

УДК 547.466:544.544.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА МИКРОБНЫХ МАТОВ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА С ПОМОЩЬЮ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О.М. Калашникова, Е.Н. Шаповалова, Д.Д. Бархутова, В.В. Хахинов, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии, shapovalova@analyt.chem.msu.ru)

С использованием метода тонкослойной хроматографии определены доминирующие аминокислоты (аргинин, серин, триптофан, фенилаланин) микробных матов щелочных гидротерм Забайкалья Уро, Гарга, холодного минерального источника Романовский и содовых озер Хилганта и Верхнее Белое. Изучено влияние состава подвижной фазы на селективность и эффективность разделения ряда аминокислот. Проведена оценка содержания аргинина, серина, триптофана и фенилаланина в исследованных микробных матах.

Циано-бактериальные маты – слоистые сообщества микроорганизмов с доминирующими оксигенными фототрофными бактериями – выявлены в гидротермах Камчатки [1], США, Новой Зеландии [2, 3], Бурятии [4], а также в содовых озерах Восточной Африки и Забайкалья [5]. Достаточно подробно изучены структура микробных матов, их видовой состав и распространение микроорганизмов, определены физико-химические параметры среды обитания. Однако количественный и качественный состав органического вещества (углеводов, белков, аминокислот, липидов, органических кислот) микробных матов практически не исследован. В литературе имеются данные об аминокислотном составе водорослей и содержании жирных кислот почвенных циано-бактериальных обрастаний [6–8]. Определение аминокислотного состава микробных матов позволит выявить механизмы адаптации микроорганизмов к существованию при высоких значениях температуры, рН и высокой концентрации минеральных солей. Распространенные в щелочных гидротермах и содовых озерах алкалотермофильные и алкалофильные микроорганизмы производят почти все промышленно значимые классы ферментов. Данные о содержании аминокислот микробных матов могут быть использованы в биотехнологических исследованиях [9].

Данная работа посвящена выбору оптимальной подвижной фазы для разделения аминокислот, преобладающих в микробных матах гидротерм и содовых озер Забайкалья, и их определению методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластин «Sorbfil».

Экспериментальная часть

В работе использовали пластины «Sorbfil» (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ, зернение 8–12 мкм, толщина слоя 110 мкм). Изучали удерживание и разделение таких аминокислот, как аспарагин, серин, аспарагиновая кислота, фенилаланин, триптофан, аргинин, валин и аланин. При этом использовали образцы фирмы «Serva» (Heidelberg, Germany). Стандартные растворы аминокислот в метаноле (100 мкг/мл) готовили по точной навеске. Для приготовления подвижной фазы использовали метанол и этанол «для хроматографии», 2-пропанол, 2-бутанол, ацетонитрил и уксусную кислоту квалификации «х.ч.» («Криохром», Россия), а также раствор хитозана (10 кДа, степень дезацетилирования 85%) в 4%-й уксусной кислоте.

Для получения хроматограмм растворы аминокислот (2–5 мкл) наносили микрошприцем на стартовую линию хроматографической пластинки, которую после высушивания нанесенной пробы помещали в камеру с подвижной фазой (хроматограмму получали восходящим методом). Расстояние от стартовой линии до фронта растворителя составляло 8–10 см. Пластинки высушивали и идентифицировали зоны аминокислот. Для обнаружения аминокислот пластинку опрыскивали раствором нингидрина (0,2%) в этиловом спирте и нагревали в течение 10–15 мин в сушильном шкафу при температуре 100°C до появления окрашенных пятен. Полученные хроматограммы обрабатывали с помощью программ «Aver TV Studio» и «Видеоденситометр Sorbfil» (АО «Сорбполимер», Краснодар, Россия). Рассчитывали значения R_f и размеры площадей хроматографических зон.

Объектом исследования служили микробные маты щелочных гидротерм Уро и Гарга (Забайкалье, Баргузинская долина), холодного минерального источника Романовский (Витимское плоскогорье) и содовых озер Хилганта (Ононская степь) и Верхнее Белое (Боргойская степь). Микробные маты отличались по своей структуре и видовому составу, что обусловлено физико-химическими параметрами среды обитания (табл. 1).

Перед хроматографированием микробные маты предварительно гидролизовали. Для этого навеску (50 мг) микробного мата, высушенного на воздухе, помещали в виалы, добавляли 5 мл раствора соляной кислоты (1:1) и кипятили на водяной бане при температуре 100°C в течение двух суток. Гидролизат фильтровали и полученный раствор использовали для хроматографического анализа.

Результаты и обсуждение

Для разделения аминокислот методом ТСХ и анализа исследуемых образцов был выбран оптимальный состав подвижных фаз (с этой целью изучали влияние состава подвижной фазы на подвижность определяемых аминокислот). В качестве подвижной фазы использовали спиртовые и водно-спиртовые смеси. Для уменьшения размывания зон аминокислот в результате их диссоциации по карбоксильной группе в подвижную фазу добавляли кислоты и хитозан.

Для элюирования аминокислот использовали десять подвижных фаз, состав и параметр полярности которых приведен в табл. 2. Полярность подвижной фазы рассчитывали по формуле:

$$P_{\text{смеси}} = \sum (P_i \varphi_i),$$

где P_i – полярность [10], а φ_i – доля соответствующего компонента смеси. В табл. 2 представлены также полученные хроматографические характеристики аминокислот: значения R_f , число теоретических тарелок (N) и фактор разделения (селективности) (α). Приведенные данные свидетельствуют о том, что значения R_f , N , и α исследуемых аминокислот зависят от природы кислоты и состава подвижной фазы. Подвижность для всех изученных подвижных фаз изменяется в ряду: аргинин < аспарагиновая кислота < аспарагин < серин < фенилаланин < триптофан, т.е. она зависит от размера молекулы аминокислоты и наличия в ней полярных групп, способных к образованию водородных связей. Это соответствует представлениям о механизме взаимодействия аминокислот с полярными сорбентами. Степень удерживания аминокислот определяется образованием водородных связей с силанольными группами силикагеля. Величина R_f увеличивается с ростом полярности подвижной фазы (табл. 2). Так, при использовании подвижной фазы с наименьшей полярностью состава изобутанол–изопропанол–уксусная кислота (6,5:5,5:0,2) аминокислоты характеризуются ограниченной подвижностью или остаются на линии старта. Замена изобутанола на этанол, метанол и ацетонитрил, а также добавление воды вызывают увеличение подвижности аминокислот. Изменение подвижности аминокислот хорошо коррелирует с увеличением полярности подвижной фазы. Так, например, значение R_f аргинина увеличивается с 0,02 до 0,45 при увели-

Таблица 1

Гидрохимическая характеристика гидротерм и содовых озер Байкальского региона

Водные экосистемы	$T, ^\circ\text{C}$	pH	$E_h, \text{мВ}$	$M, \text{г/л}$	Тип воды
Уро	64	8,9	70	0,52	Гидрокарбонатно-сульфатная натриевая
Гарга	52	8,8	275	0,075	Сульфатная натриевая
Романовский	5	7,2	н.о.	1,4	Гидрокарбонатная магниевно-натриево-кальциевая
Хилганта	29	9,5	70	46,6	Хлоридно-карбонатная
Верхнее Белое	27	9,8	54	9,42	Сульфатно-хлоридно-гидрокарбонатная

Т а б л и ц а 2

Характеристики разделения аминокислот методом тонкослойной хроматографии

Состав подвижных фаз	Полярность	Стандарты аминокислот	R_f	N	α^*
Метанол–изопропанол– вода–уксусная кислота (5:4:2:0,2)	5,43	аргинин аланин валин	0,34 0,69 0,77	100 1020 1110	4,3 1,5
Изобутанол–изопропанол– уксусная кислота (6:5:5:5:0,2)	4,03	аргинин аланин валин	0,02 0,07 0,09	– 10 20	1,3
Метанол–изопропанол– вода–уксусная кислота (5:4:2:0,3)	5,39	аргинин аспарагин серин	0,27 0,36 0,57	100 480 1130	1,5 2,4
Метанол–изопропанол– раствор хитозана (100 мкг/мл)–уксусная кислота (5:4:2:0,2)	5,43	аргинин аспарагиновая кислота аспарагин серин фенилаланин триптофан	0,28 0,36 0,48 0,59 0,81 0,84	320 210 1940 1200 5340 4010	1,4 1,6 1,6 2,9 1,1
Этанол–изопропанол–вода– уксусная кислота (5:4:2:0,4)	5,07	аргинин аспарагиновая кислота аспарагин серин фенилаланин триптофан	0,21 0,26 0,37 0,49 0,72 0,75	140 60 240 740 1320 2810	1,3 1,7 1,5 2,7 1,2
Ацетонитрил– изопропанол–вода– уксусная кислота (5:4:2:0,4)	5,75	аргинин аспарагин серин триптофан фенилаланин	0,37 0,80 0,88 0,95 0,98	180 1600 2620 9740 5330	6,7 1,8 2,6 2,6
Изопропанол–вода– уксусная кислота (5:2:0,4)	5,89	аргинин аспарагиновая кислота аспарагин серин фенилаланин триптофан	0,45 0,74 0,78 0,85 0,96 0,98	270 980 2500 190 5520 15620	1,2 1,3 1,6 4,2 2,0
Изобутанол–изопропанол– раствор хитозана (100 мкг/мл)–муравьиная кислота (5:4:2:0,2)	4,98	аспарагиновая кислота аргинин аспарагин серин фенилаланин триптофан	0,06 0,09 0,09 0,13 0,46 0,51	60 50 260 60 1940 1260	1,5 1,5 5,5 1,2
Метанол–изопропанол– раствор хитозана (200 мкг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3)	6,65	аргинин аспарагиновая кислота аспарагин серин фенилаланин триптофан	0,48 0,55 0,56 0,67 0,82 0,84	1230 1600 1260 2210 580 6190	1,3 1,1 1,6 2,3 1,2
Этанол–изопропанол– раствор хитозана (200 мкг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3)	5,31	аргинин аспарагиновая кислота аспарагин серин фенилаланин триптофан	0,39 0,53 0,58 0,66 0,82 0,83	480 1080 1440 1460 7740 5570	1,8 1,2 1,4 2,3 1,1

* α – коэффициент селективности, равный отношению коэффициента распределения менее подвижного сорбата к коэффициенту распределения более подвижного сорбата.

чении полярности с 4,03 до 5,89 (табл. 2). Наиболее заметное влияние оказывает добавка воды, что связано, вероятно, не только с повышением полярности, но и с увеличением растворимости сорбатов в подвижной фазе. Наибольшие различия в подвижности аминокислот получены при использовании смесей изопропанола с метанолом или этанолом в присутствии добавок кислот или хитозана. Значения величин R_f , рассчитанных для аминокислот, элюированных подвижными фазами с метанолом и этанолом отличались незначительно, но эффективность разделения (N) была выше для подвижных фаз, содержащих метанол, поэтому для определения аминокислот в матах использовали метиловый спирт.

Исследованные подвижные фазы в своем составе содержали уксусную или муравьиную кислоты для уменьшения размывания зон сорбатов. Было показано, что пятна аминокислот, для элюирования которых использовали подвижную фазу, содержащую муравьиную кислоту, имели более четкие границы и были менее размыты. Добавление в подвижную фазу раствора хитозана также способствовало уменьшению размывания пятен на проявленных хромато-

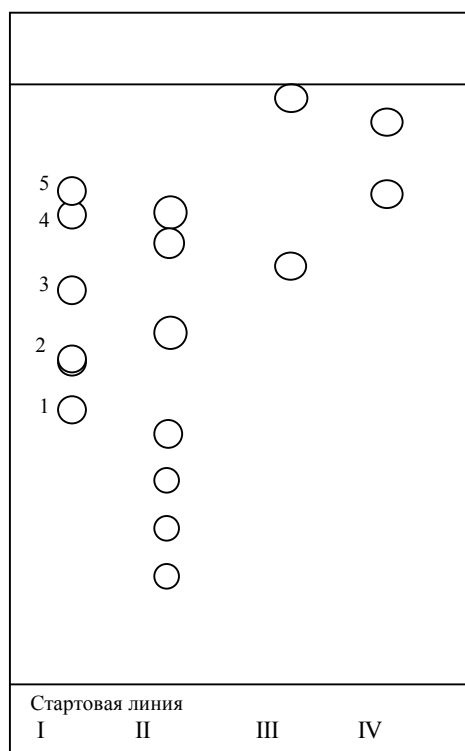


Рис. 1. Хроматограмма разделения аминокислот в стандартной смеси (I – аргинин (1), аспарагиновая кислота (2), серин (3), фенилаланин (4), триптофан (5) и микробных матах (II – гидротерма Уро; III – гидротерма Гарга; IV – источник Романовский)

Подвижная фаза: метанол–изопропанол–раствор хитозана (200 мг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3)

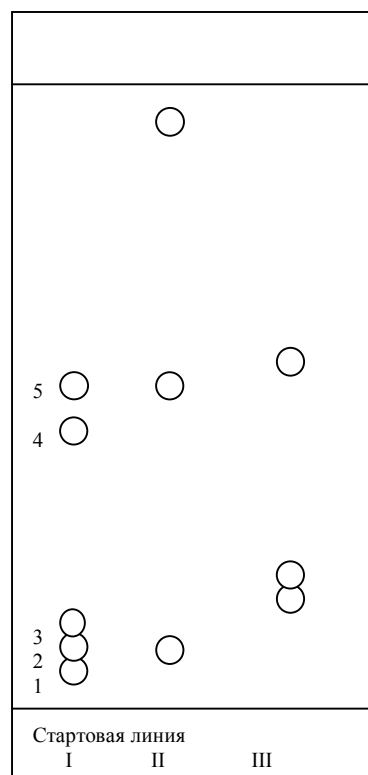


Рис. 2. Хроматограмма разделения аминокислот в стандартной смеси (I – аргинин (1), аспарагиновая кислота (2), серин (3), фенилаланин (4), триптофан (5) и микробных матах (II – озеро Хилганта; III – источник Романовский). Подвижная фаза: изобутанол – изопропанол – раствор хитозана (100 мкг/мл) – муравьиная кислота (5:4:2:0.2)

раммах и повышению эффективности разделения. Следует отметить, что хитозан повышает вязкость подвижной фазы, а это несколько уменьшает подвижность аминокислот.

По подвижности и селективности исследованные аминокислоты были разделены на две группы. В первую группу входили аргинин, серин, аспарагиновая кислота, во вторую – фенилаланин и триптофан. Лучшая селективность и эффективность разделения первой группы аминокислот достигается при использовании подвижной фазы следующего состава: метанол – изопропанол – раствор хитозана (200 мкг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3). Величины R_f аргинина, аспарагиновой кислоты и серина составили 0,48; 0,55; 0,67 соответственно (рис. 1). Для разделения фенилаланина и триптофана более эффективно использование подвижной фазы: изобутанол – изопропанол – раствор хитозана (100 мкг/мл) – муравьиная кислота (5:4:2:0,2). Значения R_f фенилаланина и триптофана соответственно были равны 0,46 и 0,51 (рис. 2).

Т а б л и ц а 3

**Характеристики разделения аминокислот микробных матов методом тонкослойной хроматографии
($n = 3, P = 0,95$)**

Экосистема	Состав подвижных фаз	Аминокислоты	R_f	N	α	Содержание аминокислот, в % на сухую навеску
Уро	метанол–изопропанол–раствор хитозана (200 мг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3)	аргинин	0,18 0,27 0,37 0,42	780		1,9±0,4
		аспарагин и аспарагиновая кислота	0,57	1370	1,8	4,3±0,5
		неидентифицирована	0,70	5420	1,8	–
		фенилаланин	0,79	3530	1,6	3,2±0,4
Гарга	метанол–изопропанол–раствор хитозана (200 мг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3)	серин	0,71	4810	–	3,3±0,4
		неидентифицирована	0,94	570	6,2	–
Романовский	метанол–изопропанол–раствор хитозана (200 мг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3)	фенилаланин итриптофан	0,79	8320	–	1,6±0,3
		неидентифицирована	0,91	16380	2,7	–
	изобутанол–изопропанол–раствор хитозана (100 мг/мл)–муравьиная кислота (5:4:2:0.2)	аспарагиновая кислота, аргинин или аспарагин	0,08			–
		триптофан неидентифицирована	0,51 0,96	2300 18000	– 25,0	2,4±0,5 –
Верхнее Белое	изобутанол–изопропанол–раствор хитозана (100 мг/мл)–муравьиная кислота (5:4:2:0.2)	неидентифицирована	0,08	40	–	–
		неидентифицирована	0,15	480	2,0	–
		неидентифицирована	0,29	520	2,3	–
		фенилаланин	0,42	1710	1,8	1,7±0,4
Хилганта	изобутанол–изопропанол–раствор хитозана (100 мг/мл)–муравьиная кислота (5:4:2:0,2)	неидентифицирована	0,21	220	–	–
		неидентифицирована	0,24	470	1,2	–
		триптофан	0,54	2430	3,7	2,0±0,4

Для более точной идентификации аминокислот в образцах микробных матов использовали несколько подвижных фаз. Полученные данные представлены в табл. 3. При исследовании гидролизата микробного мата гидротермы Уро получены семь окрашенных пятен, среди которых были идентифицированы аргинин ($R_f = 0,42$) и фенилаланин ($R_f = 0,79$). Значение $R_f = 0,57$ соответствует двум аминокислотам – аспарагину и аспарагиновой кислоте.

При анализе гидролизата микробного мата источника Романовский использовали две подвижные фазы: метанол – изопропанол – раствор хитозана (200 мг/мл) в 4%-м растворе муравьиной кислоты (5:4:3) и изобутанол – изопропанол – раствор хитозана (100 мг/мл) – муравьиная кислота (5:4:2:0.2). В исследованном микробном сообществе был определен триптофан ($R_f = 0,51$); в микробном мате гидротермы Гарга выявлены две аминокислоты, одна из которых серин ($R_f = 0,71$).

При использовании подвижной фазы состава изобутанол – изопропанол – раствор хитозана (100 мг/мл) – муравьиная кислота (5:4:2:0,2) в микробных матах содовых озер Верхнее Белое и Хилганта определены фенилаланин ($R_f = 0,42$) и триптофан ($R_f = 0,54$) соответственно. Следует отметить, что значения R_f некоторых аминокислот, полученные для стандартных и исследуемых образцов, незначительно отличались. В табл. 3 приведены также данные, оценивающие содержание аминокислот в матах.

Таким образом, впервые с помощью ТСХ было проведено определение аминокислот (аргинин, аспарагиновая кислота, серин, триптофан, фенилаланин), преобладающих в микробных матах. Показано, что фенилаланин преобладал в микробных матах гидротермы Уро и озера Верхнее Белое, триптофан – в микробных сообществах источника Романовский, озера Хилганта. Кроме того, в образце гидротермы Уро определили аргинин, в микробном мате гидротермы Гарга – серин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварзин Г.А., Карпов Г.А., Бонч-Осмоловская Е.А. и др. Кальдерные микроорганизмы. М., 1989.
2. Brock T.D. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. N.Y., 1978. P. 465.
3. Castenholz R.W. // Bergey's bacteriology. 9th ed. N.Y., 1989. 3. P. 1870.
4. Намсараев З.Б., Горленко В.М., Намсараев Б.Б. и др. // Микробиология. 2003. 72. № 2. С. 228.
5. Герасименко Л.М., Митюшина Л.Л., Намсараев Б.Б. // Микробиология. 2002. 72. № 1. С. 84.
6. Дембицкий В.М., Дор И., Шкроб И. // Биохимия. 2000. 65. № 12. С. 1666.
7. Дембицкий В.М., Сребник М. // Биохимия. 2002. 67. № 1. С. 1545.
8. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Кевбрин В.В. // Микробиология. 1999. 68. №5. С. 579.
9. Кевбрин В.В. // Материалы Всероссийской конференции «Биоразнообразие и функционирование микробных сообществ водных и наземных систем Центральной Азии». Улан-Удэ, 2003. С. 70.
10. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М., 1989. С. 46.

Поступила в редакцию 09.09.04

DETERMINATION OF AMINO ACID COMPOUNDS OF MICROBIC MATS IN THE BAIKAL ECOSYSTEM REGION BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

O.M. Kalashnikova, E.N. Shapovalova, D.D. Barxutuva, V.V. Xaxinov, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

Dominated amino acids (arginine, serine, tryptophane, phenylalanine) of the microbial mats of the alkaline Transbaikal Uro and Garga hot springs, the Romanovsky cold mineral spring and Khilganta, Verkhnee Beloe soda lakes were determined by thin-layer chromatography. The mobile phase composition influence on the selectivity and efficiency of the amino acids separation was investigated. Arginine, serin, tryptophan and phenylalanine contents in the microbial mats under investigation were evaluated.