синтеза, а также γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), норвалина и/или норлейцина с помощью бактериальных штаммов, способных к сверхсинтезу этих соединений. Способы получения данных аминокислот защищены патентами РФ (патент № 2241036 и патентные заявки № 2004127011, № 2005127811) и могут стать основой их микробиологического производства.

Метод КЭ был использован для экспресс-анализа продуктов ферментативных реакций в реакционных смесях, что позволило получить информацию об изменении активностей ферментов в процессе селекции штаммов-продуцентов. Результаты вошли в патент РФ № 2264459.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Качественные закономерности влияния рН, концентраций ацетонитрила и буферного раствора на удерживание ХАК-производных аминокислот и полиаминов при разделении их в режиме ОФ-ВЭЖХ.
2. Результаты исследования закономерностей удерживания ХАК-производных аминокислот и полиаминов при разделении их на сорбентах разного типа с привитыми алкильными группами.
3. Результаты исследования влияния параметров источника ионизации МС на фрагментацию ХАК-производных аминокислот и полиаминов.
4. Результаты исследования влияния состава, концентрации и рН буферного электролита на время миграции анионов дикарбоновых и N-замещенных аминокислот при разделении с помощью метода КЭ.
5. Результаты идентификации и количественного определения примесей аминокислот и полиаминов в КЖ штаммов-продуцентов. Результаты анализа продуктов семи ферментативных реакций при исследовании активностей ферментов, участвующих в биосинтезе аминокислот.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на XII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2005), X Международной конференции «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии» (Москва, 2006), III международной конференции-школе «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии» (Звенигород, 2007), Всероссийском симпозиуме «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях» (Москва – Клязьма, 2007), научно-прикладном семинаре «Аналитические методы и приборы для

химического анализа» (Санкт-Петербург, 2007), II Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2007), XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 7 статей, 7 тезисов, 2 патента, поданы 2 заявки на патент (имеются положительные решения).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Материал изложен на 210 страницах машинописного текста, включает 95 рисунков и 28 таблиц. Библиография состоит из 198 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано обоснование темы, отражены актуальность исследований и практическая значимость.

1 глава. Обзор литературы

Проведен анализ работ, посвященных исследованиям аминокислот и биогенных аминов методами ВЭЖХ, ВЭЖХ/МС, КЭ. Рассмотрены методы получения производных разного типа. Проведен сравнительный анализ различных хроматографических методов разделения аминокислот. Анализ литературы позволил обосновать целесообразность использования комплекса высокоэффективных методов разделения для идентификации и анализа аминсоединений в биологических образцах. На основе анализа литературных данных выбрано основное направление исследований: использование ХАК-производных для идентификации и анализа аминсоединений в биотехнологических образцах методом ВЭЖХ и ВЭЖХ/МС, использование КЭ для анализа продуктов ферментативных реакций в реакционных смесях.

2 глава. Экспериментальная часть

В работе были использованы жидкостные хроматографы: Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, США) с градиентным насосом Quaternary Pump 1100, автоматическим инжектором Autosampler 1100, воздушным термостатом Column compartment 1100, флуориметрическим детектором Spectrofluorimeter 1100 с программным обеспечением для обработки хроматографических данных

ChemStation A.08.04 (Agilent Technologies, США); Alliance 2695 (Waters, США), оснащенный масс-спектрометрическим детектором Quattro-Micro (Waters-Micromass, США) с ионизацией при атмосферном давлении в режиме электроспрея (API-ES) и программным обеспечением для обработки хроматографических данных Masslynx 4.0 (Waters-Micromass, США).

Хроматографическое разделение проводили на стальных колонках: Nova-Pak C₁₈ 150 x 3.9 мм, 4 мкм (Waters, США), Synergi Hydro-RP 250 x 4.6 мм, 4 мкм (Phenomenex, США), Synergi MAX-RP 250 x 4.6 мм, 150 x 4.6 мм и 150 x 2 мм, 4 мкм (Phenomenex, США), LUNA C18(2) 150 x 4.6 мм и 150 x 2 мм, 3 мкм (Phenomenex, США), AQUA C18 150 x 4.6 мм, 3 мкм (Phenomenex, США), Zorbax Eclipse XDB-C18 50 x 2.1 мм, 5 мкм (Agilent Technology, США). Условия хроматографирования приведены в таблице 1.

Таблица 1. Условия хроматографического разделения.

Градиент №	Условия
1	100 % буферный раствор – 0 % ацетонитрил, через 0.5 мин 95 % буферный раствор – 5 % ацетонитрил, затем линейное увеличение ацетонитрила до 30 % за 59 мин, затем промывка колонки раствором 60 % ацетонитрил – 40 % вода и уравнивание на начальных условиях. Скорость подвижной фазы 0.4 мл/мин.
2	100 % буферный раствор – 0 % ацетонитрил, через 0.2 мин 95 % буферный раствор – 5 % ацетонитрил, затем линейное увеличение ацетонитрила до 30 % за 29 мин, затем промывка колонки раствором 60 % ацетонитрил – 40 % вода и уравнивание на начальных условиях. Скорость подвижной фазы 0.8 мл/мин
3	82 % буферный раствор – 18 % ацетонитрил в течение 30 мин, затем промывка колонки раствором 60 % ацетонитрил – 40 % вода и уравнивание на начальных условиях. Скорость подвижной фазы 0.2 мл/мин.
4	92 % буферный раствор – 8 % ацетонитрил, линейное увеличение ацетонитрила до 23 % за 35 мин, затем промывка колонки раствором 60 % ацетонитрил – 40 % вода и уравнивание на начальных условиях. Скорость подвижной фазы 0.3 мл/мин.
5	77 % буферный раствор – 23 % ацетонитрил, затем линейное увеличение ацетонитрила до 40 % за 30 мин, затем промывка колонки раствором 40 % ацетонитрил – 10 % вода – 50 % буферный раствор. Скорость подвижной фазы 0.4 мл/мин.

В работе использована установка капиллярного электрофореза Quanta 4000 (Waters, США) снабженная ультрафиолетовым детектором с фиксированной длиной волны 254 нм и программным обеспечением для обработки хроматографических данных Мультихром 2.0 для Windows (Амперсенд,

Россия). Разделение проводили в кварцевом капилляре с внутренним диаметром 75 мкм (Waters, США). Общая длина капилляра – 60 см, эффективная длина (до детектора) – 53 см. Использовали воздушное термостатирование капилляра и гидростатический ввод образцов.

Кислотность водных растворов контролировали с помощью рН-метра МР 225 (Mettler Toledo, Швейцария). В работе использовали центрифугу 5415D (Eppendorf, Германия) и ультразвуковую баню 2510E-DTH (Branson, США).

Для получения производных аминокислот и полиаминов реагент 1-[[[(6-хинолиниламино)карбонил]окси]-2,5-пирролидиндион готовили по стандартной методике растворением точной навески в ацетонитриле (3 мг/мл). ХАК-производные (рис. 1) готовили непосредственно перед проведением эксперимента по следующей методике: аликвоту модельной смеси или образца смешивали с раствором боратного буфера с рН 8.0 и добавляли раствор реагента (1 : 5 : 4). Реакцию проводили при температуре 55°C в течение 10 мин.

В качестве стандартных соединений были взяты аминокислоты (Sigma, США), биогенные полиамины (Aldrich, США). Растворы аминокислот и полиаминов готовили растворением соответствующего реактива в деионизованной воде и хранили при температуре –20°C. Растворы элюентов готовили непосредственно перед экспериментом.

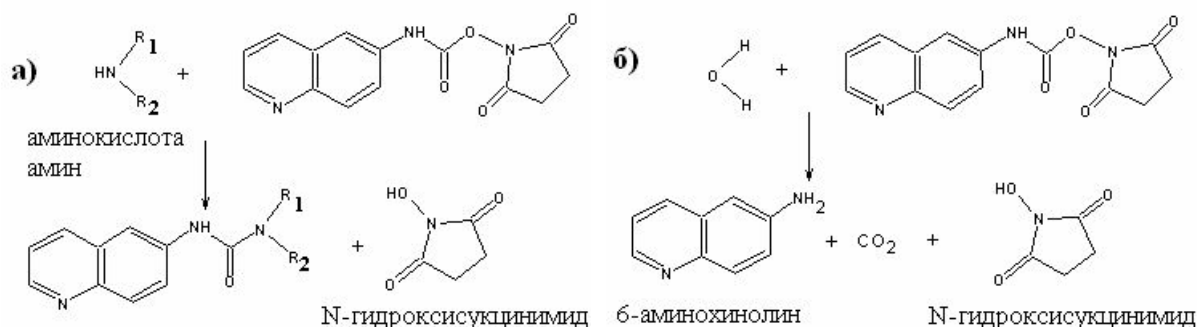


Рис. 1. Реакции, сопровождающие получение флуоресцирующих производных аминокислот по методу Assq-Tag: а) реакция образования производных первичных и вторичных аминов и аминокислот, б) реакция гидролиза избытка 1-[[[(6-хинолиниламино)карбонил]окси]-2,5-пирролидиндиона.

3 глава. Результаты и обсуждение.

Исследование влияния условий хроматографического разделения на удерживание ХАК-производных.

Известно, что разделение аминокислот и биогенных аминов, как правило, осуществляют с использованием процедуры получения производных,

характеризующихся большим удерживанием на обращенной фазе и содержащих группы, флуоресцирующие или поглощающие в ультрафиолетовой области спектра. Поэтому для работы нами был выбран метод, основанный на получении устойчивых ХАК-производных аминов и аминокислот с последующим разделением в режиме ОФ-ВЭЖХ. Для работы в качестве сорбентов были выбраны: Synergi Hydro-RP, MAX-RP, LUNA C18(2), AQUA C18, Zorbax Eclipse XDB-C18. В качестве подвижной фазы использовали элюенты, содержащие совместимые с МС компоненты: ацетонитрил и ацетат аммония.

В результате исследования влияния органического модификатора на удерживание аналитов с использованием уравнения Скотта – Кучеры показано, что для ХАК-производных аминокислот характерно образование ассоциатов с ацетонитрилом. Из рассчитанных значений $\log P$ с помощью некоммерческой версии программы ACD/labs получено, что ХАК-производные аминокислот – вещества с резко различающейся полярностью. Поэтому, для работы с этими соединениями целесообразно использовать градиентное элюирование.

В результате сравнения колонок Synergi Hydro-RP, MAX-RP, LUNA C18(2) и AQUA C18 получено, что в условиях нейтрального pH усиление удерживания ХАК-производных основных соединений наблюдается на сорбентах AQUA C18 и MAX-RP. При сопоставлении в изократических условиях разрешающей способности исследуемых колонок согласно полученным расчетным данным основных хроматографических параметров (фактор удерживания, число теоретических тарелок, разрешение пиков) показано, что наибольшей эффективностью обладает колонка LUNA C18(2), которая была в дальнейшем использована для разделения ХАК-производных диастереомеров.

При исследовании зависимости удерживания ХАК-производных аминокислот и полиаминов от pH применяли градиентное элюирование. В результате проведенных исследований отмечены следующие закономерности:

- с увеличением pH с 3.5 до 7, увеличивалось время удерживания ХАК-производных аминокислот, содержащих основные функциональные группы, что, предположительно, связано с переходом производных этих соединений из катионной в цвиттер-ионную форму, а для лизина и орнитина – из катионной в анионную форму через цвиттер-ион;

- аналогичная зависимость наблюдалась для 6-аминохинолина, N-(6-хинолинил)-мочевины, а также для производных спермидина и путресцина, что, в свою очередь, связано с переходом этих соединений из катионной формы в нейтральную;
- для ХАК-производных дикарбоновых аминокислот и большей части аминокислот с неполярными заместителями наблюдалась обратная зависимость в том же диапазоне рН, что, вероятно, связано с переходом производных этих соединений из цвиттер-ионной формы в анионную;
- зависимость удерживания производного ГАМК от рН раствора имеет резко выраженный максимум. Предположительно, это связано с узкой зоной рН, при которой ГАМК существует в виде цвиттер-иона, что отличает эту аминокислоту от других исследованных соединений.

Для разделения ХАК-производных аминокислот и полиаминов предложено использовать буферный раствор с рН 6.8.

При исследовании влияния концентрации ацетата аммония в диапазоне 1 – 10 мМ (рН 6.8) показано, что для тех ХАК-производных аминокислот, которые находятся в виде ионов, удерживание увеличивается с увеличением концентрации соли, что объясняется эффектом «высаливания». В тоже время изменение концентрации буферного раствора не влияет на соединения в нейтральной форме, такие как 6-аминохинолин, N-(6-хинолинил)-мочевина, производные спермидина и путресцина. Иным образом ведет себя агматин. Для производного этого соединения наблюдается эффект «всаливания», что проявляется в уменьшении удерживания.

В результате проведенных исследований было также установлено, что ХАК-производные аминокислот подчиняются общим закономерностям удерживания в условиях ОФ-ВЭЖХ:

- время удерживания возрастает внутри гомологических рядов ХАК-производных с ростом числа атомов углерода в молекуле. Для высших членов гомологического ряда значения относительного изменения свободной энергии аддитивны по группам $-CH_2-$, при этом вклад одной метильной группы составляет 2.3 кДж/моль;
- для структурных изомеров при переходе от разветвленной к линейной конфигурации углеродной цепи удерживание увеличивается;

- при введении в молекулу полярных функциональных групп (-ОН, -NH₂), которые сильнее взаимодействуют с полярным элюентом, удерживание уменьшается;
- полученные в изократических условиях (18 % ацетонитрил – водный раствор ацетата аммония 10 мМ рН 6.8) на колонке Synergi Hydro-RP корреляции фактора удерживания ХАК-производных аминокислот с числом атомов углерода в молекуле и logP могут быть использованы для прогнозирования удерживания ХАК-производных других соединений со структурой, близкой к исследованному ряду веществ.

Исследование влияния параметров источника масс-спектрометра на ионизацию ХАК-производных.

В процессе работы с ХАК-производными аминокислот исследовано влияние параметров источника ионизации на масс-спектры анализируемых соединений. Для большинства ХАК-производных аминокислот основным сигналом в масс-спектре является молекулярный протонированный ион. Также наблюдается небольшой сигнал фрагментного иона с $m/z = 171$. Показано, что при уменьшении напряжения на конусе источника с 40 до 20 В и при уменьшении напряжения на экстракторе с 4 до 2 В увеличивается соотношение МН/171 (рис. 2). Изменение напряжения на капилляре в диапазоне 2 – 3 кВ и температуры 300 – 450⁰С несущественно влияло на соотношение МН/171. В связи с этим, для дальнейшей работы были выбраны следующие параметры источника: напряжение на конусе 20 В, напряжение на экстракторе 2 В, напряжение на капилляре 2 кВ, температура распыления 450⁰С.

Показано, что при ионизации в условиях положительного электроспрея и 20 В на конусе источника ионизации ХАК-производных основных аминокислот и полиаминов, кроме протонированного молекулярного иона образуются также двузарядные ионы. Как показано на рисунке 3, агматин дает двузарядный ион ($m/z = 151$), что может происходить вследствие протонирования гуанидиновой группы.

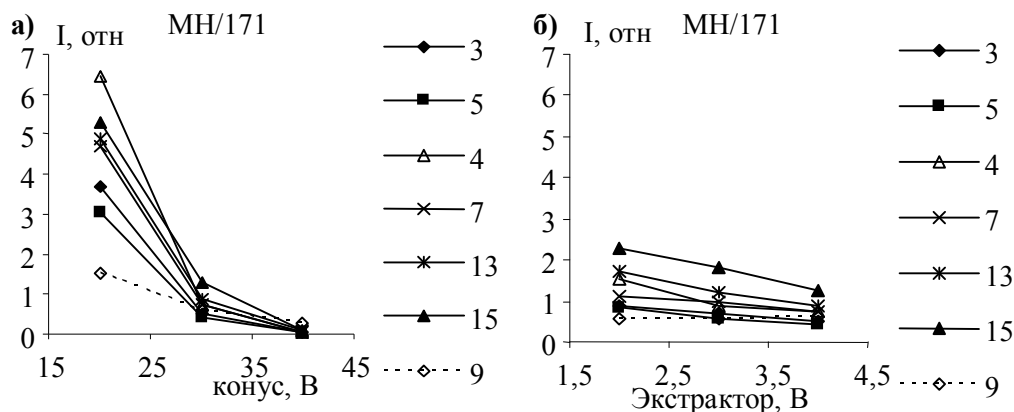


Рис. 2. Зависимость соотношения интенсивностей $[MH]^+/171$ ХАК-производных аминокислот от параметров источника ионизации: а) напряжение на конусе, б) напряжение на экстракторе. 3 – серин, 4 – глицин, 5 – треонин, 7 – аланин, 9 – аргинин, 13 – метионин, 15 – лейцин.

Аналогичный эффект наблюдается и в спектре аргинина ($m/z = 173$), при этом двузарядный ион не возникает в спектрах N-ацетил-замещенных производных орнитина. Двузарядные ионы образуются, вероятно, вследствие присутствия нескольких ХАК-заместителей в молекуле и регистрируются в спектрах ХАК-производных лизина ($m/z = 244$), спермидина ($m/z = 329$), путресцина ($m/z = 215$), орнитина ($m/z = 237$). Двузарядный ион зарегистрирован и в спектре гистидина ($m/z = 163$). Кроме того, в масс-спектрах производных основных аминокислот и полиаминов образуются следующие фрагменты: $[MH - 170]^+$ для лизина ($m/z = 317$), аргинина ($m/z = 175$), гистидина ($m/z = 156$), орнитина ($m/z = 303$) и агматина ($m/z = 131$), $[MH - 186 - 170]^+$ для спермидина ($m/z = 301$). В случае лизина и орнитина – ионы $m/z = 317$ и $m/z = 303$, вероятно, соответствуют ХАК-производным по одной из аминогрупп, образованным в источнике ионизации при отщеплении фрагмента 170. Ионы с $m/z = 175$, $m/z = 156$, $m/z = 116$, $m/z = 147$, $m/z = 131$ соответствуют протонированным молекулярным ионам исходных аминесоединений: аргинина, гистидина, пролина, лизина и агматина соответственно. Ионы протонированных молекул исходных соединений, образующихся в источнике ионизации, также регистрируются в спектрах ХАК-производных орнитина ($m/z = 133$) и путресцина ($m/z = 89$). При увеличении напряжения от 20 до 30 В наблюдается подавление сигнала двузарядных ионов при несущественном изменении интенсивности протонированных молекулярных ионов исследуемых соединений.

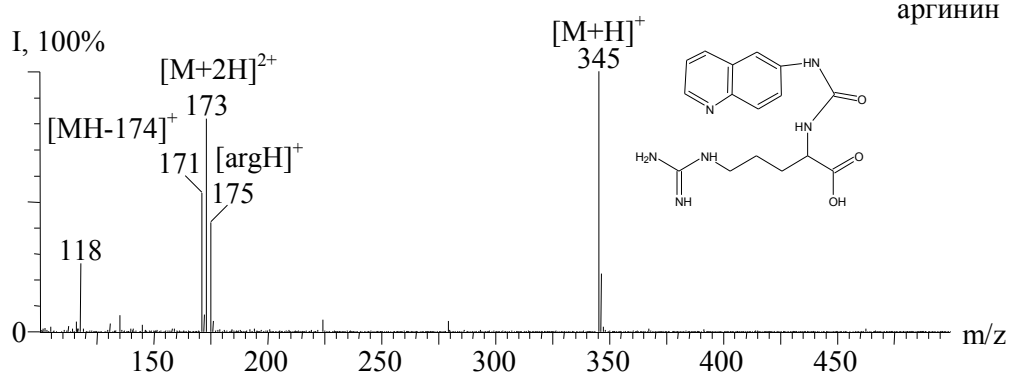
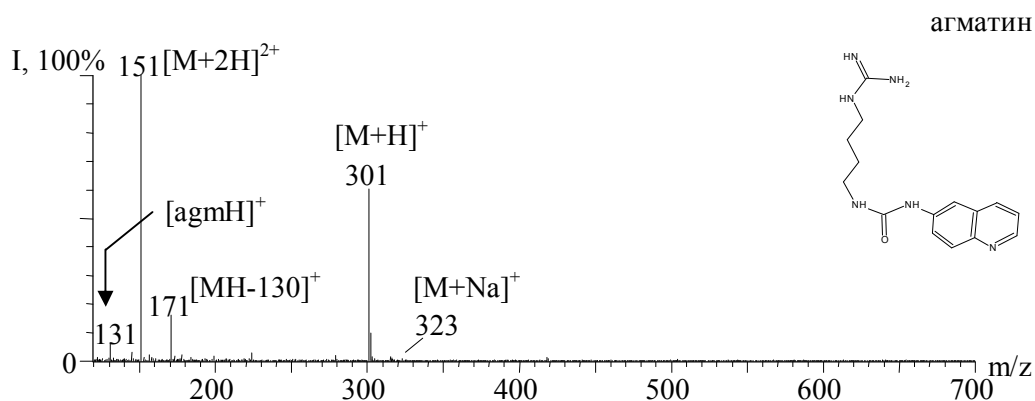
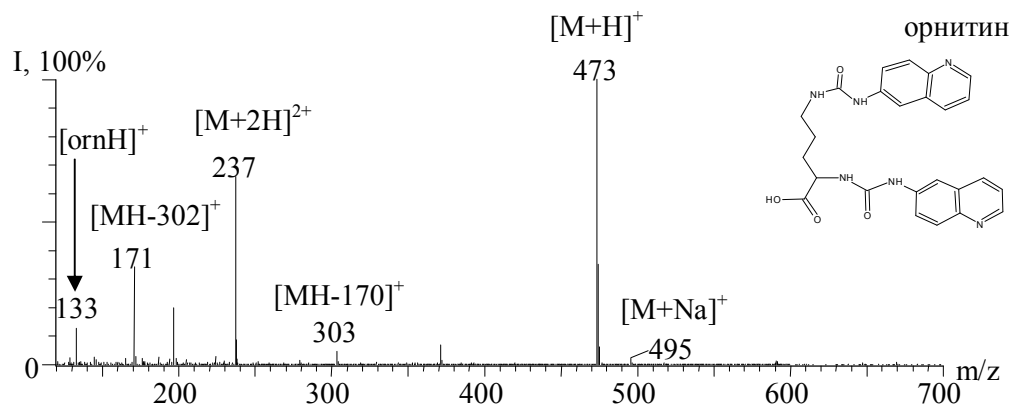


Рис. 3. Масс-спектры, полученные в максимуме хроматографического пика ХАК-производных полиаминов и аминокислот. Протонированные молекулярные ионы: $[\text{ornH}]^+$, $[\text{agmH}]^+$, $[\text{argH}]^+$ - орнитина, агматина и аргинина соответственно.

При значении 40 В отмечено 10-кратное падение интенсивности двузрядных и протонированных молекулярных ионов, а также существенное увеличение интенсивности дочернего иона $m/z = 171$. Поскольку этот фрагмент не является селективным и характерен для всех ХАК-производных аминокислот, сделан вывод, что дальнейшее увеличение напряжения на конусе источника нецелесообразно. Полученные данные показывают, что для

анализа ХАК-производных полиаминов напряжение на конусе должно быть не более 30 В.

Исследование влияния состава буферного электролита на скорость миграции дикарбоновых и N-замещенных аминокислот.

Известно, что анализ соединений, не поглощающих в области УФ, можно осуществлять с помощью метода КЭ в режиме непрямого детектирования. При разработке методики анализа смесей дикарбоновых и N-замещенных аминокислот выбран состав разделяющего буфера. Для этого проведено исследование влияния состава буферного электролита на скорость миграции и разделение аналитов (рис. 4).

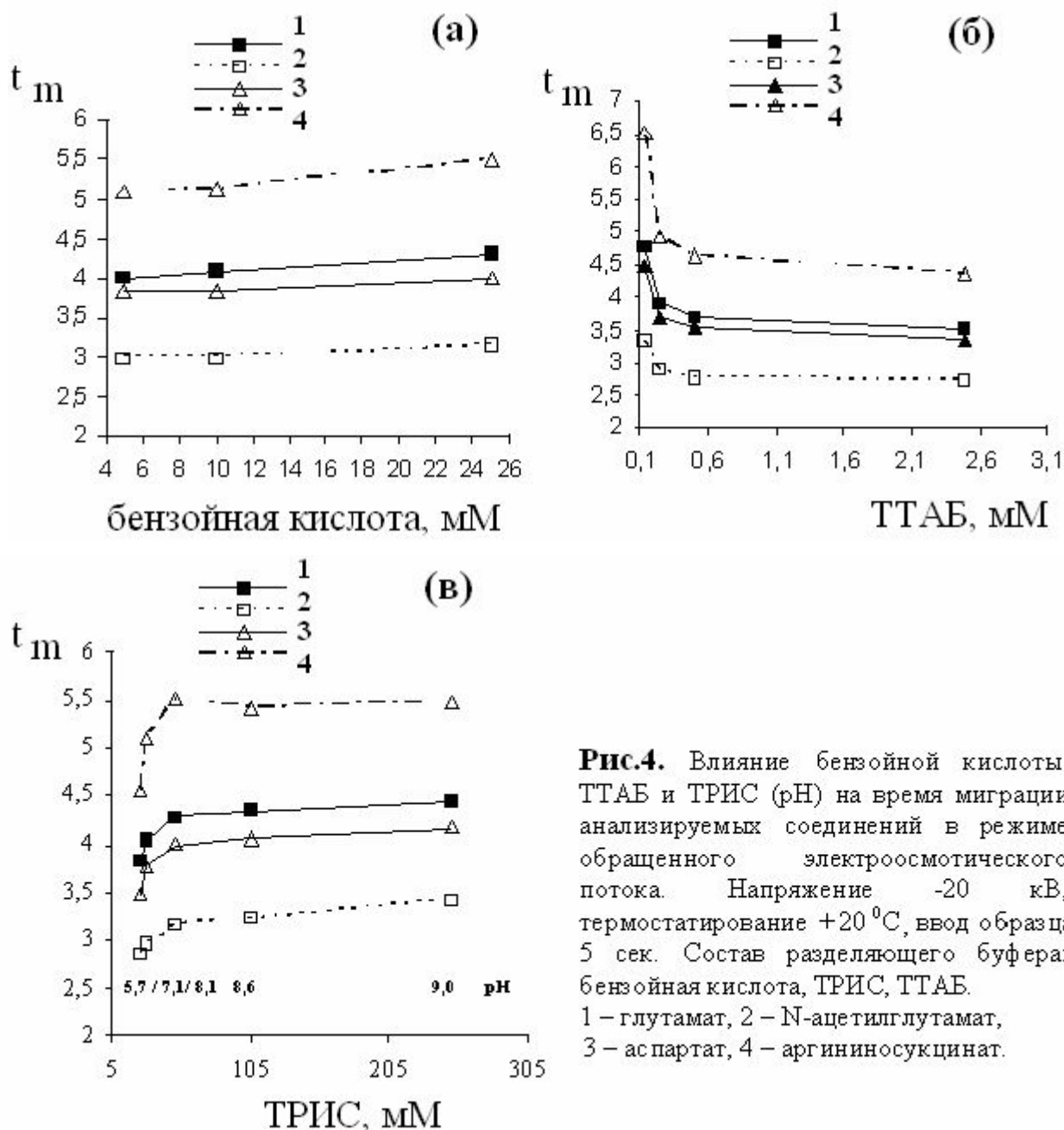


Рис.4. Влияние бензойной кислоты, ТТАБ и ТРИС (рН) на время миграции анализируемых соединений в режиме обращенного электроосмотического потока. Напряжение -20 кВ, термостатирование +20⁰С, ввод образца 5 сек. Состав разделяющего буфера: бензойная кислота, ТРИС, ТТАБ. 1 – глутамат, 2 – N-ацетилглутамат, 3 – аспарат, 4 – аргининосукцинат.

Показано, что увеличение модификатора электроосмотического потока – тетрадецилтриметиламмоний бромида (ТТАБ) уменьшает время миграции анализируемых соединений в диапазоне 0.1 – 0.6 мМ, а при более высоких концентрациях – не влияет, что может быть связано с установлением устойчивого двойного слоя ТТАБ на стенках капилляра. Увеличение концентрации бензойной кислоты приводит к увеличению времени миграции аналитов, что связано с уменьшением электроосмотического потока. Время миграции анионов возрастает с увеличением концентрации трис(гидроксиметил)метиламина (ТРИС) в диапазоне 25 – 50 мМ, сопровождающимся повышением рН 5.7 – 8.1, что также можно объяснить уменьшением электроосмотического потока.

В результате проведенных исследований для анализа дикарбоновых и N-замещенных аминокислот выбран разделительный буфер, содержащий 25 мМ бензойной кислоты, 0.25 мМ ТТАБ, 50 мМ ТРИС (рН 8.1).

4 глава. Применение разработанных методов.

Идентификация аминокислот и полиаминов в биотехнологических образцах.

Идентификация ГАМК. При работе с продуцентом пролина на одном из этапов селекции было обнаружено, что при изменении состава ростовой среды продукция пролина резко падала, при этом происходило накопление другого аминосоединения. На первом этапе исследования это соединение было выделено из КЖ с помощью препаративной бумажной хроматографии и идентифицировано как ГАМК с помощью методов масс-спектрометрии и ЯМР. На рисунке 5 представлена полученная методом ВЭЖХ/МС хроматограмма КЖ одного из исследуемых штаммов, подтверждающая его способность накапливать ГАМК, которая является нейромедиатором и применяется как лекарственное средство при сосудистых заболеваниях головного мозга. Следовательно, подтверждение способности исследованного штамма к сверхсинтезу этого соединения может иметь потенциальный интерес для микробиологического и фармацевтического производств. Полученные результаты вошли в патент РФ № 2241036.

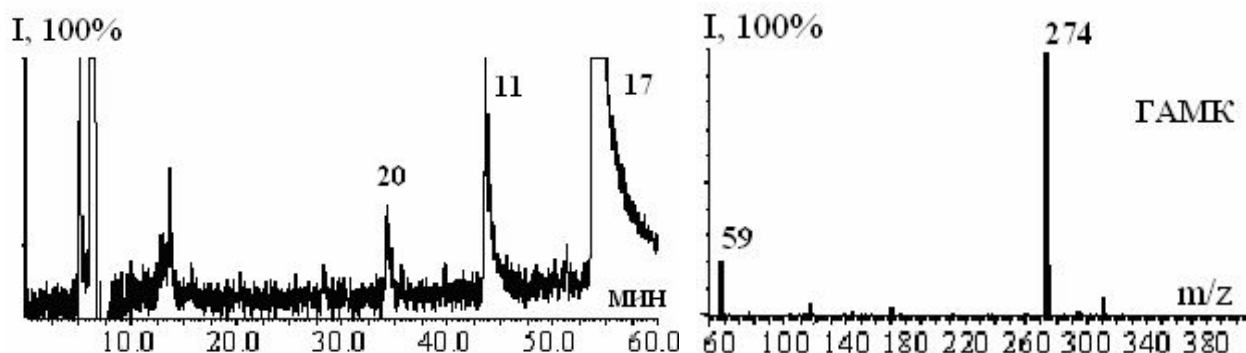


Рис. 5. Хроматограмма КЖ штамма *E.coli* (с добавлением 200 мг/л изолейцина в ростовую среду), зарегистрированная по полному ионному току и масс-спектр, полученный в максимуме хроматографического пика № 20. Для разделения была использована колонка Hydro-RP 250 x 4.6, 4 мкм, t 25°C, градиент № 1. 11 – NH_4^+ (N-(6-хинолинил)-мочевина), 17 – 6-аминохинолин, 20 – ГАМК.

Идентификация норвалина и норлейцина. Непротеиногенные аминокислоты, такие как как норвалин и норлейцин, которые используются для производства пищевых добавок, гомеопатических препаратов и других фармацевтических средств, можно получать с использованием бактериальных штаммов.

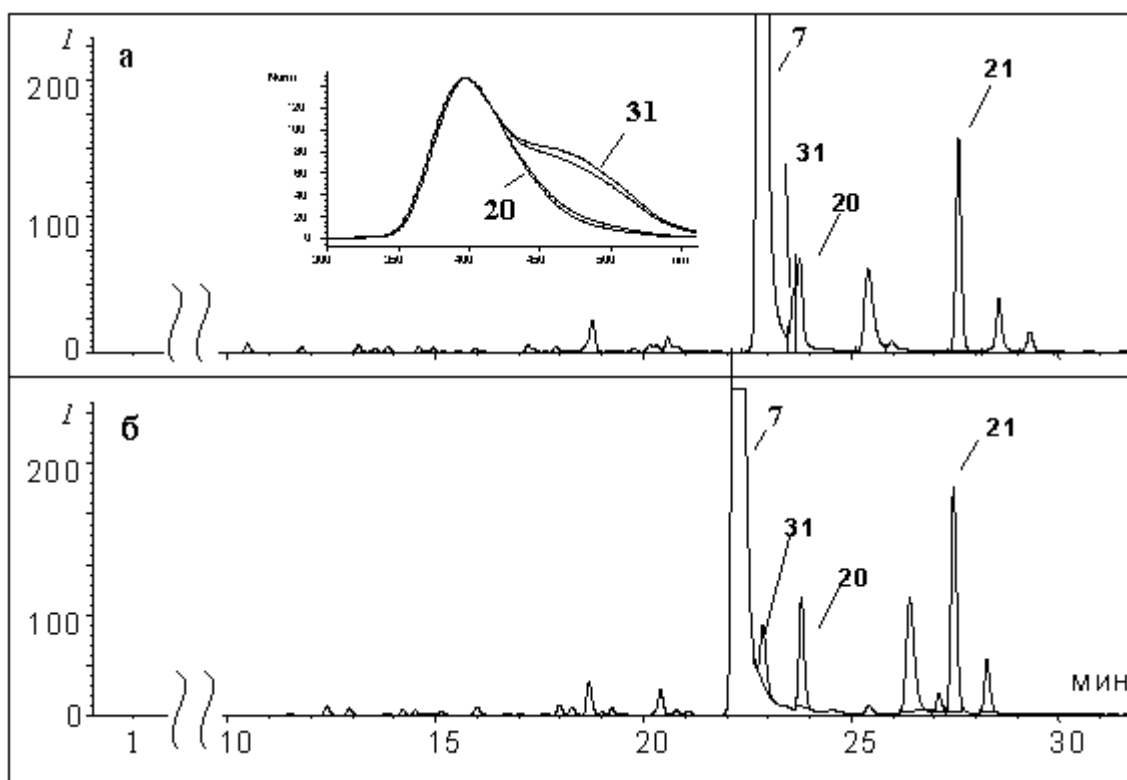


Рис. 6. Хроматограмма КЖ штамма *E. coli* B-7 $\Delta ilvBN\Delta ilvGM\Delta ilvIH$ при разделении на колонках (250 x 4.6; 4 мкм): а) MAX-RP (pH 6.4) и б) Hydro-RP (pH 5.8). Условия разделения: t 23°C, градиент № 2. 7 – NH_4^+ (N-(6-хинолинил)-мочевина), 20 – норвалин, 21 – норлейцин, 31 – неизвестный компонент.

Согласно результатам, полученным в главе 3, для определения норвалина и норлейцина можно было использовать колонку МАХ-РР и буферный раствор ацетата аммония с рН 6.4 или колонку Hydro-РР и буферный раствор рН с 5.8, применяя флуоресцентное детектирование. Однако, исследования показали, что в процессе анализа реальных образцов на колонке МАХ-РР неизвестный компонент № 31 (рис. 6а) не разделяется с норвалином, что подтверждают спектры флуоресценции. Поэтому целесообразно применение колонки Hydro-РР для анализа данных образцов (рис. 6б).

Масс-спектры, полученные в максимумах хроматографических пиков ХАК-производных, подтвердили накопление аминокислот норвалина и норлейцина в КЖ исследуемого штамма *E. coli*. Полученные результаты вошли в патентную заявку РФ № 2004127011.

Идентификация примеси гомоизолейцина. Известно, что бактериальные штаммы *E.coli*, продуцирующие лейцин, способны накапливать примеси гомолейцина. При исследовании КЖ этих штаммов показано, что наряду с гомолейцином может также образовываться и другая непротеиногенная аминокислота – гомоизолейцин. Для анализа накопления изомеров гомоизолейцина и гомолейцина, наряду с колонкой Hydro-РР, была использована колонка LUNA C18(2) 150 x 2 мм (рис. 7).

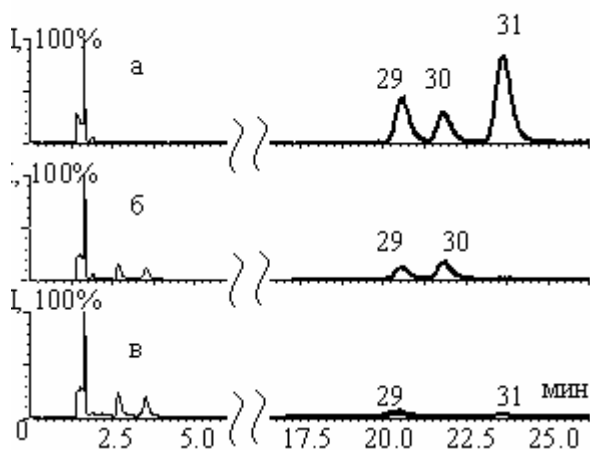


Рис. 7. Масс-хроматограммы КЖ бактериальных штаммов, зарегистрированные по соответствующим протонированным молекулярным ионам ХАК-производных с $m/z = 316$: а) модельная смесь, б) КЖ после инкубации с покоящимися клетками *E. coli* с добавлением рацемата 2-оксо-3-метилвалериановой кислоты в ростовую среду, в) КЖ после инкубации с покоящимися клетками *E. coli* (отрицательный контроль). Условия разделения: $t 25^{\circ}\text{C}$, градиент № 3. 29 и 30 – диастереомеры гомоизолейцина, 31 – гомоизолейцин.

Идентификация 4-гидроксиизолейцина. 4-гидроксиизолейцин – непротеиногенная аминокислота, обладающая инсулинотропным и противодиабетическим действием. Получение 4-гидроксиизолейцина *in vitro*

возможно посредством сопряжения ферментативных активностей альдозазы и аминотрансферазы из ацетальдегида, α -кетобутирата и глутамата. На рисунке 8 приведены хроматограммы ХАК-производных изомеров 4-гидроксиизолейцина, образовавшихся в результате сопряженных ферментативных реакций. Для разделения использована колонка LUNA C18(2) 150 x 2 мм. Полученные результаты вошли в патентную заявку РФ № 2005127811.

С помощью предложенного метода ВЭЖХ/МС в КЖ различных штаммов также были идентифицированы: о-, м-, п-изомеры гидроксифенилаланина и димер валина.

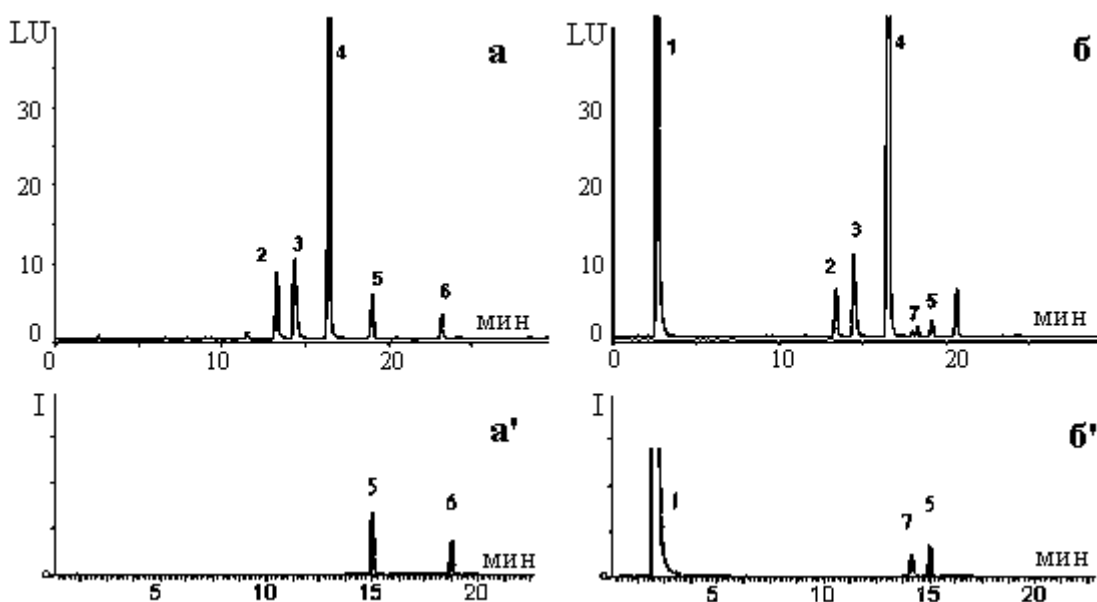


Рис. 8. Хроматограммы реакционных смесей сопряженных ферментативных реакций. а-б) Хроматограммы, полученные с помощью флуориметра. а'-б') Масс-хроматограммы продуктов по соответствующим протонированным молекулярным ионам ХАК-производных $m/z = 318$. а-а') модельная смесь, б-б') образец реакционной смеси сопряженных реакций. Условия разделения: t 25°C, градиент № 4. 1 – глутамат, 2 – N-(6-хинолинил)-мочевина, 3 – 6-аминохинолин, 4 – 2-аминомасляная кислота, 5 – 7 – изомеры 4-гидроксиизолейцина.

Идентификация примеси путресцина. Известно, что в клетках микроорганизмов биогенные полиамины (агматин, путресцин, спермидин) образуются в результате декарбоксилирования основных аминокислот. Присутствие этих соединений в КЖ свидетельствует об активации путей деградации соответствующих аминокислот. При исследовании КЖ штаммов *E.coli*, продуцирующих аргинин, показано, что наряду с его предшественником – орнитином, происходит накопление путресцина (рис. 9).

Для разделения использована колонка Synergi Hydro-RP 250 x 4.6 мм (обоснование выбора условий дано в главе 3).

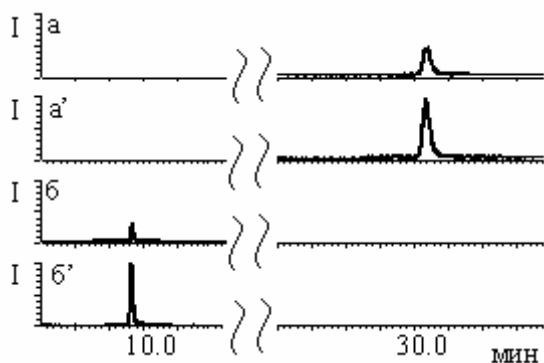


Рис. 9. Масс-хроматограммы, зарегистрированные по соответствующим протонированным молекулярным ионам ХАК-производных в образце КЖ штамма, продуцирующего аргинин: а) $m/z = 429$, б) $m/z = 473$ и модельной смеси: а') путресцин $m/z = 429$, б') орнитин $m/z = 473$. Условия разделения: $t = 25^\circ\text{C}$, градиент № 5.

Применение КЭ для анализа дикарбоновых и N-замещенных аминокислот, как продуктов ферментативных реакций в реакционных смесях.

Анализ глутаминовой кислоты. В процессе изучения путресцинтрансаминазы, участвующей в процессе деградации путресцина и биосинтеза ГАМК в клетках *E.coli*, необходима оценка активности этого фермента в разных штаммах. Как следует из схемы реакции (путресцин + 2-оксоглутарат = 4-аминобутаналь + глутамат) измерение ферментативной активности можно проводить по накоплению глутаминовой кислоты.

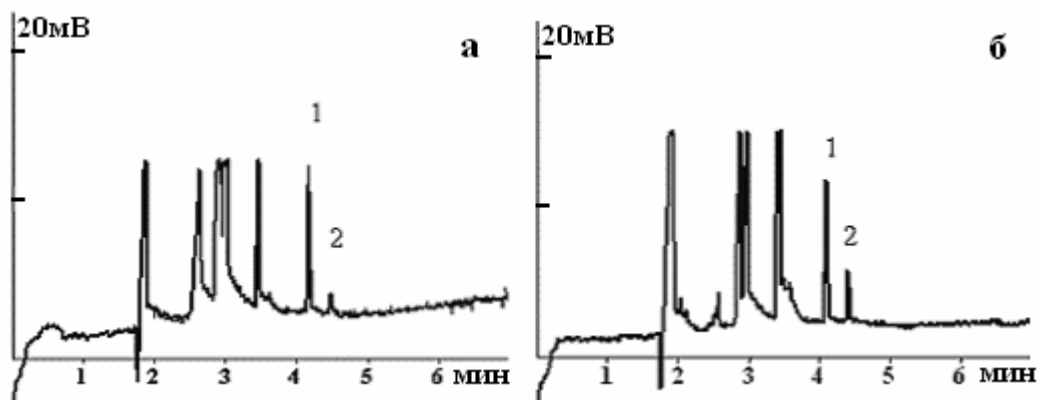
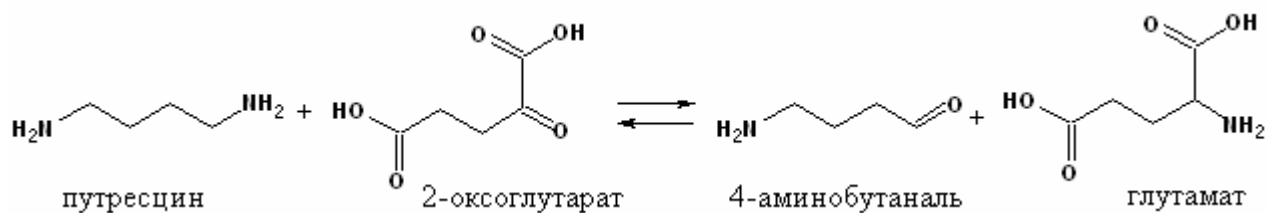


Рис. 10. Электрофореграммы реакционных смесей после инкубирования ферментного препарата для измерения активности путресцинтрансаминазы: а) 0 мин; б) 3 ч. Напряжение – 20 кВ, термостатирование $+20^\circ\text{C}$, ввод образца 5 сек. 1 – аспарат (добавлен в качестве внутреннего стандарта), 2 – глутамат.

Как видно из электрофореграмм, представленных на рисунке 10, в реакционной смеси в процессе инкубирования фермента наблюдается накопление глутамата.

Анализ аргининоянтарной кислоты. При работе со штаммом *E.coli*, продуцирующим аргинин, одним из этапов оптимизации направления работы являлась оценка активности аргининосукцинат-синтетазы. Активность этого фермента (цитруллин + аспартат + АТФ = АМФ + ФФ_н + аргининосукцинат) оценивали по количеству образовавшейся аргининоянтарной кислоты. Как показано на рисунке 11 (а, б), накопление аргининосукцината происходит в результате инкубирования ферментного препарата штамма *E.coli* В-2525/pUC-argG, содержащего плазмиду с клонированным геном argG.

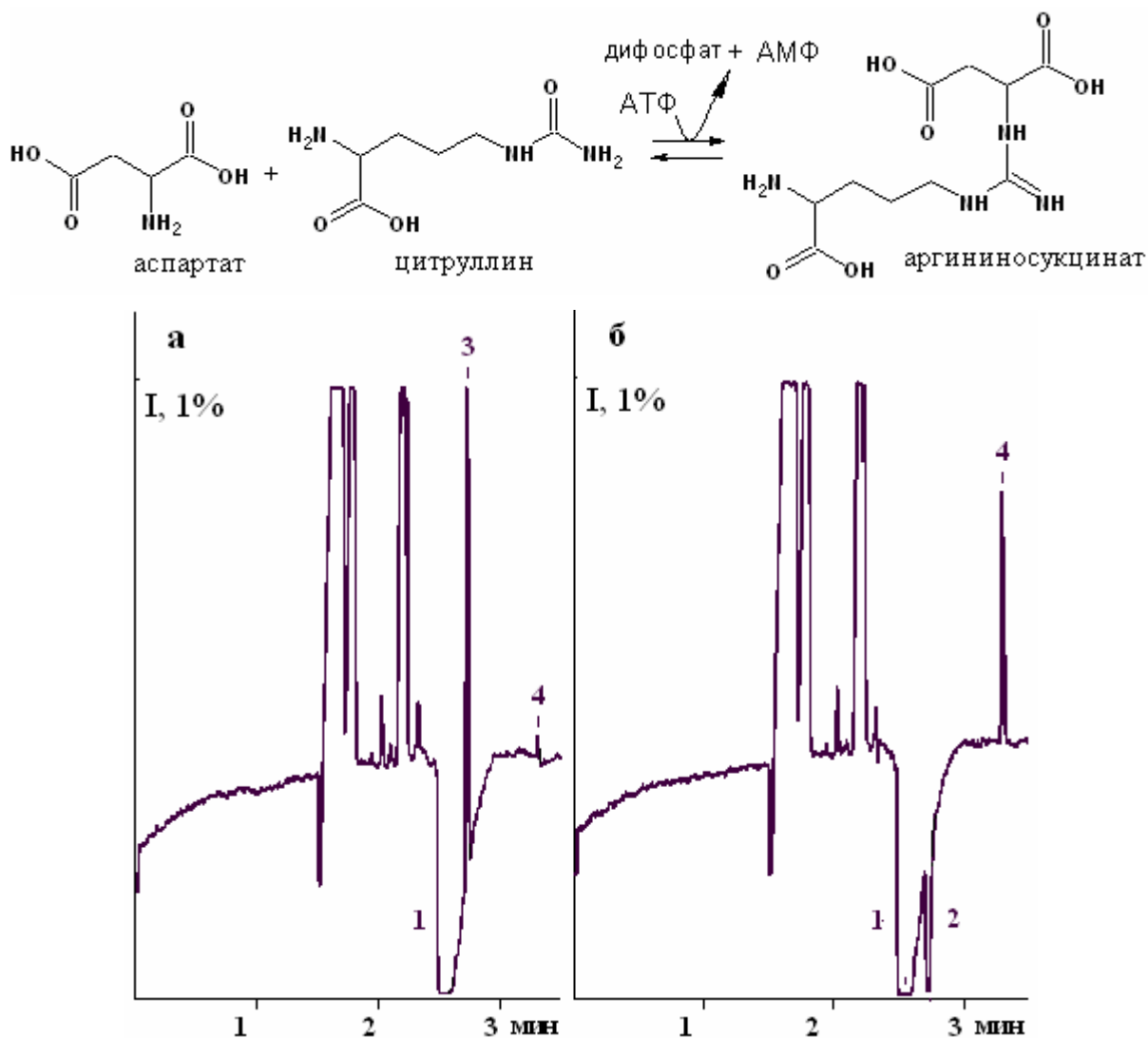


Рис. 11. Электрофореграммы реакционных смесей после инкубирования бесклеточных экстрактов штамма *E. coli* В-2525/pUC-argG для измерения активности аргининосукцинат-синтетазы: а) 0 мин; б) 15 мин. Напряжение -25 кВ, термостатирование $+20^{\circ}\text{C}$, ввод образца 20 сек. 1 – АТФ, 2 – АМФ, 3 – аспартат, 4 – аргининосукцинат.

Также, с помощью разработанного метода КЭ в реакционных смесях различных ферментативных реакций провели определение N-ацетилглутамата и фосфорилированных продуктов: карбамоилфосфата и O-фосфогомосерина.

Выводы.

1. Показано, что ХАК-производные аминокислот подчиняются общим закономерностям удерживания соединений на обращенной фазе, что подтверждается изменением удерживания внутри гомологических рядов, структурных изомеров, а также при введении в молекулу полярных функциональных групп.
2. Исследовано влияние рН и концентрации буферного раствора на удерживание ХАК-производных аминокислот и полиаминов при разделении в условиях ОФ-ВЭЖХ. Показано, что в диапазоне рН 3.5 – 7 характер полученных зависимостей связан с образованием цвиттер-ионной или нейтральной формы разделяемых ХАК-производных в исследованной области рН, что определяется природой заместителя изучаемых аминокислот.
3. Установлено, что для масс-спектров ХАК-производных основных аминокислот и полиаминов характерно образование двузарядных ионов наряду с протонированным молекулярным ионом. Показано, что варьируя параметры источника ионизации (напряжение на конусе и экстракторе) можно изменять относительные интенсивности и соотношения сигналов протонированных молекулярных, двузарядных и фрагментных ионов, наблюдаемых в масс-спектрах ХАК-производных аминокислот и полиаминов.
4. С помощью метода КЭ получены зависимости времени миграции анионов дикарбоновых и N-замещенных аминокислот от концентрации компонентов разделяющего буфера. На основании полученных закономерностей предложены условия анализа продуктов реакционных смесей при исследовании активностей ферментов, участвующих в биосинтезе аминокислот. Результаты включены в патент РФ № 2264459.
5. С помощью метода ВЭЖХ/МС идентифицированы аминокислоты, в том числе и непротеиногенные (ГАМК, п-, м-, о- изомеры гидроксифенил-

аланина, гомоизолейцин, норвалин, норлейцин, орнитин), димер валина и биогенный амин путресцин, накапливаемые в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов. Подтверждена возможность получения 4-гидроксиизолейцина с помощью ферментативного синтеза. Полученные результаты вошли в патент РФ № 2241036 и патентные заявки РФ № 2004127011, № 2005127811.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Новикова А.Е., Ямпольская Т.А., Гусятинер М.М. Использование капиллярного электрофореза для определения N-ацетилглутамата, аргининсукцината и карбамилфосфата при измерении активности ферментов пути биосинтеза аргинина // Биотехнология. 2004. № 3. С. 78-86.
2. Новикова А.Е., Анисимова О.С., Турчин К.Ф., Фомина С.А., Лунц М.Г., Дегтерев Е.В. Идентификация и анализ γ -аминомасляной кислоты в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39. № 4. С. 47-52.
3. Samsonova N.N., Smirnov S.V., Novikova A.E., Ptitsyn L.R. Identification of *Escherichia coli* K12 YdcW protein as a γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase // FEBS Letters. 2005. V. 579. P. 4107-4112.
4. Новикова А.Е., Стоинова Н.В., Сычева Е.В., Колоколова А.В. Идентификация и анализ непротеиногенных аминокислот норвалина и норлейцина в культуральных жидкостях штаммов *Escherichia coli* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т. 6. № 5. С. 796-806.
5. Новикова А.Е., Колоколова А.В., Буряк А.К. Идентификация полиаминов методом ВЭЖХ/МС в культуральных жидкостях штаммов *Escherichia coli* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. № 1. С. 66-77.
6. Новикова А.Е., Стоинова Н.В., Ямпольская Т.А., Буряк А.К. Идентификация аминокислот, в том числе их структурных изомеров, в виде N-[(6-хинолинилиламино)карбонил]-производных методом ВЭЖХ-МС // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. № 3. С. 430-443.
7. Smirnov S. V., Samsonova N.N., Novikova A.E., Matrosov N.G., Rushkevich N.Y., Koder T., Ogawa J., Yamanaka H., Shimizu S. A novel strategy for enzymatic synthesis of 4-hydroxyisoleucine: identification of an enzyme possessing HMKP (4-hydroxy-3-methyl-2-keto-pentanoate) aldolase activity // FEMS Microbiology Letters. 2007. V. 273. P. 70-77.
8. Фомина С.А., Новикова А.Е., Лунц М.Г., Гусятинер М.М. Способ получения гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) // Патент РФ № 2241036. Опубликовано 27.11.2004. Бюл. № 33.
9. Птицын Л.Р., Смирнов С.В., Альтман И.Б., Новикова А.Е., Котлярова В.А., Гусятинер М.М., Ростова Ю.Г., Ямпольская Т.А. Новая мутантная карбамоилфосфатсинтетаза и способ продукции соединений – производных карбамоилфосфата // Патент РФ № 2264459. Опубликовано 20.11.2005. Бюл. № 32.

10. Стоинова Н.В., Сычева Е.В., Преображенская Е.С., Новикова А.Е., Матросов Н.Г. Способ получения непротеиногенных аминокислот с использованием бактерии семейства Enterobacteriaceae, в которой все синтазы ацетогидроксикислот инактивированы // Патентная заявка РФ № 2004127011. Опубликовано 20.02.2006. Бюл. № 5.
11. Смирнов С.В., Самсонова Н.Н., Новикова А.Е., Матросов Н.Г., Рушкевич Н.Ю., Птицын Л.Р., Мацуи К., Кодера Т. Способ ферментативного получения 4-гидроксиизолейцина // Патентная заявка РФ № 2005127811. Опубликовано 20.03.2007. Бюл. № 8.
12. Новикова А.Е., Фомина С.А., Анисимова О.С., Турчин К.Ф., Лунц М.Г., Дегтерев Е.В. Идентификация и анализ γ -аминомасляной кислоты в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов // Тезисы докладов XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва. 18 – 22 апреля, 2005. С. 778.
13. Новикова А.Е., Ямпольская Т.А., Стоинова Н.В., Серебряный В.А., Матросов Н.Г., Сычева Е.В. Идентификация и анализ непротеиногенных аминокислот с помощью метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Тезисы докладов X международной конференции «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии». Москва – Клязьма. 24 – 28 апреля, 2006. С. 305.
14. Новикова А.Е., Буряк А.К. Идентификация и анализ полиаминов методом ВЭЖХ и ВЭЖХ/МС в культуральных жидкостях штаммов *Escherichia coli* // Тезисы докладов III международной конференции-школы «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии». Звенигород. 16 – 21 апреля, 2007. С. 145.
15. Новикова А.Е., Буряк А.К. Жидкостная хроматография с флуоресцентным и масс-спектрометрическим детектированием при анализе биогенных аминов и изомерных аминокислот // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях». Москва – Клязьма. 23 – 27 апреля, 2007. С. 45.
16. Новикова А.Е., Киверо А.Д., Буряк А.К. Использование метода капиллярного электрофореза в режиме непрямого детектирования для измерения активностей ферментативных реакций // Тезисы докладов научно-прикладного семинара «Аналитические методы и приборы для химического анализа». Санкт-Петербург. 29 – 31 августа, 2007. С. 24.
17. Новикова А.Е., Смирнов С.В., Буряк А.К. Сравнение методов ВЭЖХ с флуориметрическим и масс-спектрометрическим детектированием при идентификации и анализе аминированных метаболитов в виде N-[(6-хинолиниламино)карбонил]-производных // Тезисы докладов II Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». Москва. 3 – 7 сентября, 2007. С. АС-8.
18. Колоколова А.В., Стоинова Н.В., Новикова А.Е. Определение дивалина, секретлируемого валинустойчивыми клетками *E. coli*, с применением ВЭЖХ // Тезисы докладов XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Москва. 23 – 28 сентября, 2007. В пяти томах. Т.4. С. 163.