

УДК 577.1 577.15

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ЦЕФАЛОСПОРИНА С С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ

И.В. Голубев^{1,2}, Н.В. Комарова^{2,3}, О.Е. Скиргелло^{1,2}, Т.А. Осипова¹, В.И. Тишков^{1,2,3,*}

(¹кафедра энзимологии химического факультета МГУ; ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Половину общего количества цефалоспориновых антибиотиков разных поколений производят из 7-аминоцефалоспоровой кислоты, которую до недавнего времени получали с помощью органического синтеза. На смену органическому синтезу постепенно приходит двустадийный биокаталитический процесс, на первой стадии которого происходит ферментативное окисление природного антибиотика цефалоспорина С под действием оксидазы D-аминокислот (ДААО). Стандартная методика определения активности ДААО основана на определении концентрации выделяющегося пероксида с помощью сопряженной реакции с пероксидазой из корней хрена. Поскольку в процессе окисления цефалоспорина С пероксид водорода вступает в неферментативную реакцию с промежуточным продуктом, то для определения активности фермента наиболее корректно следить за убылью субстрата с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В данной работе мы провели оптимизацию методики определения концентрации цефалоспорина С с помощью ВЭЖХ в реакционной смеси в процессе его окисления оксидазой D-аминокислот. Используя разработанную методику, мы определили каталитические параметры для ДААО из дрожжей *Trigonopsis variabilis* дикого типа и одной из ее мутантных форм в реакции окисления цефалоспорина С.

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, *Trigonopsis variabilis*, цефалоспорин С, каталитические параметры, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Цефалоспориновые антибиотики на данный момент являются одними из наиболее востребованных антибактериальных препаратов в силу того, что они обладают широким спектром антибактериального действия, низкой токсичностью, а кроме того, к ним реже возникает антибиотикорезистентность, чем к пенициллиновым антибиотикам. Около половины цефалоспоринов разных поколений производят с использованием 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-АЦК) [1]. Получение 7-АЦК проводят в основном химическим гидролизом природного антибиотика цефалоспорина С. Этот метод имеет ряд недостатков: низкий выход целевого продукта, использование большого количества органических растворителей, большие энергозатраты и т.д. [2]. В последнее время наблюдается постепенный переход на биокаталитический процесс получения 7-АЦК с помощью двухферментного процесса, схема которого изображена на рис. 1.

На первой стадии процесса используется оксидаза D-аминокислот (ДААО) [3–5]. Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3) является FAD-содержащим ферментом, который стереоспецифично окисляет D-изомеры

аминокислот в соответствующие им α -кетокислоты [6]. В результате реакции окисления цефалоспорина С получается промежуточное соединение – α -кетoadипил-7-АЦК (КА-7-АЦК), которое затем неферментативно декарбоксилируется в глутарил-7-АЦК (ГЛ-7-АЦК) под действием пероксида водорода, образовавшегося в результате ферментативной реакции. Следует отметить, что поскольку неферментативная стадия протекает не полностью из-за частичного разложения пероксида водорода, то в реальных процессах для ее завершения в реакционную смесь добавляют дополнительные количества пероксида водорода. Наиболее перспективным ферментом для применения в описанном выше процессе является ДААО из *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO), которая обладает наиболее высокой активностью с цефалоспорином С и наилучшей температурной стабильностью среди известных оксидаз D-аминокислот [4, 7].

Для контроля процесса окисления цефалоспорина С в ходе получения 7-АЦК требуется оценивать скорость и полноту протекания реакции. Кроме того, для выбора наилучшего фермента необходимо про-

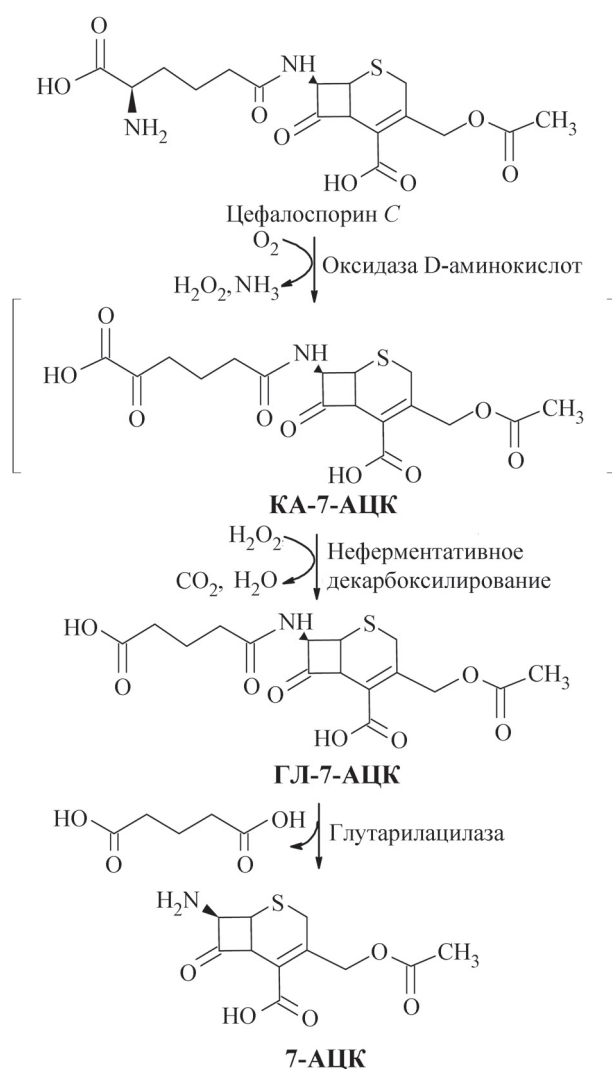


Рис. 1. Двухферментный процесс получения 7-АЦК из цефалоспорина С. На первой стадии происходит окисление цефалоспорина С, катализируемое оксидазой D-аминокислот (7-АЦК – 7-аминоцефалоспороновая кислота, КА-7-АЦК – α-кетоадипил-7-аминоцефалоспороновая кислота, ГЛ-7-АЦК – глутарил-7-аминоцефалоспороновая кислота)

водить сравнение каталитических параметров мутантных TvDAAO и фермента дикого типа с цефалоспорином С. В отличие от канонических субстратов (D-аминокислот) задача определения каталитических параметров DAAO с цефалоспорином С является нетривиальной, поскольку образующийся пероксид водорода вступает в неферментативную реакцию с продуктом КА-7-АЦК, что делает некорректным использование стандартных методик определения активности DAAO, основанных на использовании сопряженной ферментативной реакции с участием пероксидазы из корней хрена [8, 9], однако в литературе встречаются примеры использования такой методики, что вызывает сомнение в надежности полученных данных [10]. Еще одной особенностью данной реакции является то, что

неферментативное окисление КА-7-АЦК пероксидом водорода протекает не полностью, что не позволяет следить за скоростью процесса по накоплению продукта реакции ГЛ-7-АЦК [7].

Для определения активности DAAO с цефалоспорином С наиболее подходящим является метод, основанный на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [11, 12], поскольку он позволяет определять содержание не только цефалоспорина С, но и промежуточных и конечных продуктов и таким образом следить за протеканием реакции [11, 12]. Однако точное воспроизведение методик ВЭЖХ – непростая задача, так как на рынке имеется очень большой выбор колонок для обращенно-фазовой хроматографии, носители для которых производятся разными фирмами по оригинальным методикам. В результате не всегда удается достичь четкого воспроизведения условий анализа. Кроме того, такие методики должны быть адаптированы с учетом каталитических свойств получаемых мутантов. Цель данной работы – оптимизация методики определения каталитических параметров оксидазы D-аминокислот в реакции окисления цефалоспорина С с помощью ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Получение препаратов TvDAAO

TvDAAO дикого типа и ее мутантные формы, используемые для оптимизации методики и для определения каталитических параметров в реакции окисления цефалоспорина С, были получены, охарактеризованы и изучены по методикам, описанным в [9]. Концентрацию активного фермента определяли спектрофотометрически по количеству FAD, используя поглощение на длине волны 455 нм и коэффициент молярного поглощения $10800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение цефалоспорина С и продуктов его окисления проводили в изократическом режиме на приборах «Gilson 303» (США) или «Agilent 1100 Series» (США) на колонке с Силасорб С-18 (4,0×125 мм; размер носителя 5 мкм, «ХроМасс», Россия). Детекцию аналитического сигнала проводили на длине волны 254 нм. В качестве элюента использовали раствор ацетата натрия с ацетонитрилом при определенном рН. В ходе оптимизации состава элюента варьировали концентрацию ацетата натрия (10–30 мМ), ацетонитрила (1–6 об.%) и рН (3,9–5,9 ед. рН). Объем пробы, наносимой на колонку, составлял 20 мкл. В качестве пробы использовали реакционную смесь, полученную при окислении цефалоспорина С (исходная концентрация 20 мМ) с

помощью TvDAAO (5 мкг) после остановки реакции добавлением 50 мкл 0,1 М раствора HCl. Скорость элюции 1 мл/мин.

Определение кинетических параметров реакции с цефалоспорином С

Ферментативную реакцию окисления цефалоспорина С проводили в открытой пластиковой пробирке (2 мл) при перемешивании (термомиксер «Eppendorf», 1000 об/мин, 30°C). Реакционная смесь (общий объем 500 мкл) содержала 20 мМ цефалоспорина С в 0,1 М КФБ (рН 8,0), насыщенном кислородом. Реакцию запускали добавлением в реакционную смесь 25 мкл раствора TvDAAO (общее количество 5 мкг). Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы объемом 50 мкл, останавливали реакцию равным объемом 0,1М HCl и анализировали состав смеси с помощью оптимизированной методики, описанной выше. Для полной конверсии промежуточного продукта (α -кетoadипил-7-аминоцефалоспорановой кислоты) в целевой (глутарил-7-аминоцефалоспорановую кислоту) в реакционную смесь после завершения ферментативной реакции добавляли пероксид водорода до концентрации 0,05 мас.%. Содержание цефалоспорина С в реакционной смеси определяли из полученных хроматограмм по величине площади пика, отвечающего исходному субстрату. Величины $k_{кат}$ и K_M рассчитывали, используя уравнения интегральной кинетики [13]. Математическую обработку данных проводили с помощью программы Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation).

Результаты и обсуждение

Подбор оптимальных условий для анализа реакционной смеси процесса окисления цефалоспорина С оксидазой D-аминокислот проводили, варьируя рН элюента, концентрации ацетата натрия и концентрации ацетонитрила. Первым этапом был подбор оптимального значения рН. Элюент содержал 20 мМ CH₃COONa и 2% ацетонитрила. Значения рН варьировали в диапазоне 3,9–5,9 ед. с шагом 0,5 ед. Оказалось, что значение рН элюента не влияет на время удерживания компонентов реакционной смеси и селективность их разделения. В качестве оптимального было выбрано рН 4,9, поскольку из литературы известно, что при таком значении проводят ВЭЖХ на используемом в данной работе носителе [14]. Для подбора оптимального содержания ацетонитрила в элюенте были использованы 20 мМ растворы ацетата натрия (рН 4,9) с объемной концентрацией ацетонитрила 1, 2, 4 и 6%. Уменьшение концентрации ацетонитрила приводит к увеличению времени удерживания всех разделяемых компонентов и лучшему разделению пиков. В результате для опти-

мизации ионной силы элюента были выбраны концентрация ацетонитрила 1% и рН 4,9. Концентрация ацетата натрия составляла 10; 20 и 30 мМ. С ростом ионной силы происходит также увеличение времени удерживания компонентов смеси и улучшается разделение пиков. Таким образом, в результате оптимизации условий элюции компонентов реакционной смеси, полученной в результате окисления цефалоспорина С оксидазой D-аминокислот, был выбран оптимальный состав элюента на основе разделения пиков компонентов и длительности эксперимента: 30 мМ CH₃COONa и 1% ацетонитрила (рН 4,9). Полученные условия отличаются от приводимых в литературе – 20 мМ CH₃COONa и 2% ацетонитрила [14].

Оптимизированную методику определения концентрации цефалоспорина С в реакционной смеси использовали для определения каталитических параметров TvDAAO дикого типа и ее мутантной формы Phe258Ala в реакции окисления цефалоспорина С. Из рис. 2 видно, что по мере расходования исходного субстрата наблюдается накопление КА-7-АЦК и ГЛ-7-АЦК, причем, как отмечалось выше, полного превращения промежуточного соединения КА-7-АЦК в конечный продукт ГЛ-7-АЦК не происходит. Однако при добавлении в реакционную смесь экзогенного H₂O₂ до концентрации 0,05 мас.% происходит полная конверсия КА-7-АЦК в ГЛ-7-АЦК (рис. 2, верхняя кривая на хроматограмме). Аналогичные хроматограммы были получены для мутантной формы TvDAAO Phe258Ala. Поскольку в результате окисления цефалоспорина С не происходит количественного превращения промежуточного продукта

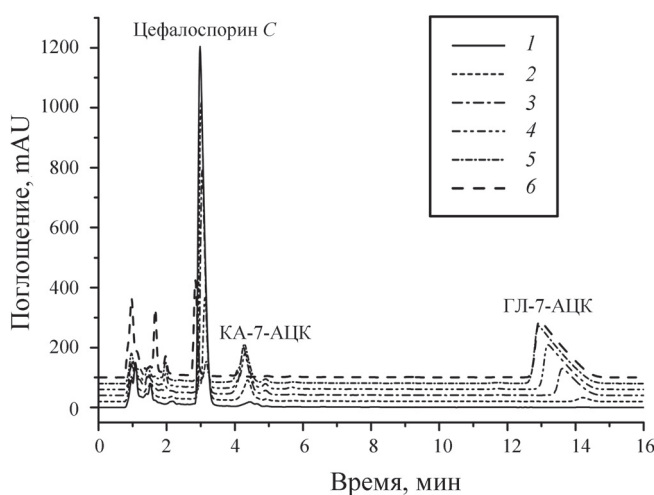


Рис. 2. Хроматограмма реакционной смеси при окислении цефалоспорина С, катализируемого TvDAAO дикого типа, при разном времени протекания реакции, мин: 1 – 0, 2 – 4, 3 – 5, 4 – 6. Условия: 10 мкг/мл фермента; 20 мМ цефалоспорина С; 0,1 М КФБ; рН 8,0; 30°C; скорость элюции 1 мл/мин

в конечный, наиболее корректным способом контроля протекания реакции является слежение за изменением концентрации исходного субстрата. Кинетические кривые окисления цефалоспорина *C* представлены на рис. 3, откуда видно, что TvDAAO Phe258Ala имеет более низкую каталитическую активность, чем фермент дикого типа. Используя полученные зависимости концентрации цефалоспорина *C* от времени, мы рассчитали кинетические параметры (константу Михаэлиса K_M и максимальную скорость V_M) процесса окисления цефалоспорина *C* с помощью анализа интегральной кинетики процесса. В соответствии с методом Уокера–Шмидта для обработки экспериментальных данных используют уравнение, которое может быть легко получено путем интегрирования дифференциальной формы уравнения Михаэлиса–Ментен [13]:

$$\frac{[P]}{t} = V_m - \frac{K_M}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}, \quad (1)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, $[P]$ – концентрация продукта реакции в момент времени t .

На рис. 4 представлены результаты обработки экспериментальных данных окисления цефалоспорина *C*, катализируемого TvDAAO дикого типа, согласно уравнению (1). Величина отсекаемого на оси ординат отрезка и тангенс угла наклона прямой (рис. 4) соответствуют значениям V_M и K_M соответственно. Каталитическая константа $k_{\text{кат}}$ была получена делением значения V_M на концентрацию активного фермента. Значения каталитической константы и константы Михаэлиса для TvDAAO дикого типа и ее мутантной формы в реакции окисления цефалоспорина *C* приведены в таблице. Для TvDAAO Phe258Ala константа Михаэлиса увеличилась по сравнению с ферментом дикого типа в 1,6 раза, а каталитическая константа

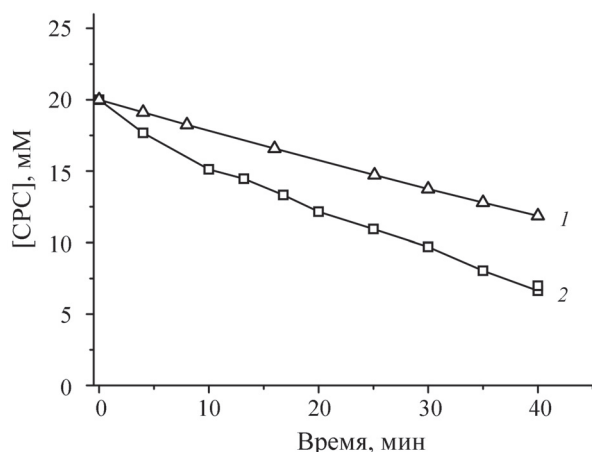
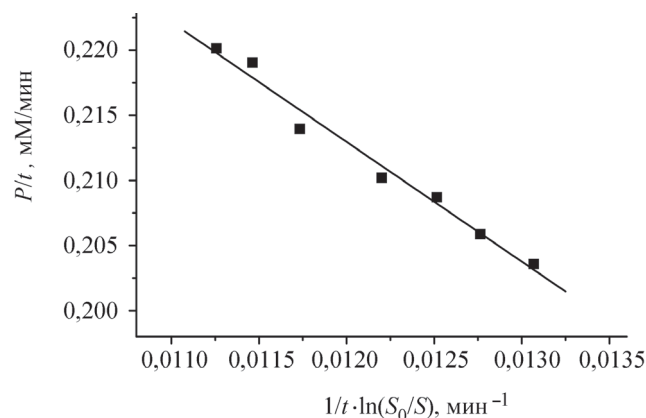


Рис. 3. Кинетика окисления цефалоспорина *C*, катализируемого TvDAAO Phe258Ala (1) и ферментом дикого типа (2). Условия: 20 мМ цефалоспорина *C*; 10 мкг/мл фермента; 0,1 М КФБ; 30°C; pH 8,0



Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	4,81984E-6		
Pearson's r	-0,98998		
Adj. R-Square	0,97608		
		Value	Standard Error
E	a	0,32332	0,00713
E	b	-9,19649	0,58651

Рис. 4. Линеаризация экспериментальных данных для TvDAAO Phe258Ala в координатах Уокера–Шмидта (20 мМ цефалоспорина *C*; 10 мкг/мл фермента; 0,1 М КФБ; pH 8,0; 30°C)

Кинетические параметры окисления цефалоспорина *C*

Форма фермента	$k_{\text{кат}}, \text{c}^{-1}$	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M, \text{мМ}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
TvDAAO дикого типа	$32,0 \pm 1,1$	$5,7 \pm 0,5$	5,7
TvDAAO Phe258Ala	$21,2 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,6$	2,3

уменьшилась в 1,5 раза. В результате каталитическая эффективность $k_{\text{кат}}/K_M$, показывающая суммарное влияние двух параметров, уменьшилась почти в 2,5 раза. Стоит отметить, что каталитические параметры для фермента дикого типа несколько отличаются от литературных данных [10, 15]. Данная методика была использована также для определения каталитических параметров других мутантов TvDAAO, полученных в результате направленного мутагенеза фермента по остаткам Phe54, Cys108 и Phe258 [9, 16, 17]. Было показано, что некоторые мутанты по своей каталитической эффективности превосходят в несколько раз TvDAAO дикого типа.

Таким образом, в данной работе мы провели оптимизацию методики для определения цефалоспорина *C* в многокомпонентной реакционной смеси в процессе окисления цефалоспорина *C* с помощью оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis*. Оптимизированная методика позволяет следить не только за изменением концентрации цефалоспорина *C* в ходе реакции, но и за образованием промежуточного и конечного продуктов. Используя данную методику, мы проанализировали реакционные смеси для опи-

санного процесса с участием TvDAAO дикого типа и ее мутантной формы Phe258Ala. На основании полученных данных были определены каталитические па-

раметры этих ферментов (каталитические константы, константы Михаэлиса), а также рассчитана каталитическая эффективность.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 11-04-00959-а и проект № 14-04-00865-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barber M., Giesecke U. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. **88**. P. 179.
2. Таранцева К.Р., Яхкин М.И. // Анализ технологий синтеза 7-аминоцефалоспориновой кислоты и выбор оптимальной безопасной промышленной технологии. М., 2009.
3. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // Biochemistry (Mosc.). 2008. **73**. P. 1511.
4. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. **78**. P. 1.
5. Pollegioni L., Molla G. // Trends in Biotechnol. 2011. **29**. P. 276.
6. Tishkov V., Khoronenkova S. V. // Biochemistry (Mosc.). 2005. **70**. P. 40.
7. Хороненкова С.В. Дис. ... канд.хим.наук. М., 2008.
8. Childs R.E., Bardsley W.G. // Biochem. J. 1975. **145**. P. 93.
9. Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Чубарь Т.А., Тишков В.И. // Биохимия. 2012. **77**. P. 1424.
10. Wong K.-S., Fong W.-P., Tsang P.W.-K. // New biotechnol. 2010. **27**. P. 78.
11. Holzhauser-Rieger K., Zhou W., Schugerl K. // J. of Chromatogr. 1990. **499**. P. 609.
12. Usher J.J., Lewis M., Hughes D.W. // Anal. Biochem. 1985. **149**. P. 105.
13. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
14. Khang Y.-H., Kim I.-W., Hah Y.-R., Hwangbo J.-H., Kang K.-K. // Biotechnol. Bioeng. 2003. **82**. P. 480.
15. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // Biotechnol. Progress. 2004. **20**. P. 467.
16. Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Тишков В.И. // Изв. Акад. наук. Серия Химическая. 2012. **61**. С. 1472
17. Тишков В.И., Комарова Н.В., Савин С.С., Савина Л.И., Балдин С.М. / Мутантная оксидаза D-аминокислот (варианты). // Положительное решение от 22.10.2013 на заявку № 2012140816 о выдаче патента Российской Федерации на изобретение.

Поступила в редакцию 11.11.13

OPTIMIZATION OF HPLC TECHNIQUE OF DETERMINATION OF CATALYTIC PARAMETERS OF D-AMINO ACID OXIDASE IN REACTION OF CEPHALOSPORIN C OXIDATION

I.V. Golubev^{1,2}, N.V. Komarova^{2,3}, O.E. Skirgello^{1,2}, T.A. Osipova¹, V.I. Tishkov^{1,2,3*}

(¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty; ²Innovations and High Technologies MSU Ltd; ³A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences)

Half of the amount of cephalosporin antibiotics of different generations is produced from 7-aminocephalosporanic acid, which is prepared with organic synthesis so far. In place of the organic synthesis is gradually coming two-step enzymatic process. The first step is the enzymatic oxidation of natural antibiotic cephalosporin C with D-amino acid oxidase. Yeast enzymes are used for this purpose due to the highest activity towards cephalosporin C. The standard technique of determining of the activity of D-amino acid oxidase is based on determination of the concentration of released hydrogen peroxide using horseradish peroxidase. During cephalosporin C oxidation hydrogen peroxide is involved in spontaneous non-enzymatic reaction with intermediate product. So the most correct for the activity determination is to monitor for the substrate consumption with high performance liquid chromatography. In this paper we have optimized HPLC technique of determination of cephalosporin C concentration during its oxidation with D-amino acid oxidase in the reaction mixture. Using optimized technique we have determined catalytic parameters for wild type and mutant D-amino acid oxidase with cephalosporin C.

Key Words: D-amino acid oxidase, *Trigonopsis variabilis*, Cephalosporin C, catalytic parameters, high performance liquid chromatography.

Сведения об авторах: Голубев Игорь Владимирович – аспирант химического факультета МГУ, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; Комарова Наталья Владимировна – науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; Скиргелло Ольга Евгеньевна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ; Осипова Татьяна Алексеевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ».