



УДК 577.11.112.3 + 577.112.389

ИДЕНТИФИКАЦИЯ 5-АМИНОВАЛЕРИАНОВОЙ КИСЛОТЫ  
КАК ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА МЕТАБОЛИЗМА  
НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА КЛОСТРИДИЙ*Родионов А. В., Трапезов Е. В., Дмитриев Б. А.,  
Чахава О. В.**Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи  
АМН СССР, Москва*

Из фекалий аутбредных крыс Sprague-Dawley, подвергшихся случайной контаминации несколькими видами бактерий, выделено нингидринположительное соединение, которое при помощи методов масс-спектрометрии и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии идентифицировано как 5-аминовалериановая кислота. Установлено, что продуцентом этой аминокислоты являются анаэробные бактерии *Clostridium bifermentans*. Показано, что способностью выделять 5-аминовалериановую кислоту обладают не все виды клостридий и полностью лишены этой способности большинство микроорганизмов, в норме населяющих кишечник обычных крыс, человека и обезьян. На основании полученных данных предложено ввести тест на 5-аминовалериановую кислоту в таксономию бактерий.

Вопрос о причастности того или иного вида бактерий к выработке или утилизации веществ, выявляемых в содержимом кишечника и фекалиях макроорганизма, до сих пор остается открытым. Вероятно, это объясняется тем, что многие продукты метаболизма, в частности аминокислоты микробного, эндогенного и алиментарного происхождения, идентичны [1—4].

Оценка метаболической активности отдельных представителей аутофлоры организма в экспериментах на обычных животных практически невозможна. Однако такие данные можно получить путем сравнительного анализа фекалий безмикробных и ассоциированных с различными представителями микрофлоры гнотобионтов. Очевидно, тестом на персистенцию в кишечнике данного вида бактерий может служить продуцируемый ими метаболит, отсутствующий у безмикробных животных, и (или) избирательно утилизируемое этими бактериями вещество алиментарного или эндогенного происхождения.

Для проведения такого рода сравнительного анализа нами использованы содержащиеся в стерильных условиях аутбредные крысы, безмикробные и подвергшиеся случайной контаминации несколькими видами бактерий. Как видно из рис. 1, контаминация крыс привела к изменению как количественного, так и качественного состава смеси нингидринположительных соединений, обнаруживаемых в фекалиях методом аминокислотного анализа. Относительное содержание соединений (2), (22) и (31) резко возросло, а соединений (5) и (10) уменьшилось, практически исчезло соединение (20), и появились соединения (23)—(25), (27) и (28). Судя по временам удерживания, пикам 2 (5,85 мин), 10 (21,65 мин), 22 (48,45 мин), 23 (49,56 мин), 25 (53,95 мин), 28 (72,29 мин) и 31 (82,52 мин) отвечают соответственно О-фосфоэтанолламин, пролин, β-аланин, β-аминоизомасляная кислота, γ-аминомасляная кислота, орнитин и аммиак (отнесение сделано на основании данных работы [5]).

Чтобы проверить правильность отнесения пиков 22 и 25, соответствующие соединения были выделены при помощи электрофореза на бумаге и определена их хроматографическая подвижность на ионообменнике ВТС 2710 в различных режимах элюирования [5], а также на тонкослойных пластинках с силикагелем и целлюлозой в различных системах

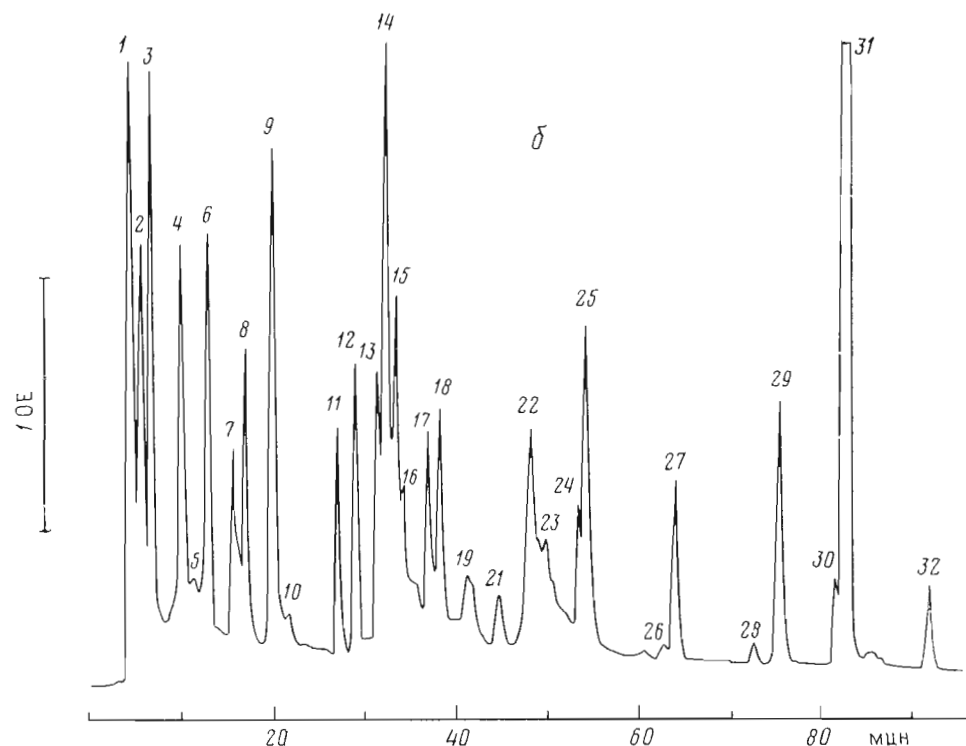
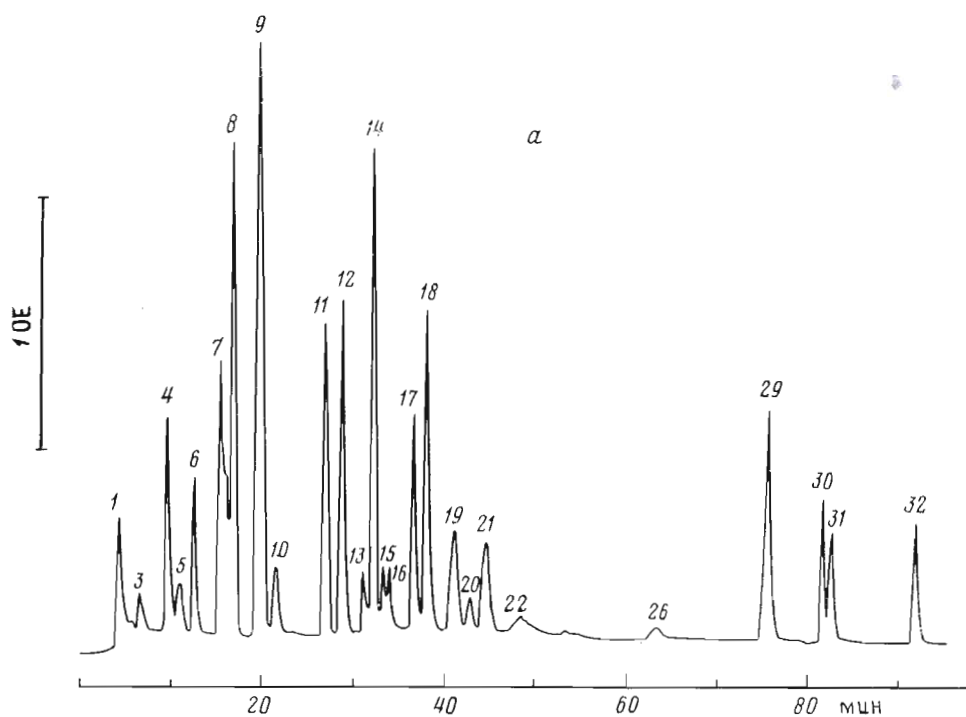


Рис. 1. Анализ смеси нитродиположительных соединений, присутствующих в экстрактах фекалий безмикробных (а) и контаминированных (б) крыс, на колонке (3,5 × × 235 мм) с ионообменником ВТС 2710 по программе Р-2 [5]. Однaковыми цифрами на обеих хроматограммах обозначены пики, совпадающие по времени удерживания.

растворителей. Установлено, что во всех случаях соединение (22) совпадает с заведомым образцом β-аланина, а соединение (25) — с γ-аминомасляной кислотой.

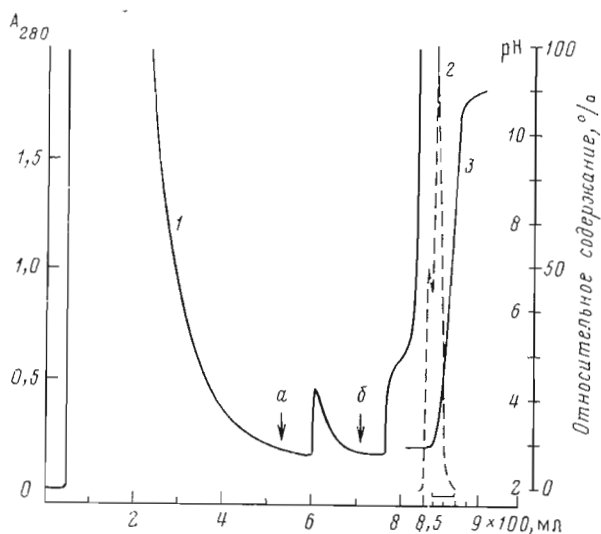


Рис. 2. Выделение фракции нингидринположительных соединений из смеси веществ, извлекаемых из фекалий 80% этанолом (см. «Экспер. часть»). Колонка (2,5 × 31 см) с катионообменником AG50W-X8(H<sup>+</sup>). Элюенты — 80% этанол; *a* — вода, *b* — 4 н. NH<sub>4</sub>OH. Скорость 1 мл/мин. 1 — поглощение при 280 нм, 2 — относительное содержание нингидринположительных соединений в фракциях (за 100% принято содержание нингидринположительных соединений в наиболее обогащенной ими фракции; начиная с 850-го мл объем фракций 2 мл), 3 — изменение pH на выходе из колонки. Скобкой обозначена выделяемая фракция, содержащая соединение (27)

Значительно сложнее оказалась ситуация в случае соединения (27), идентифицировать которое по аналогичной схеме не удалось. В использованных условиях анализа экстрактов фекалий (рис. 1) это соединение по времени удерживания (64,34 мин) практически совпадает лишь с 5-гидроксилизином (*t<sub>c</sub>* 64,71 мин), однако достаточно было перейти на программу P-1, чтобы разделить и эту пару (разность времен удерживания составляла 1,28 мин). Таким образом, поскольку соединение (27) отличается от всех известных нингидринположительных компонентов физиологических жидкостей и гидролизатов белков и гликопротеинов, возникновения необходимости его выделения и установления строения.

Предлагаемая схема выделения, учитывающая чрезвычайную сложность состава экстракта фекалий, включает следующие стадии: освобождение от высокомолекулярных соединений путем подкисления экстракта и последующего добавления этанола, выделение смеси низкомолекулярных нингидринположительных соединений, ее фракционирование и, наконец, выделение чистого соединения (27).

На стадии извлечения из экстракта фекалий смеси нингидринположительных соединений (рис. 2) удалось освободиться от значительного количества пигментов (см. кривую 1), а также от соединений, молекулы которых при низких значениях pH не несут положительного заряда, и от ~40% кислых нингидринположительных компонентов (первый пик на кривой 2). Дополнительно очистить фракцию нингидринположительных соединений, содержащую вещество (27), от пигментов позволила последующая хроматография на TSK-геле HW-40 (рис. 3). Примечательно, что в использованных условиях кислые компоненты элюируются до полного объема колонки, а ароматические аминокислоты заметно отстают от всех остальных (см. кривую 2 на рис. 3). Такое фракционирование низкомолекулярных соединений обусловлено, вероятно, тем, что этот сорбент содержит отрицательно заряженные группы и в то же время в определенной степени гидрофобен.

Собственно разделение нингидринположительных соединений осуществлено методом ионообменной хроматографии. В качестве элюента был преднамеренно использован ацетат аммония — летучий буфер, который перед последующим анализом фракций можно было удалить путем их

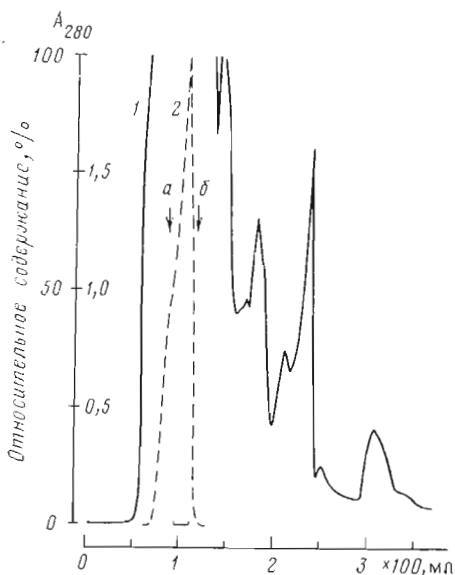


Рис. 3

Рис. 3. Хроматография фракции нингидринположительных соединений, выделенной при помощи катионообменника (рис. 2). Колонка (2,5 × 34 см) с TSK-гелем HW-40 (fine). Элюент — вода. Скорость 0,5 мл/мин. 1 — поглощение при 280 нм, 2 — кривая элюирования нингидринположительных соединений (за 100% принято содержание нингидринположительных соединений в наиболее обогащенной ими фракции, объем фракций 5 мл). Стрелками обозначены максимумы кривых элюирования кислотных компонентов (а) и ароматических аминокислот (б). Скобкой отмечены фракции, содержащие соединение (27)

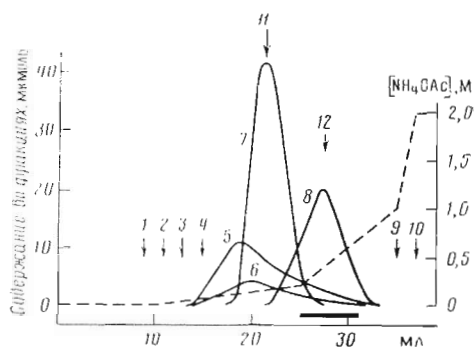


Рис. 4

Рис. 4. Фракционирование смеси нингидринположительных соединений, выделенных хроматографией (см. рис. 3), на колонке (1 × 7,5 см) с катионообменником AG50W-X8 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) в градиенте концентрации NH<sub>4</sub>OAc (pH 3,0) от 0,02 до 2 М (форма градиента показала штриховой линией). Скорость элюирования 0,4 мл/мин; объем фракций 2 мл. Приведен контроль элюата по содержанию аминокислот, обнаруженных в смеси и имеющих подвижность, близкую к подвижности соединения (27) (пик 8), тирозина (5), фенилаланина (6), γ-аминомасляной кислоты (7). Максимумы кривых элюирования остальных аминокислот, содержащихся в смеси, указаны стрелками: 1 — Asp, 2 — Glu, 3 — Thr, Ser, Pro, Ala, 4 — Gly, Cys, Val, Met, Ile, Leu, 9 — Lys, 10 — His, 11 — соединение (24) рис. 1, 12 — Trp. Отмечена фракция, выделяемая для дальнейшей очистки.

лиофилизации. Как видно из рис. 4, выбранные условия элюирования (рН буфера и форма градиента) обеспечили вполне удовлетворительное отделение соединения (27) от большинства аминокислот. Последующая стадия — хроматография на полистирольном сорбенте Bio-Beads SM-2 — имела целью освободиться от примеси пигментов и ароматических аминокислот, в первую очередь от триптофана (соединение (26) на рис. 1). Для окончательной очистки полученного препарата, содержащего в качестве примесей лишь γ-аминомасляную кислоту и неидентифицированное соединение (24), использовали ВЭЖХ на ионообменнике ВТС 2710.

Согласно данным УФ-спектроскопии, выделенное таким образом соединение не содержит ароматических остатков. Его обработка *n*-бутанолом в присутствии HCl приводит к продукту, обладающему значительно более высокой хроматографической подвижностью в тонком слое силикагеля. Следовательно, соединение (27) относится к аминокислотам. Сравнительный анализ масс-спектров свободной аминокислоты, ее бутилового эфира и *N*-трифторацетата бутилового эфира (рис. 5) позволили сделать следующие заключения: аминокислота имеет молекулярную массу 117, а ее молекула содержит одну карбоксильную и одну аминогруппу, причем, судя по наличию в масс-спектрах *a* и *b* интенсивного характеристического пика с *m/z* 30, отвечающего иону H<sub>2</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>, аминогруппа находится в ω-положении. Для выбора между пятью возможными структурами выделенного соединения H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>COOH был привлечен метод

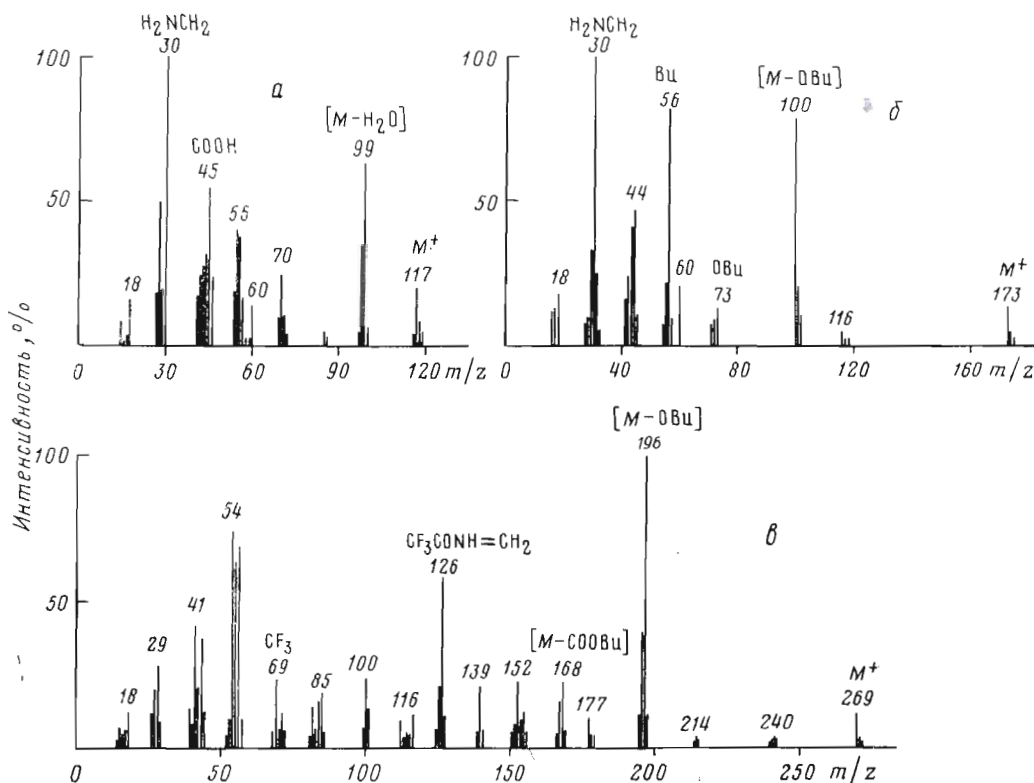


Рис. 5. Масс-спектры соединения (27) (а), его *n*-бутилового эфира (б) и *N*-трифторацетате *n*-бутилового эфира (в)

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре этой ω-аминокислоты присутствуют три группы сигналов: при 1,65 (4H, протоны двух метиленовых звеньев, связанных с атомами углерода), 2,26 (2H, протоны метиленового звена, соседствующего с аминогруппой) и 3,02 м. д. (2H, протоны фрагмента — CH<sub>2</sub>COO<sup>2</sup>H). Отсюда однозначно следует, что соединение (27) является 5-аминовалериановой кислотой.

Судя по весьма ограниченному числу публикаций, в которых в том или ином контексте фигурирует 5-аминовалериановая кислота природного происхождения, она либо относится к очень редким, либо не привлекает особого внимания исследователей. Описано несколько реакций переаминирования с участием 5-аминовалериановой кислоты [6—12], причем в двух случаях выделены соответствующие трансминазы [11, 12]. Эта аминокислота упоминается также как промежуточный продукт метаболизма лизина, орнитина и пролина [13—15]. Что же касается 5-аминовалериановой кислоты как высвобождающегося во внешнюю среду продукта жизнедеятельности микроорганизмов, то сообщения на этот счет, как правило, носят либо предположительный характер [16—18], либо недостаточно конкретны [15, 19—21]. Так, например, предположение о том, что обнаруживаемая в слюне человека 5-аминовалериановая кислота является продуктом микробного происхождения [17], не подкреплено какими-либо экспериментальными данными, а авторы работ [20, 21] ограничиваются лишь констатацией факта, что некие бактерии и реснитчатые простейшие, обитающие в рубце (первом отделе желудка) жвачных животных, продуцируют эту аминокислоту.

В связи с этим несомненный интерес представляла идентификация микроорганизма, ответственного за появление 5-аминовалериановой кислоты в фекалиях использованных в настоящей работе контаминированных крыс. Оказалось, что из всех видов бактерий, высеваемых из содержимого кишечника этих крыс, 5-аминовалериановую кислоту продуцируют лишь анаэробные бактерии *Clostridium bifementans*. В отдельных экспе-

риментах показано, что эту аминокислоту выделяют также клостридии вида *difficile*, тогда как 5 других видов, исследованных в рамках настоящей работы (*histoliticum*, *perfringens*, *septicum*, *oedematiens* и *butyricum*), по-видимому, лишены этой способности. Впрочем, не исключено, что образование 5-аминовалериановой кислоты, как и аминокислотных кислот [22], сильно зависит от состава среды, используемой для культивирования клостридий. Проверить это предположение предстоит в ходе дальнейших исследований.

Как отмечено выше, из литературы не ясно, насколько широк круг микроорганизмов, продуцирующих или способных продуцировать 5-аминовалериановую кислоту. Наша же работа дает основания предположить, что к их числу, вероятно, не относится большинство микроорганизмов, в норме населяющих кишечник обычных крыс, человека и обезьян, так как в экстрактах фекалий этих млекопитающих 5-аминовалериановая кислота, как правило, отсутствует. По-видимому, обнаружение этой аминокислоты в ряде случаев может свидетельствовать о присутствии (или по меньшей мере указывать на возможность присутствия) некоторых видов клостридий, что, несомненно, значительно упрощает процедуру идентификации этих бактерий. В связи с этим представляется целесообразным тест на 5-аминовалериановую кислоту ввести в таксономию бактерий.

Авторы выражают глубокую благодарность Б. В. Розынову (ИБХ АН СССР) за съемку масс-спектров и помощь в их интерпретации, А. С. Пашкову (ИОХ АН СССР) за съемку ЯМР-спектра, а также В. А. Бабайцевой и И. Н. Бакунину (НИИЭМ АМН СССР) за предоставление штаммов бактерий рода клостридий.

### Экспериментальная часть

В работе использованы аутбредные крысы Sprague-Dawley (IFFA Gredo, Франция). Стерильность безмикробных животных контролировали по известной методике [23].

Состав смесей нингидринположительных соединений определяли на аминокислотном анализаторе LC 5001 (Biotronik, ФРГ) в условиях, описанных в работе [5]. При подготовке образцов для анализа руководствовались рекомендуемой фирмой «Biotronik» методикой обработки физиологических жидкостей, которая включает стадию осаждения белков 5-сульфосалициловой кислотой.

Высоковольтный вертикальный электрофорез на бумаге марки «С» (Ленинград) или ватман № 3 (Whatman, Англия) проводили в камере Михля в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,6 [24], при напряженности поля 75 В/см и силе тока 76 мА. В качестве обнаруживающего реагента использовали 0,5% раствор нингидрина в смеси уксусная кислота — *n*-бутанол (1 : 20).

Для идентификации β-аланина и γ-аминоасляной кислоты помимо ионообменной хроматографии в различных режимах элюирования (см. [5]) использовали ТСХ на пластинках с силикагелем «Eastman 13179» (США) в системах хлороформ — метанол — 17% аммиак (2 : 2 : 1, нижняя фаза) и *n*-пропанол — конц. аммиак (7 : 3) и на целлюлозе F 1440 (Schleicher und Schüll, ФРГ) в тех же системах растворителей, а также в системах изопропанол — муравьиная кислота — вода (75 : 12,5 : 12,5), пиридин — диоксан — 25% аммиак — вода (7 : 7 : 3 : 3) и *n*-бутанол — ацетон — уксусная кислота — вода (35 : 35 : 7 : 23) [25].

Соединение (27) (рис. 1) выделяли по следующей методике. Суспензию ~90 г влажных фекалий в 0,5 л воды центрифугировали (10 000 г, 30 мин, 5° С), супернатант подкисляли до pH 1,3 путем добавления конц. HCl, осадок отделяли центрифугированием, к надосадочной жидкости добавляли 4 объема этанола, смесь выдерживали 18 ч при 4° С, затем центрифугировали. Супернатант уваривали, к сиропобразному остатку добавляли 10 мл воды и 120 мл этанола, от образовавшегося осадка освободились центрифугированием. Полученный супернатант (~130 мл) непосредственно наносили на ионообменную колонку. Условия извлечения смеси нингидринположительных соединений из этого супернатанта при помощи ионообменника AG50W-X8 (Bio-Rad, США), хроматографии на TSK-геле HW-40 (Toyo Soda, Япония) и последующего фракционирования этой смеси приведены в подписях к рис. 2—4. О составе фракций судили по данным электрофореза на бумаге и аминокислотного анализа. Фракции рис. 4, содержащие соединение (27), объединяли, лиофилизировали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (1,5 × 13 см) с Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad, США) в воде (скорость элюирования 0,2 мл/мин). На стадии окончательной очистки соединения (27) в качестве хроматографа использовали аминокислотный анализатор (колонку элюировали по укороченной на три первых шага программе P-1 [5]). Фракции обессоливали на колонке (1 × 13 см) с ионообменником AG50W-X8

(H<sup>+</sup>) в условиях, аналогичных приведенным в подписи к рис. 2. В результате получено 7 мг хроматографически индивидуального соединения (27).

Бутиловый эфир получали путем выдерживания при 105° С раствора 30 мкг соединения (27) в 0,2 мл *n*-бутанола, содержащего 3 М HCl (для получения раствора HCl к 10 мл охлажденного *n*-бутанола добавляли 2 мл ацетилхлорида). Согласно данным ТСХ на пластинках с силикагелем «Eastman 13179» в системе хлороформ — мета-нол — конц. аммиак (800 : 200 : 1), этерификация завершалась через 15 мин (исходное соединение в этой системе неподвижно, его *n*-бутиловый эфир имеет *R<sub>f</sub>* 0,57). N-Трифтор-ацетилирование полученного эфира проводили ангидридом трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (105° С, 15 мин). Чистота полученного производного подтверждена методом ГЖХ.

Бактерии *Clostridium bifementans* идентифицировали в соответствии с определителем Берги [26]. Все виды клостридий *in vitro* выращивали в тиогликолевой питательной среде [27]. Подробное описание процедуры выделения и идентификации бактерий, а также их морфологических, культуральных и биохимических свойств будет предметом отдельной публикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Clarke R. T. S., *Bauchop T.* Microbial ecology of the gut. L.: Acad. Press, 1977. P. 118—151.
2. Schafer D. F., Fowler J. M., Jones H. A. // Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 1981. V. 167. № 3. P. 301—306.
3. Jamada K., Sinoshita S., Tsunoda T. The microbial production of amino acids. Tokyo: John Wiley & Sons, 1972.
4. Koopman J. P., Kennis H. M., Lankhorst A., Welling G. W., Hectors M. P. C., Nagengast F. M., Van Druten J. A. M. // Z. Versushstier. 1987. № 3—4. S. 118—124.
5. Родионов А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5.
6. Roberts E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1954. V. 48. № 2. P. 395—401.
7. Baxter C. F., Roberts E. // J. Biol. Chem. 1958. V. 233. № 5. P. 1135—1139.
8. Shousboe A., Wu J.-Y., Roberts E. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 15. P. 2868—2873.
9. Buzenet A. M., Fages C., Bloch-Tardy M., Gonnard P. // Biochem. et biophys. acta. 1978. V. 522. № 2. P. 400—411.
10. Yonaha K., Toyama S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1980. V. 200. № 1. P. 156—164.
11. Ichihara A., Ichihara F. A., Suda M. // J. Biochem. 1960. V. 48. № 3. P. 412—424.
12. Der Garabedian P. A. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 19. P. 5507—5512.
13. Майстер А. Биохимия аминокислот. М.: Изд. иностр. лит., 1961. С. 227, 433—434.
14. Rothstein M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1965. V. 111. № 2. P. 467—476.
15. Adams E., Frank I. // Annu. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 1005—1061.
16. Clifton C. E. // J. Bacteriol. 1940. V. 39. № 5. P. 485—497.
17. Dreyfus P. M., Levy H. L., Efron M. L. // Experientia. 1968. V. 24. № 5. P. 447—448.
18. Albone E. S., Robins S. P., Patel D. // Comp. Biochem. and Physiol. 1976. V. 55B. № 4. P. 483—486.
19. Albone E. S., Gosden P. E., Ware G. C., Macdonald D. W., Hough N. G. // ACS Symp. Ser. 1978. V. 67. (Flavor chemistry and animal foods.) P. 78—91.
20. Van Den Hende C., Oyaert W., Bouckaert J. H. // Res. Vet. Sci. 1964. V. 5. № 4. P. 491—496.
21. Tsutsumi W., Onodera R., Kandatsu M. // Agr. Biol. Chem. 1975. V. 39. № 3. P. 711—714.
22. Gamberith G., Brantner H. // J. Chromatogr. 1986. V. 355. № 1. P. 273—280.
23. Чахава О. В., Горская Е. М., Рубан С. З. Микробиологические основы гнотобиологии. М.: Медицина, 1982.
24. Прусик Э. // Лабораторное руководство по хроматографии и смежным методам. / Ред. О. Микеш. М.: Мир, 1982. С. 731—735.
25. Niederwieser A. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25B. P. 60—73.
26. Хоупт Д., Заварзин Г. А. Краткий определитель бактерий Берги. М.: Мир, 1980. С. 297—299.
27. Чахава О. В. Гнотобиология. М.: Медицина, 1972. С. 8—16.

Поступила в редакцию  
15.X.1987  
После доработки  
12.I.1988

IDENTIFICATION OF 5-AMINOVALERIC ACID  
AS A CHARACTERISTIC PRODUCT OF METABOLISM  
OF SOME *CLOSTRIDIUM* SPECIES

RODIONOV A. V., TRAPEZOV E. V., DMITRIEV B. A.,

CHAKHAVA O. V.

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

An unusual ninhydrin-positive compound has been isolated from feces of accidentally contaminated Sprague-Dawley outbred rats and identified by mass spectrometry and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy techniques as 5-aminovaleric acid. The described procedure of isolation, purification and structure determination can be recommended as a general method of identification of unusual ninhydrin-positive compounds in complex mixtures of biological origin. The 5-aminovaleric acid was found to be produced by an anaerobic bacterium *Clostridium bifermentans*. It is shown that not all *Clostridium* spp. excrete this amino acid and that the majority of microorganisms, normally inhabiting intestine of rats, simians and man, do not possess this ability. On the basis of data obtained, the test for 5-aminovaleric acid is proposed to be included into the taxonomy of bacteria.