

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 1, No. 1, pp. 36-59, 2014

DOI: 10.13187/ejchr.2014.1.36
www.ejournal14.com



UDC 579.871.08:577.112.385.4.08

Microbiological Synthesis of ^2H - and ^{13}C -Labeled Amino Acids and Proteins With Various Levels of Isotopic Enrichment

¹ Oleg Mosin
² Ignat Ignatov
³ Dmitry Skladnev
⁴ Vitaly Shvets

¹ Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)
103316, Moscow, Talalikhina ulitza, 33
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

² The Scientific Research Center of Medical Biophysics (SRC MB), Bulgaria
Professor, D. Sc., director of SRC MB.
1111, Sofia, N. Kopernik street, 32
E-mail: mbioph@dir.bg

³ Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms "Genetika", Russian Federation
Professor, D. Sc (Biology), leading scientist of "Genetika"
117545, Moscow, 1st Dorozhny proezd, 1
E-mail: genetika@genetika.ru

⁴ M.V. Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Russian Federation
Academician of Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry), head of the department of biotechnology and nanobiotechnology
119571, Moscow, Vernadskogo avenue, 86
E-mail: mitht@mitht.ru

Abstract

By the method of microbiological synthesis were obtained and analyzed by electron impact mass-spectrometry the evaluation of ^2H and ^{13}C enrichment levels of secreted amino acids of methylotrophic bacteria *Brevibacterium methylicum* and *Methylobacillus flagellatum*, and amino acid residues of total protein obtained from media containing as a source of stable isotopes [^2H]methanol, [^{13}C]methanol and $^2\text{H}_2\text{O}$. It was also performed the incorporation of *L*-[2,3,4,5,6 - ^2H]phenylalanine, *L*-[3,5 - ^2H]tyrosine and *L*-[2,4,5,6,7 - ^2H]tryptophan in bacteriorhodopsin synthesised in purple membranes of photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium ET 1001*. For mass-spectrometric analysis the multicomponental mixtures of ^2H - and ^{13}C -labeled amino acids, derived from cultural media and protein hydrolysates after hydrolysis in 6 M ^2HCl (3 % phenol) and 2 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ were modified into *N*-benzyloxycarbonyl-derivatives of amino acids as well in methyl esters of *N*-dansyl-derivatives of amino acids, which were preparatively separated using a method of reverse-phase HPLC. ^2H - and ^{13}C -labeled amino acids represented the mixtures

differing in quantities of isotopes incorporated into molecule. The levels of ^2H and ^{13}C enrichment of secreted amino acids and amino acid residues of protein were found to vary from 20,0 atom% to *L*-leucine/isoleucine up to 97,5 atom% for *L*-alanine depending on concentration of ^2H - and ^{13}C -labelled substrates.

Keywords: stable isotopes; methylotrophic bacteria; halobacteria; isotope labeled amino acids; bacteriorhodopsin.

Введение

Обогащение молекул стабильными изотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) является важным методом в разнопрофильных биохимических и метаболических исследованиях с использованием аминокислот и других биологически активных соединений (БАС) [1]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения, включая ЯМР [2], ИК- и лазерную спектроскопию [3] и масс-спектрометрию [4]. Развитие этих методов детекции стабильных изотопов за последние годы позволило повысить эффективность биологических исследований, а также изучать структуру и механизм действия клеточных БАС на молекулярном уровне. В частности, ^2H - и ^{13}C -меченные аминокислоты применяются для изучения пространственной структуры и конформационных изменений белков, взаимодействия белковых молекул, а также в химических синтезах некоторых изотопно-меченных соединений на их основе [5]. Например, изотопно-меченый *L*-фенилаланин используется в синтезах пептидных гормонов и нейротрансмиттеров [6].

Важным моментом в исследованиях с применением меченых аминокислот, является их доступность. ^2H - и ^{13}C -меченные аминокислоты могут быть получены с использованием химических, ферментативных и микробиологических методов. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и меченых субстратов и приводят к продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*-энантиомеров, для разделения которых требуются специальные методы [7]. Тонкие химические технологии синтеза ^2H - и ^{13}C -меченых аминокислот связаны с использованием комбинации химических и ферментативных подходов [8].

Микробиология предлагает альтернативный химическому синтезу метод получения аминокислот, меченных стабильными изотопами, который приводит к высоким выходам синтезируемых продуктов, к эффективному включению стабильных изотопов в молекулы, и к сохранению природной конфигурации синтезируемых [^2H , ^{13}C]соединений. При биосинтетическом получении ^2H - и ^{13}C -меченых аминокислот используют несколько подходов, один из которых заключается в равномерном обогащении синтезируемых соединений по всему углеродному скелету молекулы за счёт выращивания штаммов продуцентов на селективных средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов [^{13}C]метанол, [^2H]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$ [9, 10]. Этот подход включает также комплексное использование химических компонентов биомассы, выращенной на [^2H , ^{13}C]ростовых субстратах и последующего выделения и фракционирования целевых ^2H - и ^{13}C - меченых соединений. Другой подход заключается в сайт-специфическом обогащении аминокислот по определённым положениям молекул за счёт ассимиляции клеткой изотопно-меченых предшественников, например, [1,4- ^{13}C]сукцината, [1, 2- ^{13}C]ацетата и [1- ^{13}C]лактата [11].

Настоящая работа является продолжением исследований, направленных на биосинтетическое получение ^2H - и ^{13}C -меченых аминокислот за счёт утилизации низкомолекулярных меченых субстратов – [^2H]метанола, [^{13}C]метанола и $^2\text{H}_2\text{O}$ в клетках микроорганизмов и реализацию возможности мониторинга стабильных изотопов методом масс-спектрометрии электронного удара. Чувствительность масс-спектрометрии составляет 10^{-9} – 10^{-11} моль, что существенно выше, чем при использовании ИК- и ЯМР-спектроскопии. Данный метод в сочетании с обращённо-фазовой ВЭЖХ хорошо зарекомендовал себя для исследования уровня изотопного обогащения молекул [^2H , ^{13}C]аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, каковыми являются образцы культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот и гидролизаты суммарных белков биомасс, полученные с минимальных ростовых сред, содержащих стабильные изотопы.

Материалы и методы

В работе использовали *D,L*-аминокислоты (Reanal, Венгрия), аденозин- и уридин-5-монофосфаты (Sigma, США), додецилсульфат натрия (ДДС) (Chemapol, Словакия). *L*-[2,3,4,5,6-²H₅]фенилаланин (90 ат.% ²H), *L*-[3,5-²H₂]тирозин (96 ат.% ²H) и *L*-[2,4,5,6,7-²H₅]триптофан (98 ат.% ²H) (способы получения указаны в работе [12]). Для синтеза производных аминокислот использовали *N*-5-(диметиламино)нафталин-1-сульфохлорид (дансилхлорид) (Sigma, США), бензилоксикарбонилхлорид (Войковский химзавод, РФ) и диазометан, получаемый из *N*-нитрозометилмочевины (Merck, Германия).

Исследования проводили с генетически маркированными штаммами бактерий, полученными из коллекции культур Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов:

- 1) *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В 5652 – *L*-лейцин-зависимый штамм факультативных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-фенилаланина;
- 2) *Methylobacillus flagellatum* КТ – *L*-изолейцин-зависимый штамм облигатных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-лейцина;
- 3) *Halobacterium halobium* ET 1001 – пигмент-содержащий штамм фотоорганотрофных галобактерий, способный синтезировать бактериородопсин;

Выращивание метилотрофных бактерий *B. methylicum* и *M. flagellatum* осуществляли на минеральной среде М9 в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл с наполнением средой 50 мл по методике [13], используя в качестве источников стабильных изотопов [²H]метанол, [¹³C]метанол и ²H₂O в присутствии *L*-лейцина для *B. methylicum* и *L*-изолейцина для *M. flagellatum* в концентрациях 10 мг/л. Клетки отделяли центрифугированием на центрифуге Т-24 (“Heraeus Sepatech”, Германия) (10000 г, 20 мин). В культуральной жидкости анализировали секретируемые аминокислоты.

Для выделения фракции суммарных белков биомассы клетки дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием (10000 г, 20 мин), экспонировали ультразвуком при 40 кГц (3×15 мин) и центрифугировали. Полученный осадок (10 мг) после отделения липидов и пигментов смесью органических растворителей хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) использовали в качестве фракции суммарных белков биомассы.

Для биосинтеза дейтериймеченого бактериородопсина использовали синтетическую среду, содержащую 18 аминокислот, в которой немеченые *L*-аминокислоты фенилаланин, тирозин и триптофан были заменены их дейтерированными аналогами – *L*-[2,3,4,5,6-²H]фенилаланином, *L*-[3,5-²H]тирозином, и *L*-[2,4,5,6,7-²H]триптофаном (количества компонентов приведены в г/л): (*D,L*-аланин – 0,43; *L*-аргинин – 0,4; *D,L*-аспарагиновая кислота – 0,45; *L*-цистеин – 0,05; *L*-глутаминовая кислота – 1,3; *L*-глицин – 0,06; *D,L*-гистидин – 0,3; *D,L*-изолейцин – 0,44; *L*-лейцин – 0,8; *L*-лизин – 0,85; *D,L*-метионин – 0,37; *L*-фенилаланин – 0,26; *L*-пролин – 0,05; *D,L*-серин – 0,61; *D,L*-треонин – 0,5; *L*-тирозин – 0,2; *D,L*-триптофан – 0,5; *D,L*-валин – 1,0); нуклеотиды (аденозин-5-монофосфат – 0,1; уридин-5 монофосфат – 0,1); соли (NaCl – 250; MgSO₄·7H₂O – 20; KCl – 2; NH₄Cl – 0,5; KNO₃ – 0,1; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; цитрат натрия – 0,5; MnSO₄·H₂O – 3·10⁻⁴; CaCl₂·6H₂O – 0,065; ZnSO₄·7H₂O – 4·10⁻⁵; FeSO₄·7H₂O – 5·10⁻⁴; CuSO₄·5H₂O – 5·10⁻⁵); глицерин – 1,0; ростовые факторы (биотин – 0,1·10⁻³; фолиевая кислота – 10·10⁻³; витамин В₁₂ – 2·10⁻⁴).

Для выделения фракции пурпурных мембран клетки, полученные после отделения культуральной жидкости и двукратной промывки дистиллированной водой (100–150 мг), суспендировали в 100 мл 0,1 М буфера трис-HCl (pH = 7,6), добавляли 1 мг дезоксирибонуклеазы I и инкубировали в течении 5–6 ч при 37 °С, затем разбавляли дистиллированной водой до 200 мл и инкубировали 15 ч при 4 °С. Осадок промывали дистиллированной водой с последующим отделением водной фракции до получения бесцветных промывных вод. Чистоту полученной суспензии пурпурных мембран (в H₂O) контролировали на спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) по соотношению полос поглощения при λ = 280/568 нм (молярные коэффициенты светопоглощения: ε₂₈₀ = 1,1·10⁵ М⁻¹ см⁻¹ [14] и ε₅₆₈ = 6,3·10⁴ М⁻¹ см⁻¹ [15]).

Бактериородопсин выделяли по методу Остерхельта [16], усовершенствованного авторами, за счет коллоидного растворения (солюбилизации) бактериородопсин-содержащей фракции пурпурных мембран (50 мг) в 2 мл 0,5 % раствора ДДС в H_2O и осаждения белка 5-ти кратным избытком метанола на холоду (0 °C). Выход бактериородопсина составил 17–20 мг.

Электрофорез бактериородопсина проводили в 12,5 % ПААГ с 0,1 % ДДС. Образцы для электрофореза готовили стандартным способом (протокол фирмы LKB, Швеция). Для количественного определения содержания синтезированного в клетке белка проводили сканирование прокрашенного в растворе Кумасси-голубой R-250 электрофоретического геля на лазерном денситометре CDS-200 (Beckman Coulter, США).

Липиды и пигменты экстрагировали смесью хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) по методу Блайя и Дайера [17].

Гидролиз белка проводили 6 М HCl (3 % фенол в H_2O) или 2 М $Ba(OH)_2$ (110 °C, 24 ч).

Для синтеза N-Dns- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот к 4–5 мг лиофилизированных препаратов культуральной жидкости и белковых гидролизатов в 1 мл 2 М $NaHCO_3$, pH = 9–10 порциями при перемешивании добавляли 25,5 мг дансилхлорида в 2 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при перемешивании при $t = 40$ °C, затем подкисляли 2 М HCl до pH = 3,0 и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до значения pH = 7,0, сушили безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли при 10 мм. рт. ст.

Синтез метиловых эфиров N-Dns- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот осуществляли из диазометана. Для получения диазометана к 20 мл 40 % KOH в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г влажной нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течении 15–20 мин. После окончания интенсивного газовыделения эфирный слой отделяли, промывали ледяной водой до pH = 7,0, сушили безводным сульфатом натрия и использовали для обработки препаратов N- $[^2H, ^{13}C]$ дансиламинокислот в составе культуральной жидкости или гидролизатов суммарных белков биомассы.

Для синтеза N-Cbz- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот к 1,5 мл охлажденного до 0 °C раствора культуральной жидкости (50 мг) или белковых гидролизатов (4–5 мг) в 4 М NaOH добавляли порциями при перемешивании 2 мл 4 М NaOH и 28,5 мг бензилоксикарбонилхлорида. Реакционную смесь выдерживали при 0 °C, перемешивали 3 ч, подкисляли 2 М HCl до pH = 3,0 и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до pH = 7,0, сушили безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли при 10 мм. рт. ст.

ТСХ производных 2H - и ^{13}C -меченых аминокислот осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (Словакия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–уксусная кислота, 10:1:0,3 (А) для N-Cbz- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот и хлороформ–метанол–ацетон, 7:1:1 (Б) для метиловых эфиров N-Dns- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот.

N-Cbz- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислоты детектировали по поглощению при $\lambda = 254$ нм. Метиловые эфиры N-Dns-аминокислот детектировали по флуоресценции в УФ-свете.

Аналитическое и препаративное разделение смеси N-Cbz- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот культуральной жидкости и белковых гидролизатов осуществляли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ.

Аналитическое и препаративное разделение метиловых эфиров N-Dns- $[^2H, ^{13}C]$ аминокислот проводили методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer (“Knauer”, Германия), снабженным УФ-детектором и интегратором CR-3A (“Shimadzu”, Япония). В качестве неподвижной фазы использовали Serapon SGX, 18,7 мкм, 150×3,3 мм (“Kova”, Словакия). Элюирование проводили в системе растворителей: (А) – вода–трифторуксусная кислота (100:0,1–0,5, %) и (Б) – ацетонитрил–трифторуксусная кислота (100:0,1–0,5, %). Использовали градиентное элюирование: от 0 % до 60 % Б 60 мин, от 60 % до 100 % Б 5 мин, 5 мин 100 % Б, от 100 % до 0 % Б 5 мин, 10 мин 0 % Б.

Ионнообменную хроматографию белковых гидролизатов осуществляли на приборе Biotronic LC 5001 (“Eppendorf–Nethleler–Hinz”, Германия) (Германия); 230×3,2 мм с сульфированной стирольной смолой UR-30; рабочее давление 50–60 атм; скорость подачи

натрий-цитратного буфера 18,5; нингидрина – 9,25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Секретируемый *L*-фенилаланин и *L*-лейцин определяли на спектрофотометре Beckman DU- 6 (США) при $\lambda = 540$ нм, в образцах культуральной жидкости, объемом 10 мкл после её обработки нингидрином.

Масс-спектры электронного удара производных аминокислот регистрировали на приборе MB-80 A (Hitachi, Япония) с двойным фокусированием при ионизирующем напряжении 70 эВ, ускоряющем напряжении 8 кВ и температуре катодного источника 180–200 °С).

Обсуждение результатов. Объектами исследования служили полученные в результате мутагенеза *L*-фенилаланин-продуцирующий штамм факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, ассимилирующий метанол по рибулозо-5-монофосфатному циклу ассимиляции углерода, и *L*-лейцин-продуцирующий штамм облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus flagellatum*, реализующий 2-кето-3-дезоксиглюконат-альдолазный вариант рибулозо-5-монофосфатного цикла ассимиляции углерода. Для компенсации ауксотрофности по *L*-лейцину и *L*-изолейцину эти аминокислоты добавляли в ростовые среды в протонированном виде. Уровни накопления *L*-фенилаланина и *L*-лейцина в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов достигали величины 0,8 и 1,0 г/л соответственно [18, 19]. Включение дейтерия в молекулы секретируемых аминокислот и суммарных белков биомассы осуществляли за счёт выращивания штамма *B. methylicum* на минеральных средах M9 с $^2\text{H}_2\text{O}$ и обычным метанолом, так как уровень включения ^2H в молекулы аминокислоты за счёт ассимиляции [^2H]метанола незначителен.

Поскольку в клетке происходит ассимиляция водорода (дейтерия) из H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$) среды, мы подбирали условия включения дейтерия в молекулы аминокислот и белков при ступенчатом возрастании концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах, как показано в таблице 1. Рост бактерий на $^2\text{H}_2\text{O}$ -содержащих средах характеризуется увеличением продолжительности лаг-фазы, времени клеточной генерации и снижением выходов микробной биомассы (табл. 1), поэтому было необходимо проводить адаптацию бактерий к $^2\text{H}_2\text{O}$.

Метод адаптации штамма *B. methylicum* к росту на $^2\text{H}_2\text{O}$ при сохранении способности к биосинтезу *L*-фенилаланина описан в работе [20]. В данной работе были исследованы образцы культуральной жидкости *B. methylicum* и гидролизаты биомассы, полученные в ходе многоступенчатой адаптации бактерий к тяжёлой воде на минимальных минеральных средах M9 с различным содержанием $^2\text{H}_2\text{O}$ (от 24,5 до 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$). Поскольку данный штамм метилотрофных бактерий удалось адаптировать к росту на $^2\text{H}_2\text{O}$, исследование уровней включения дейтерия в молекулы аминокислот представлялось наиболее интересным.

В отличие от выращивания на $^2\text{H}_2\text{O}$ -среде, где необходимо проводить клеточную адаптацию к дейтерию, при получении [^{13}C]аминокислот за счет ассимиляции $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ данный этап не является обязательным, поскольку этот изотопный субстрат не оказывает негативного биостатического эффекта на ростовые характеристики метилотрофов (см. табл. 1). Поэтому в случае *M. flagellatum* включение ^{13}C в молекулы аминокислот осуществляли в одну стадию за счет выращивания бактерий на водных средах M9, содержащих в качестве источника углерода-13 1 % [^{13}C]метанол.

Таблица 1

Влияние изотопного состава среды на рост штаммов *B. methylicum* и *M. flagellatum*

Номер опыта	Среда выращивания *	Величина лаг-фазы, ч	Выход биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
1	0	24,0	100	2,2
2	24,5	32,1	90,6	2,4
3	49,0	40,5	70,1	3,0

4	73,5	45,8	56,4	3,5
5	98,0	60,5	32,9	4,4
6	CH ₃ OH	0	100	1,1
7	¹³ CH ₃ OH	0,1	72,0	1,0

* Данные опытов 1–5 приведены для *B. methylicum* при выращивании на водных средах M9, содержащих 2 % метанол и указанное количество (об.%) ²H₂O. Данные опыта 6–7 приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде M9, содержащей 1 % метанол (6) или 1 % [¹³C]метанол.

В качестве другой модельной системы для включения изотопной метки в молекулы белков, использовали трансмембранный белок бактериородопсин [21], синтезируемый в пурпурных мембранах экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium ET 1001*. Выбор для этих целей бактериородопсина, функционирующего как АТР-зависимая транслоказа в клетках галобактерий, был продиктован возможностью исследования с его помощью процессов функционирования мембранных белков *in vivo* в условиях изотопного обогащения среды дейтерием. Для включения дейтериевой метки в молекулу бактериородопсина использовали метод селективного обогащения белка дейтерием по остаткам функционально-важных ароматических аминокислот за счёт выращивания *H. halobium ET 1001* на минеральной синтетической среде с дейтерий-содержащими аналогами ароматических аминокислот – *L*-[2,3,4,5,6-²H]фенилаланином, *L*-[3,5-²H]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7-²H]триптофаном.

Основные этапы при выделении [²H]-и [¹³C]-аминокислот заключались в выращивании соответствующих штаммов-продуцентов на средах с мечеными субстратами – [²H]метанолом, [¹³C]метанолом и ²H₂O или *L*-[2,3,4,5,6-²H]фенилаланином, *L*-[3,5-²H]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7-²H]триптофаном (бактериородопсин), отделении культуральных жидкостей (КЖ), содержащих секретлируемые аминокислоты от микробной биомассы, очистки от липидов, разрушении клеток, выделении фракции суммарных белков биомассы и бактериородопсина с последующим их гидролизом, дериватизации смесей аминокислот дансилхлоридом, бензилоксикарбонилхлоридом и диазометаном, разделении метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот и *N*-Cbz-производных аминокислот методом обращённо-фазовой ВЭЖХ и масс-спектрометрии электронного удара полученных производных аминокислот.

²H- и ¹³C-меченые аминокислоты выделяли из лиофилизированных культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот *B. methylicum* и *M. flagellatum*, а также в составе гидролизатов суммарных белков биомассы. При выделении фракции суммарных белков необходимо учитывать наличие в них углеводов, липидов и пигментов. В работе использовали богатые по белку штаммы бактерий со сравнительно небольшим содержанием углеводов в них. Гидролизу в качестве фракции суммарных белков подвергали остаток после исчерпывающего отделения липидов и пигментов экстракцией органическими растворителями (метанол–хлороформ–ацетон). В редких случаях для полного отделения от сопутствующих компонентов прибегали к коллоидному растворению (солюбилизации) белков в ДДС или высаливанию их сульфатом аммония.

Выделение и очистку индивидуальных белков с целью дальнейшего изучения их пространственной структуры целесообразно осуществлять методом солюбилизации с использованием подходящих детергентов (см. [22]) что особенно важно для бактериородопсина, являющегося высокоспиральным трансмембранным белком. Поэтому при выделении бактериородопсина из пурпурных мембран галобактерии *H. halobium ET 1001* использовали коллоидное растворение (солюбилизацию) фракции пурпурных мембран после отмывки от посторонних каротиноидов и фосфолипидов в 0,5 % растворе ДДС с сохранением α-спиральной конфигурации белка, а далее осаждали его из раствора ДДС метанолом. Гомогенность выделенного таким способом бактериородопсина была подтверждена электрофорезом в 12,5 % ПААГ с 0,1 % ДДС.

Гидролиз дейтерий-меченых белков проводили в условиях предотвращения реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ходе гидролиза и сохранения остатков

ароматических [^2H]аминокислот в белке. Были рассмотрены два альтернативных варианта проведения гидролиза – кислотный и щелочной. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 M HCl, 24 ч, 110 °C), как известно, приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот [23]. Другим значительным недостатком при проведении гидролиза в HCl является изотопный (^1H - ^2H) обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтеронов) при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот [24]. Поэтому, чтобы получить реальные данные о биосинтетическом включении дейтерия в молекулы аминокислот необходимо проводить гидролиз белка с использованием дейтерированных реагентов (6 M ^2HCl с 3 % фенолом (в $^2\text{H}_2\text{O}$)).

Другой вариант гидролиза белка заключался в использовании 2 M Ba(OH) $_2$ (110 °C, 24 ч). В этих условиях гидролиза белка реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ароматических - [^2H]аминокислотах – тирозине и триптофана не происходит, а триптофан не разрушается. Оба метода гидролиза показали хорошие результаты по сохранению ароматических [^2H]аминокислот в гидролизатах белка и содержанию дейтерия в молекулах [^2H]аминокислот. Необходимо подчеркнуть, однако, что для препаративного получения ^2H -меченных аминокислот из белка микроорганизмов целесообразнее использовать гидролиз в ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ (в присутствии добавки фенола для сохранения ароматических аминокислот), позволяющего избежать рацемизации. Для изучения же уровня включения стабильных изотопов в остатки ароматических [^2H]аминокислот бактериородопсина и в аналитических целях лучше применять гидролиз белка в растворе Ba(OH) $_2$, при котором отсутствует (^1H - ^2H) обмен в аминокислотах и сохраняются остатки – [^2H]фенилаланина, [^2H]тирозина и [^2H]триптофана. При щелочном гидролизе возможная рацемизация аминокислот не влияет на результат последующего масс-спектрометрического определения уровней включения дейтерия в [^2H]аминокислоты.

Для получения летучих производных аминокислоты переводили в метиловые эфиры N-Dns- [^2H , ^{13}C]аминокислот или N-Cbz- [^2H , ^{13}C]аминокислоты, которые затем разделяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ. Условия N-дериватизации [^2H , ^{13}C]аминокислот отработывали таким образом, чтобы получить в масс-спектрах как можно более интенсивные пики их молекулярных ионов (M^+) на уровне фона метаболитов среды. Для этого проводили прямую дериватизацию [^2H , ^{13}C]аминокислот в составе лиофилизированных культуральных жидкостей и гидролизатов суммарных белков биомассы пятикратным избытком дансилхлорида (в ацетоне) или бензилоксикарбонилхлорида.

В условиях реакции дериватизации для лизина, гистидина, тирозина, серина, треонина и цистеина наряду с монопроизводными образовывались ди-Dns и ди-Cbz-производные. Кроме этого, из аргинина синтезировался N-три-Dns-(Cbz)-аргинин. Поэтому в масс-спектрометрических исследованиях молекулярные ионы (M^+) этих соединений соответствовали ди- или три- производным.

Эффективность использования N-Cbz-производных аминокислот в обращенно-фазовой ВЭЖХ и в масс-спектрометрических исследованиях была показана нами ранее [25]. Летучесть N-производных аминокислот при масс-спектрометрическом анализе может быть повышена за счет дополнительной этерификации по карбоксильной группе, поэтому N-Dns- [^2H , ^{13}C]аминокислоты были переведены в их метиловые эфиры. Для предотвращения обратного изотопного обмена ароматических протонов (дейтеронов) при этерификации дейтерий-меченных аминокислот, в данной работе отдали предпочтение использованию диазометана для этих целей. Свежеприготовленным раствором диазометана в диэтиловом эфире обрабатывали сухие остатки смесей аминокислот. При дериватизации аминокислот диазометаном происходило дополнительное N-метилирование по α -NH-(Dns)-группе [^2H]аминокислот, что приводило к появлению в масс-спектрах метиловых эфиров N-Dns-аминокислот дополнительных пиков, соответствующих соединениям с молекулярной массой на 14 массовых единиц больше исходных.

Уровни включения изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот мультикомпонентных смесей в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов определяли аналитически методом масс-спектрометрии электронного удара. Метиловые эфиры N-Dns- [^2H , ^{13}C]производных аминокислот или N-Cbz- [^2H , ^{13}C]производные аминокислот

препаративного разделяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на октадецилсилановом силикагеле Separon SGX C18, 7 мкм. Наилучшее разделение достигалось при градиентном элюировании метиловых эфиров N-Dns-[^2H , ^{13}C]производных аминокислот смесью растворителей (А) – вода–трифторуксусная кислота (100:0,1–0,5, %) и (Б) – ацетонитрил–трифторуксусная кислота (100:0,1–0,5, %) за счет постепенного увеличения концентрации компонента Б в смеси от 0 до 100 %. При этом удалось разделить триптофан и трудно разрешимую пару фенилаланин/тирозин. Степени хроматографической чистоты ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот, выделенных из культуральных жидкостей *B. methylicum* и *M. flagellatum* и гидролизатов белков в виде их N-Cbz-[^2H , ^{13}C]производных аминокислот составили 96–98 %, при выходах – 67–89 %. Для отдельных [^2H , ^{13}C]аминокислот оказалось более удобным разделение в виде метиловых эфиров N-Dns-[^2H , ^{13}C]производных аминокислот. При этом степень хроматографической чистоты полученных из гидролизатов бактериородопсина метиловых эфиров N-Dns-[^2H]фенилаланина, N-Dns-[^2H]тирозина и N-Dns-[^2H]триптофана составили 96, 97 и 98 % соответственно. Данный результат важен потому, что именно метиловые эфиры N-Dns-аминокислот вследствие своей химической стабильности, наличия высокоинтенсивных молекулярных ионов (M^+) при высоких молекулярных массах оказались весьма удобными для масс-спектрометрических исследований и позволяют идентифицировать ^2H , ^{13}C -меченные аминокислоты в присутствии низкомолекулярных метаболитов среды и других продуктов дериватизации. Последний факт очень важен для изучения состава пула ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов.

Пути фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина при масс-спектрометрии электронного удара приводят к формированию пиков их молекулярных ионов (M^+) при $m/z = 412$ и $m/z = 378$ и к образованию дансильных фрагментов и продуктов их дальнейшего распада до N-диметиламинонафталина, а также к образованию аминных A^+ и аминоацильных фрагментов B^+ (рис. 1). Показанная на рисунке 1 фрагментация метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина характерна для этих производных всех других аминокислот, что позволяет проводить масс-спектрометрический мониторинг ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот в составе интактных культуральных жидкостей штаммов-продуцентов, содержащих сумму аминокислот и других метаболитов среды, до стадии их хроматографического разделения, а также исследовать включение стабильных изотопов ^2H - и ^{13}C в молекулы аминокислот белковых гидролизатов.

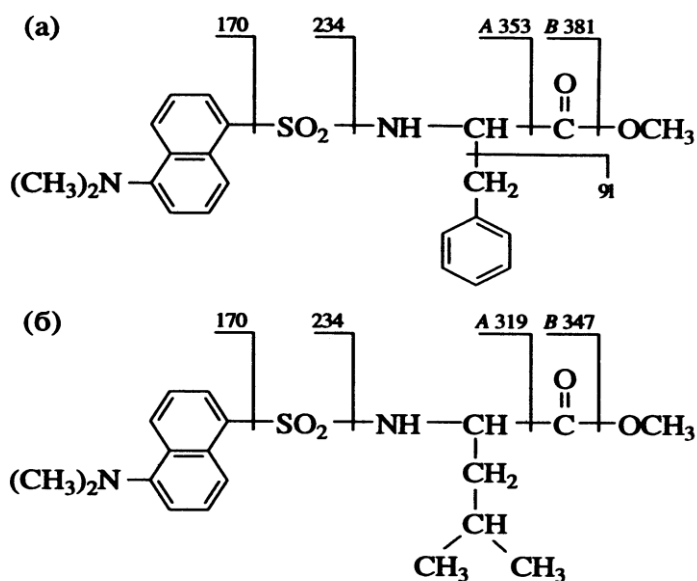
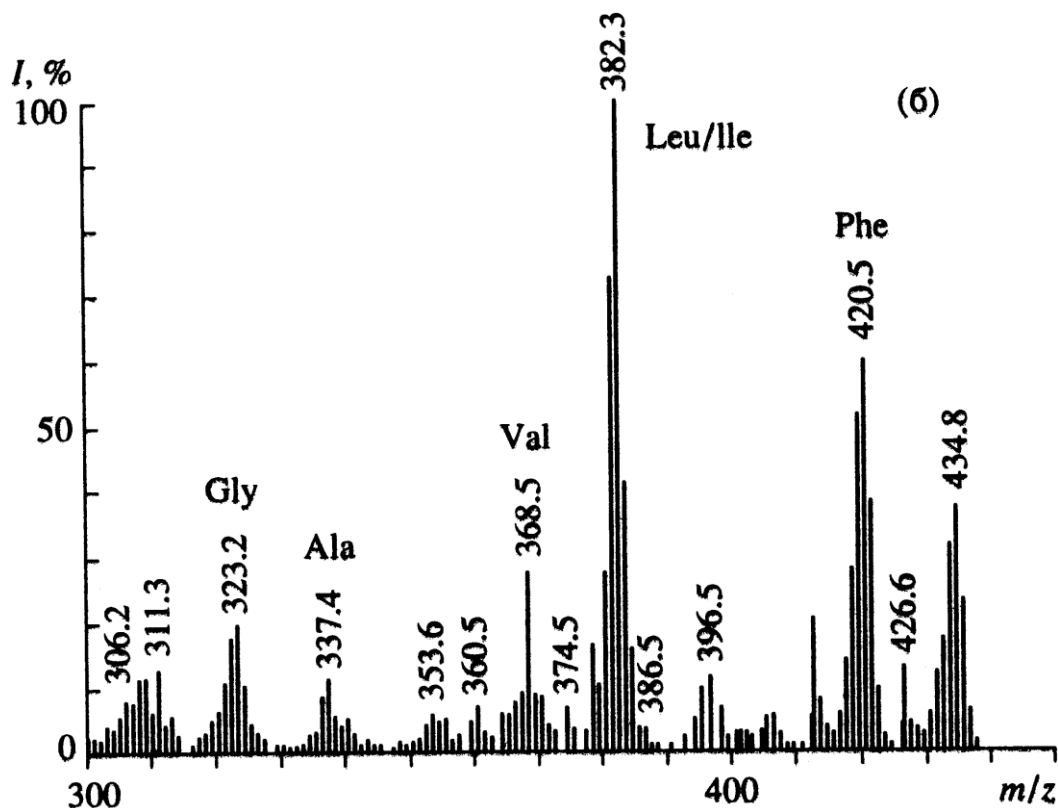


Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с $M_r = 412$ (а) и N-Dns-лейцина с $M_r = 378$ (б) при масс-спектрометрии электронного удара

При использовании в качестве источников стабильных изотопов [^{13}C]метанола и $^2\text{H}_2\text{O}$, в клетке синтезируются изотопно-замещённые аминокислоты, различающиеся количеством атомов, замещённых на ^{13}C и ^2H . При этом, чем выше молекулярная масса аминокислот, тем возможен больший набор молекулярных ионов (M^+), соответствующих изотопно-замещённым формам. Пики при $m/z = 323,2; 337,4; 368,5; 382,3; 420,5$ в масс-спектре [^{13}C]аминокислот дериватизованной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной среды с 1 % [^{13}C]метанолом (рис. 2 б), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns- ^{13}C глицина, N-Dns- ^{13}C аланина, N-Dns- ^{13}C валина, N-Dns- ^{13}C лейцина/ ^{13}C изолейцина и N-Dns- ^{13}C фенилаланина. Следует подчеркнуть, что величина m/z для молекулярного иона (M^+) метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C лейцина и [^{13}C]изолейцина в масс-спектрах электронного удара одинакова, поэтому данным методом нельзя точно идентифицировать эти аминокислоты. Максимальные уровни включения ^{13}C в молекулы аминокислот, измеренные по увеличению усреднённого значения соотношения массы к заряду m/z для молекулярного иона (M^+) изотопно-меченого образца в сравнении с молекулярной массой природной аминокислоты варьируют от 35 % для [^{13}C]аланина до 95 % для [^{13}C]фенилаланина (рис. 2). Учитывая ауксотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснён вкладом экзогенного изолейцина в уровень изотопного включения [^{13}C]лейцина, а также других метаболически связанных с ним аминокислот – [^{13}C]аланина и [^{13}C]валина.



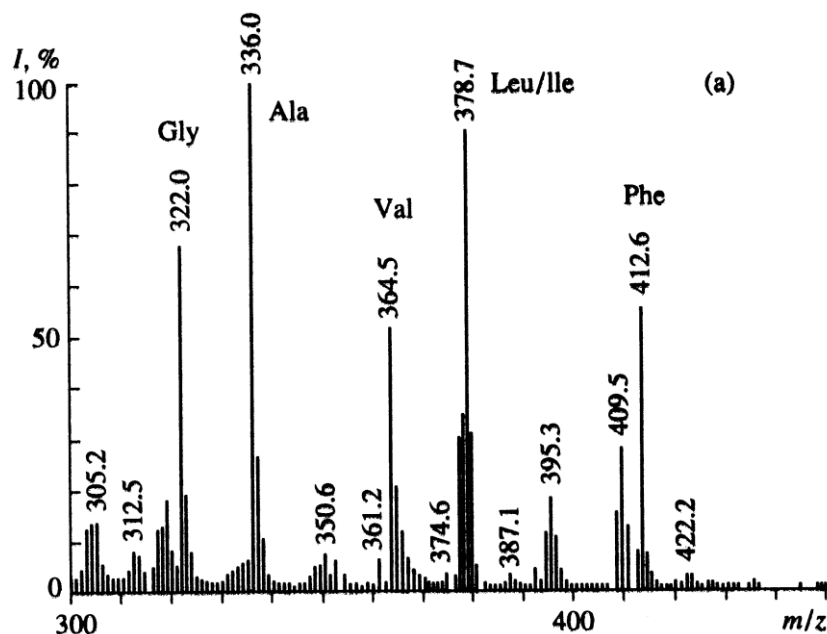


Рис. 2. Масс-спектры ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C аминокислот из КЖ *M. flagellatum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 1 % метанол и H_2O (контрольные условия); б) – 1 % ^{13}C метанол и H_2O . Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов $[\text{M}]^+$ метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C аминокислот. Интенсивность пиков приведена в %

Для штамма факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* наблюдалось специфическое возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулы индивидуальных ^{2}H аминокислот культуральных жидкостей (табл. 2) при ступенчатом увеличении концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде. Уровни включения дейтерия в молекулы разных ^{2}H аминокислот при одинаковых условиях культивирования различаются. При этом во всех опытах наблюдалось пропорциональное возрастание уровней изотопного включения ^2H в молекулы метаболически родственных ^{2}H аминокислот при ступенчатом увеличении концентраций тяжелой воды в ростовых средах (табл. 2). Такой результат зафиксирован во всех экспериментах, где источником стабильных изотопов служила $^2\text{H}_2\text{O}$.

Таблица 2

Уровни включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот (%), секретируемых в культуральную жидкость (КЖ) *B. methylicum* и *M. flagellatum*, и в аминокислотные остатки белков

Аминокислоты	Содержание $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде, %*								1 % $^{13}\text{C}\text{H}_3\text{OH}$ **	
	24,5		49,0		73,5		98,0			
	КЖ	Белок	КЖ	Белок	КЖ	Белок	КЖ	Белок	КЖ	Белок
Глицин	–	15,0	–	35,0	–	50,0	–	90,0	60,0	90,0
Аланин	24,5	20,0	50,0	45,0	50,0	62,5	55,0	97,5	35,0	95,0
Валин	20,0	15,0	50,0	46,0	50,0	50,0	55,8	50,0	50,0	50,0

Лейцин /изолейцин	20,0	15,0	50,0	42,0	50,0	50,0	50,0	50,0	40,0	49,0
Фенилаланин	15,0	24,5	27,5	37,5	51,2	50,0	75,0	95,0	95,0	80,5
Тирозин	–	20,0	–	25,6	–	68,5	–	92,8	–	53,5
Серин	–	15,0	–	36,7	–	47,6	–	86,6	–	73,3
Аспарагиновая кислота	–	20,0	–	36,7	–	60,0	–	66,6	–	33,3
Глутаминовая кислота	–	20,0	–	40,0	–	53,4	–	70,0	–	40,0
Лизин	–	10,0	–	35,3	–	40,0	–	58,9	–	54,4

* Приведены данные по включению ^2H в молекулы аминокислот *B. methylicum* при выращивании на водных средах М9, содержащих 2 % метанол и указанное количество (об.%) $^2\text{H}_2\text{O}$.

** Данные по включению ^{13}C приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде М9, содержащей 1 % [^{13}C]метанол.

Из масс-спектра метиловых эфиров N-Dns- ^2H производных аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum*, полученной со среды, содержащей 49 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 3 б) видно, что молекула фенилаланина содержит 6 изотопно-замещённых форм со средним значением пика молекулярного иона (M^+) с $m/z = 414,2$, которое возрастает по сравнению с контрольными условиями ($m/z = 412,0$, рис. 3 а) на 2,2 единицы, т. е. 27,5 ат.% от общего количества атомов водорода в молекуле замещены на дейтерий. Область масс-спектра со значениями $m/z = 90-300$ соответствует продуктам дериватизации метаболитов ростовой среды. Пик с $m/z = 431,0$, зафиксированный в масс-спектре культуральной жидкости и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования фенилаланина по $\alpha\text{-NH-(Dns)-}$ группе. Пик с $m/z = 400$ (рис. 3 б) отвечает продукту отщепления метильной группы от дейтерированного производного [^2H]фенилаланина.

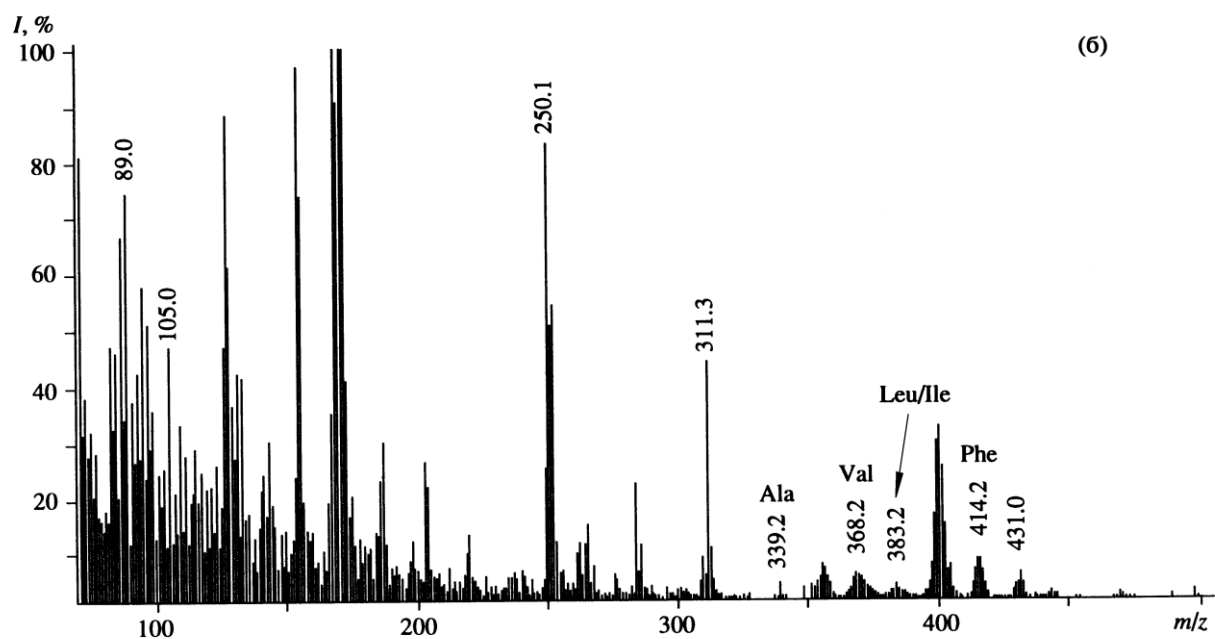
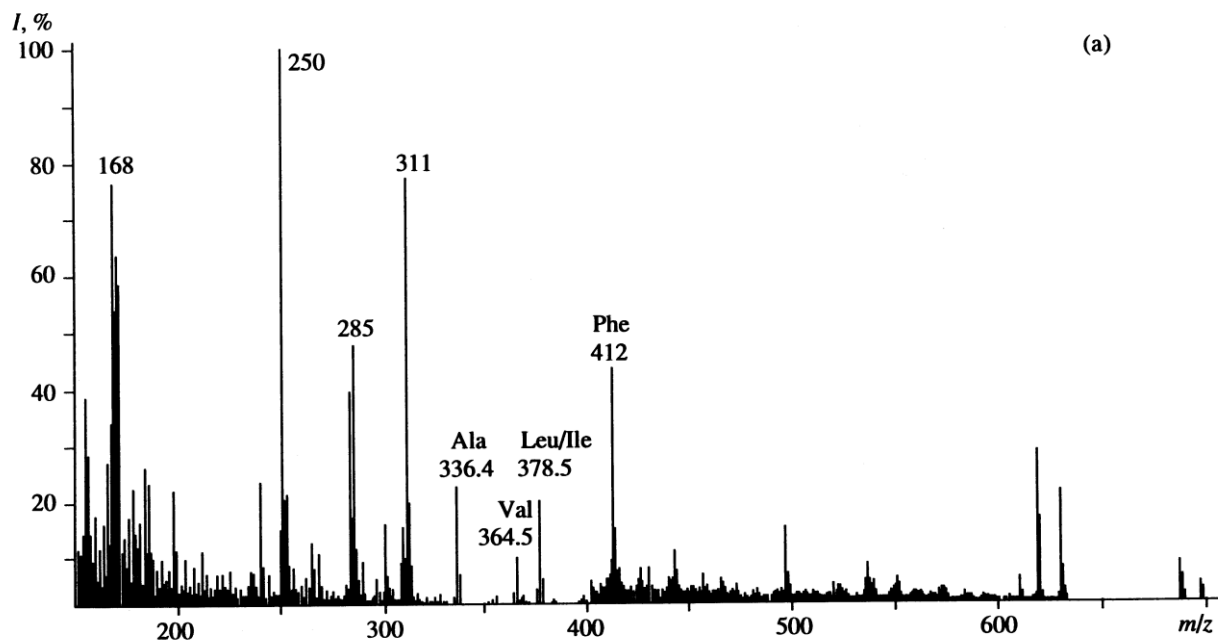


Рис. 3. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 2 % метанол и 98,0 % H_2O (контрольные условия); б) – 2 % [^2H]метанол и 49,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$

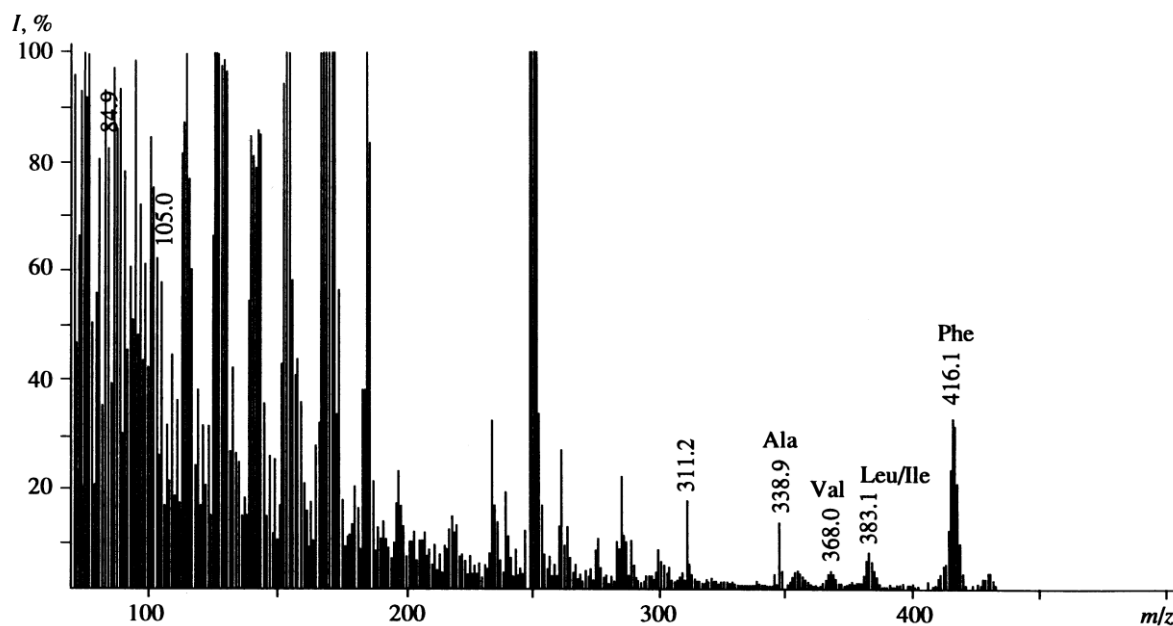


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$

Присутствие в масс-спектре образца культуральной жидкости *B. methylicum*, полученной на среде с 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 4) пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-[^2H]фенилаланина (M^+) с $m/z = 416,1$ указывает на увеличение молекулярной массы [^2H]фенилаланина на 4,1 единицу, т.е., 51,2 % атомов водорода в молекуле [^2H]фенилаланина в этом случае замещены на дейтерий. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу [^2H]фенилаланина за счет процесса биосинтеза *de novo*, т. е. по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым относятся протоны (дейтероны) при гетероатомах в NH_2 - и COOH - группах аминокислот, которые замещаются за счёт лёгкости диссоциации в H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$).

Из таблицы 2 видно, что условиях ауксотрофности по *L*-лейцину уровни включения ^2H в молекулы [^2H]лейцина/[^2H]изолейцина ниже, чем для фенилаланина. Отмеченная особенность отчётливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$. Ещё раз этот результат подтвердили рисунок 5, где показан масс-спектр метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот культуральной жидкости после выращивания бактерий *B. methylicum* в указанных условиях. Видно, что величина пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-[^2H]фенилаланина (M^+) с $m/z = 418,0$ увеличивается по сравнению с контрольными условиями на 6 единиц, что соответствует замещению 75,0 ат.% от общего количества атомов водорода в молекуле. В отличие от [^2H]фенилаланина уровень включения дейтерия в [^2H]лейцин/[^2H]изолейцин составил 50,0 ат.%, а в [^2H]валин – 58,8 ат.%. Пик с m/z 432, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот КЖ на рис. 5 соответствует продукту дополнительного метилирования [^2H]фенилаланина по α - NH_2 - группе. Кроме этого, в масс-спектре фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [^2H]фенилаланина с m/z 97 (вместо m/z с 91 в контроле), что указывает на то, что местами локализации 6 атомов дейтерия в молекуле [^2H]фенилаланина являются положения C_1 – C_6 ароматических протонов в бензильном $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагменте. Из масс-спектрометрических данных следует, что при других концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ дейтерий также включается в ароматическое кольцо [^2H]фенилаланина, так как метаболизм адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений в $^2\text{H}_2\text{O}$ [26].

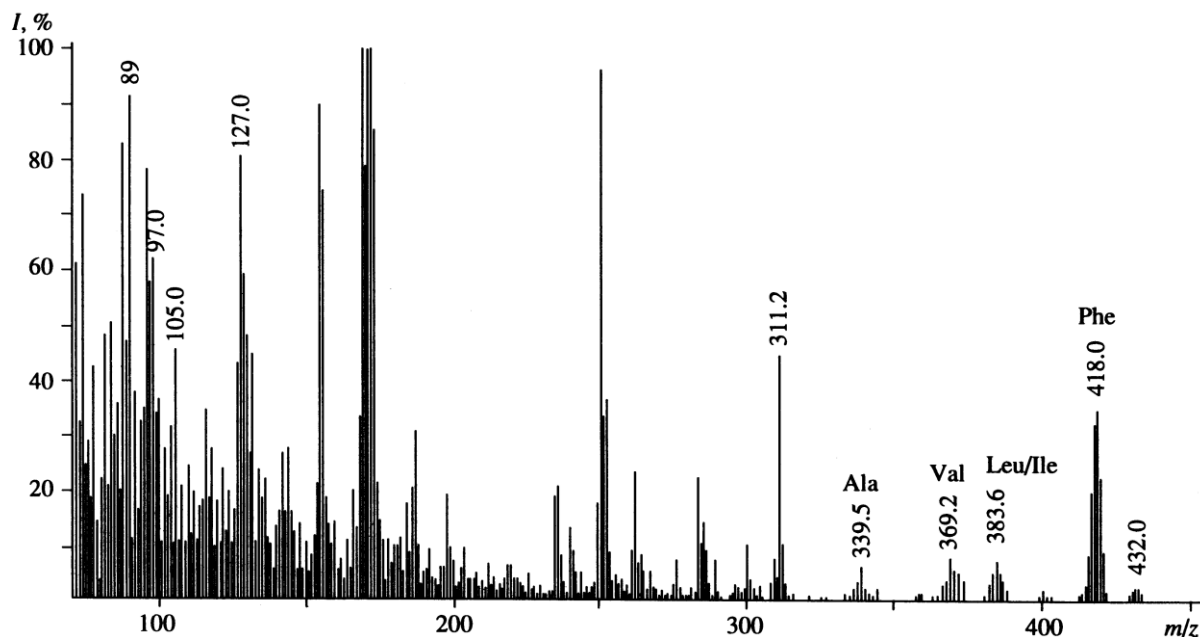


Рис 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^2H аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % ^2H метанол и 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (максимально дейтерированная среда)

Аналогичная закономерность в уровнях включения ^{13}C в молекулы аминокислот, связанных с ауксотрофным метаболизмом, проявляется при выращивании *L*-изолейцин-зависимого штамма *M. flagellatum* на среде с 1 % ^{13}C метанолом. Как видно из таблицы 2, в отличие от наблюдаемого для ^{13}C фенилаланина (уровень изотопного включения – 95,0 %), уровни включения изотопа ^{13}C в молекулы ^{13}C лейцина/изолейцина, ^{13}C аланина и ^{13}C валина составили 38,0; 35,0; 50,0 % соответственно. Уровень изотопного включения для ^{13}C глицина (60 %) хотя и выше, чем для трёх последних аминокислот, но намного ниже, чем для ^{13}C фенилаланина.

Суммируя полученные данные по уровням включения ^2H -и ^{13}C в молекулы секретируемых аминокислот, можно сделать вывод о сохранении минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом лейцина и метаболически родственных с ним аминокислот *de novo*. Другим логическим объяснением наблюдаемого эффекта, если принять во внимание происхождение лейцина и изолейцина по различным путям биосинтеза (лейцин принадлежит к семейству пирувата, а изолейцин – к семейству аспартата [см. рис. 6]), может быть ассимиляция клеткой немеченого лейцина из среды на фоне биосинтеза изотопно-меченого изолейцина *de novo*. Учитывая данные эффекты следует подчеркнуть, что использование ауксотрофных форм микроорганизмов для получения изотопно-меченых аминокислот не оправдывает себя практически из-за множественного включения изотопов в молекулы [26]. Напротив, использование для этих целей прототрофных форм микроорганизмов кажется более перспективным.

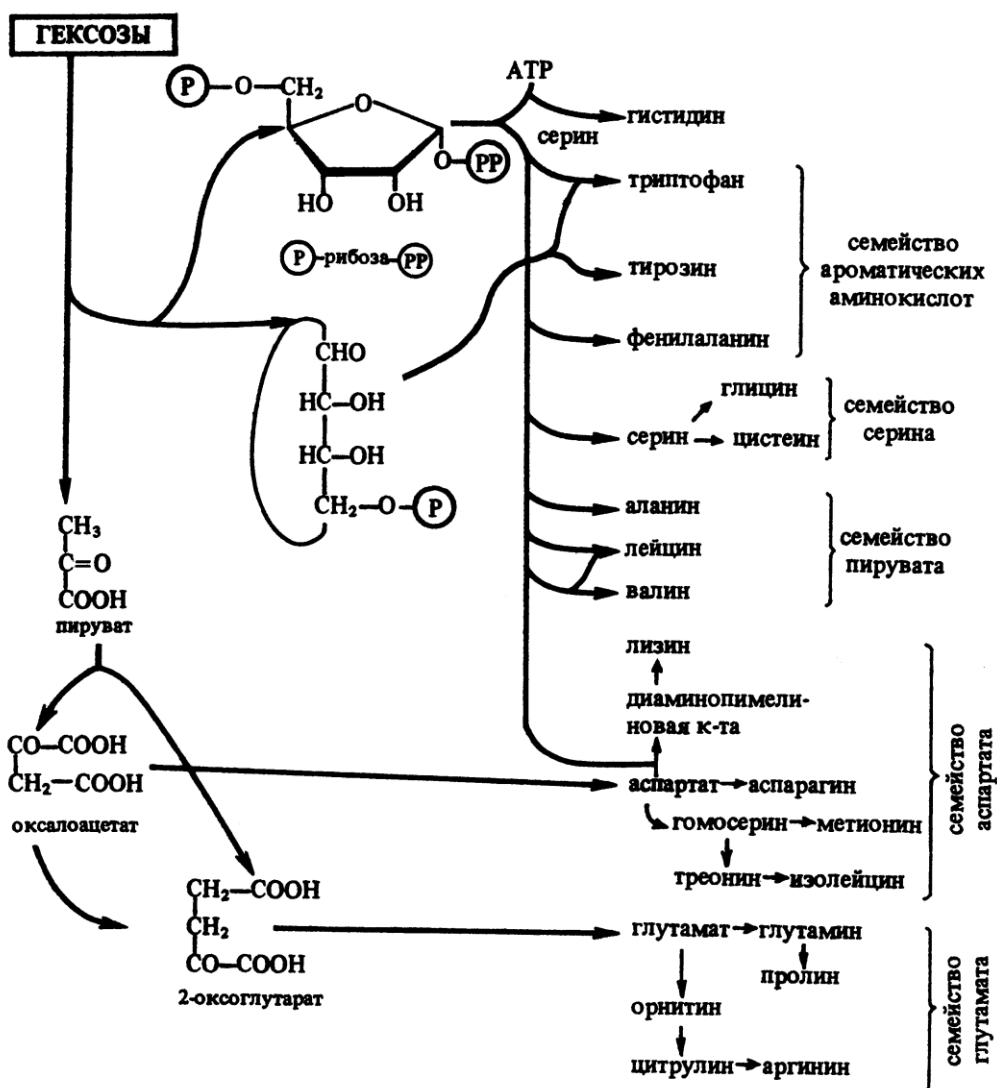


Рис. 6. Аминокислоты, необходимые для синтеза белков, образующиеся в клетке из предшественников (по Г. Шлегелю [27])

Общие принципы изучения уровней изотопного включения в молекулы аминокислот при данном способе введения метки были продемонстрированы на примере анализа сложных мультикомпонентных смесей, полученных после гидролиза суммарных белков биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum*, а также трансмембранного белка – бактериородопсина, выполняющего роль АТФ-зависимой транслоказы в клетках фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium*. Как видно из рисунка 7, до десяти аминокислот могут быть идентифицированы в гидролизате белка *B. methylicum* по пикам молекулярных ионов (M^{+}) метиловых эфиров их N-Dns- $[^2H]$ производных аминокислот.

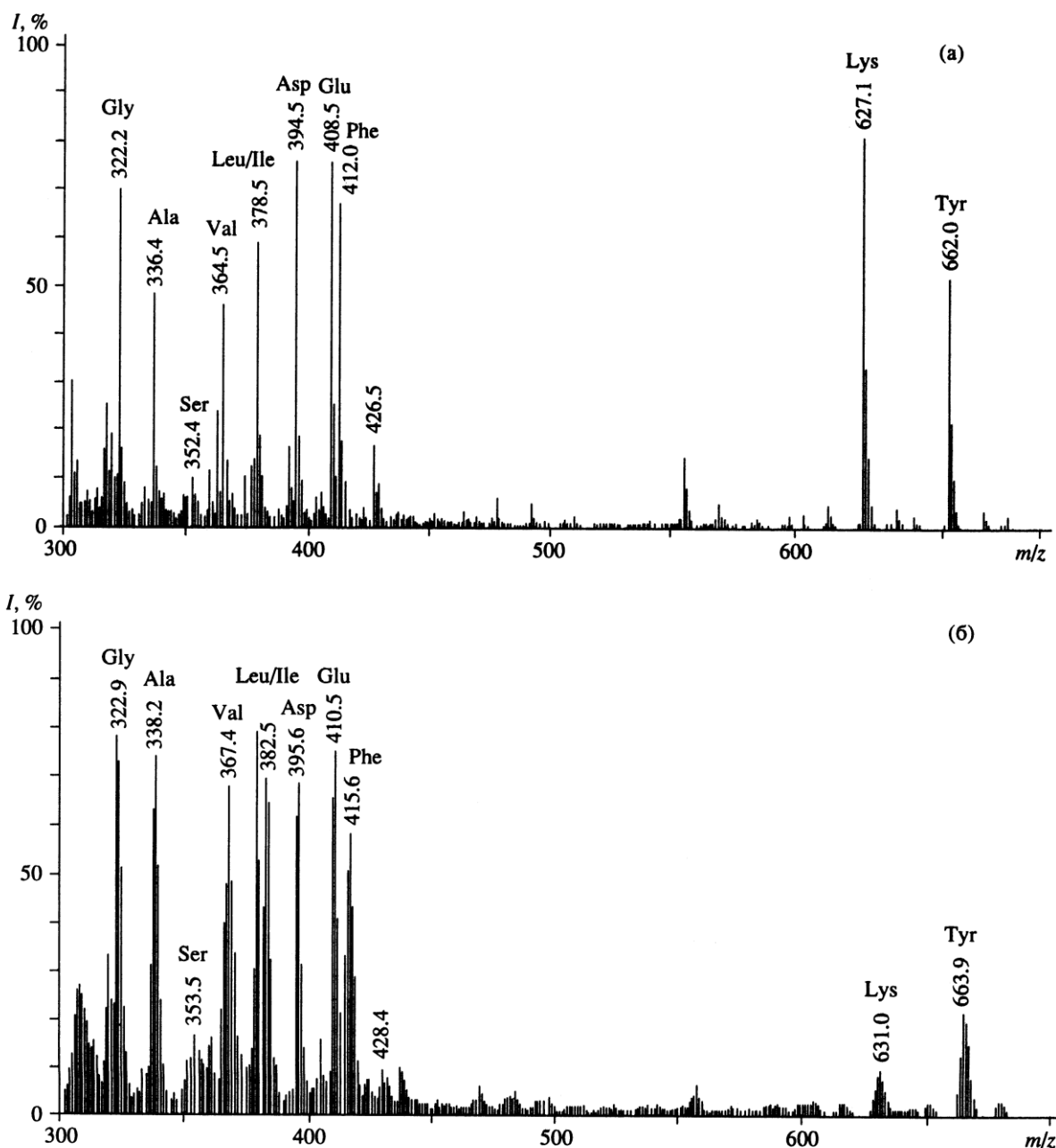


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^2H аминокислот из гидролизатов суммарных белков биомассы *B. methylicum* при выращивании в среде M9, содержащей 2 % метанол и H_2O (а) и 2 % ^2H метанол и 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (б)

Как и в случае с секретлируемыми аминокислотами, пики молекулярных ионов (M^+) соответствовали смесям изотопно-замещённых форм производных аминокислот. Для лизина и тирозина пики (M^+) соответствовали метиловым эфирам ди-производных аминокислот – α , ϵ -ди-Dns-лизину (M^+ при $m/z = 631,0$) и O, N-ди-Dns-тирозины (M^+ при $m/z = 663,9$). Уровни изотопного включения дейтерия в молекулы ^2H аминокислот Гидролизата суммарных белков биомассы при содержании $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде 49,0 % варьируют от 25,6 % для ^2H тирозина до 45,0 % для ^2H аланина (рис. 7б и табл. 2). В молекулах ^2H глицина, ^2H валина, ^2H фенилаланина, ^2H серина, ^2H лизина, ^2H аспарагиновой и ^2H глутаминовой кислот они находятся в пределах 35–46 %. Как и в

случае с секретируемыми аминокислотами, при повышении концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде наблюдалось пропорциональное повышение уровней включения ^2H в молекулы аминокислот. Что касается других [^2H]аминокислот, не детектируемых данным методом, очевидно, что уровни изотопного включения в них приблизительно такие же. Это подтверждается данными по разделению белковых гидролизатов метилотрофных бактерий методами обращённо-фазовой ВЭЖХ в виде N-Cbz- ^2H производных аминокислот и метиловых эфиров их N-Dns- ^2H производных аминокислот и ионнообменной хроматографии, где детектируется уже 15 аминокислот (рис. 8, табл. 3).

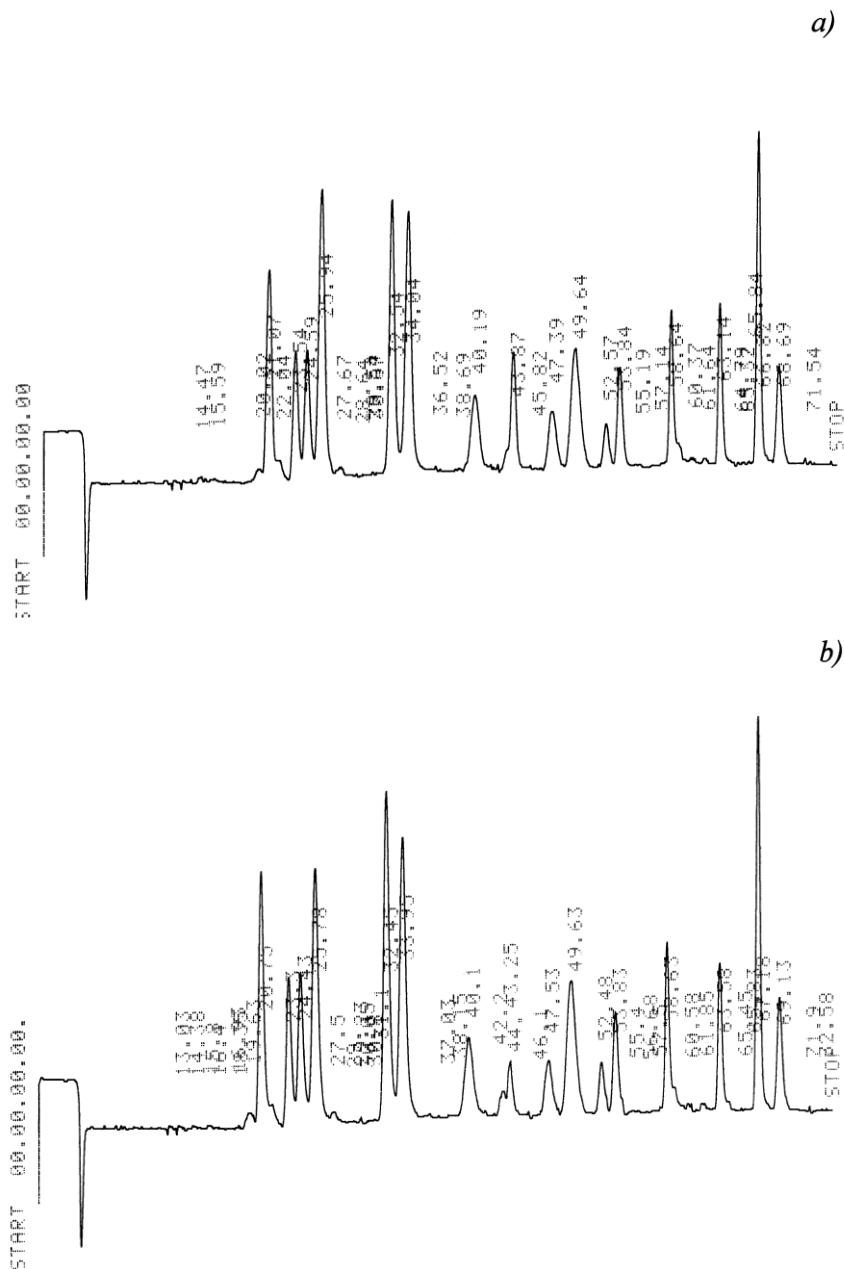


Рис. 8. Ионнообменная хроматография аминокислот, выделенных из гидролизатов протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток *B. methylicum* на максимально дейтерированной среде: Biotronic LC-5001 (230×3,2 mm) (“Eppendorf–Nethleler–Hinz”, Germany); подвижная фаза: UR-30 сульфонирующая стирольная смола (“Beckman–Spinco”, USA); 25 μm ; 50–60 атм; подвижная фаза: 0,2 N Na-цитратный буфер (pH = 2,5); скорость подачи элюента: 18,5 мл/ч; нингидрина – 9,25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ и $\lambda = 440$ нм (для пролина)

Таблица 3

Аминокислотный состав белкового гидролизата суммарных белков биомассы *V. methylicum*, полученный при росте в максимально дейтерированной среде* и уровни дейтерированности молекул**

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы		Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода***
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в 98,0% $^2\text{H}_2\text{O}$		
Глицин	8,03	9,69	2	90,0
Аланин	12,95	13,98	4	97,5
Валин	3,54	3,74	4	50,0
Лейцин	8,62	7,33	5	50,0
Изолейцин	4,14	3,64	5	50,0
Фенилаланин	3,88	3,94	8	95,0
Тирозин	1,56	1,83	7	92,8
Серин	4,18	4,90	3	86,6
Треонин	4,81	5,51	–	–
Метионин	4,94	2,25	–	–
Аспарагин	7,88	9,59	2	66,6
Глутаминовая кислота	11,68	10,38	4	70,0
Лизин	4,34	3,98	5	58,9
Аргинин	4,63	5,28	–	–
Гистидин	3,43	3,73	–	–

* Данные получены на M9 среде с 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом.

** При подсчёте уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH₂ группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации и изотопного обмена в H₂O/ $^2\text{H}_2\text{O}$

*** Прочерк означает отсутствие данных.

Полученные данные свидетельствуют о возможности достижения максимальных уровней включения стабильных изотопов ^2H и ^{13}C в аминокислотные остатки суммарных белков биомассы (за исключением аланина, валина и лейцина/изолейцина, сниженные уровни включения для которых объясняются эффектом ауксотрофности по *L*-лейцину и по *L*-изолейцину). Например, в случае с дейтерированными аминокислотами полного замещения на стабильные изотопы удалось достичь за счет использования в качестве источника дейтерия 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (табл. 3). Как видно из табл. 3, при выращивании *V. methylicum* на среде с 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$, уровни включения ^2H в остатки глицина, аланина, фенилаланина и тирозина составляют 90,0; 97,5; 95,0 и 92,8 %. В экспериментах по включению изотопа ^{13}C в суммарные белки биомассы за счёт ассимиляции [^{13}C]метанола метилотрофными бактериями *M. flagellatum* также наблюдались высокие уровни изотопного включения в [^{13}C]глицине (90,0 %), [^{13}C]аланине (95,0 %) и [^{13}C]фенилаланине (80,5 %) (табл. 2). Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, сниженные уровни включения стабильных изотопов в [^{13}C]лейцине/изолейцине (49,0 %), а также в метаболически связанных с ним [^{13}C]аминокислотах в этих условиях могут быть объяснены эффектом ауксотрофности штамма по *L*-изолейцину, который добавляли в ростовую среду в протонированном виде.

Во всех экспериментах по включению стабильных изотопов в молекулы аминокислот уровни включения ^2H и ^{13}C в метаболически связанные аминокислоты обнаружили определённую корреляцию. Так, уровни изотопного включения для аланина, валина и лейцина (семейство пирувата), фенилаланина и тирозина (семейство ароматических аминокислот, синтезируемых из шикимовой кислоты) коррелируют (см. табл. 2). В то же время уровни изотопного включения для аланина, валина и лейцина/изолейцина сохраняют стабильность в пределах широкого разброса концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$ вследствие эффекта ауксотрофности по лейцину. Уровни изотопного включения для глицина и серина (семейство серина), аспарагиновой кислоты и в лизина (семейство аспарагина) также имеют близкие величины и находятся в корреляции. Из данных табл. 2 видно, что уровни изотопного включения секретлируемых аминокислот и соответствующих аминокислотных остатков суммарного белка при выращивании бактерий на средах с одинаковым изотопным насыщением, в целом, также коррелируют. Причина некоторых наблюдаемых расхождений в уровнях включения изотопов в молекулы аминокислот может быть связана с эффектом ауксотрофности штаммов по определенным аминокислотам.

Данный биосинтетический подход показал хорошие результаты по введению дейтериевой метки в молекулу трансмембранного белка бактериородопсина, выращенного на среде, содержащей L -[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланин, L -[3,5- ^2H]тирозин и L -[2,4,5,6,7- ^2H]триптофан. Полный масс-спектр электронного удара ЭУ смеси метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот, показанный на рис. 8 (сканирование при m/z 50–640, базовый пик m/z 527, 100 %), характеризуется непрерывностью: пики в интервале m/z от 50 до 400 на шкале массовых чисел представлены фрагментами метастабильных ионов, низкомолекулярных примесей, а также продуктами химической модификации аминокислот. Анализируемые [^2H]ароматические аминокислоты, занимающие шкалу массовых чисел m/z от 415 до 456, представлены смесями молекул с различным количеством включенных атомов дейтерия, поэтому молекулярные ионы (M^+) полиморфно расщеплялись на отдельные кластеры со статистическим набором значений m/z зависимости от количества водородных атомов в молекуле. Учитывая эффект изотопного полиморфизма, подсчет уровня дейтерированности молекул [^2H]аминокислот проводили по наиболее распространенному пику молекулярного иона (M^+) в каждом кластере с математически усредненной величиной (M^+) (таблица 3) – для фенилаланина пик молекулярного иона определялся (M^+) при $m/z = 417$, 14 % (вместо (M^+) при $m/z = 412$, 20 % для немеченого производного (пики немеченых аминокислот не показаны)), тирозина – (M^+) при $m/z = 429$, 15 % (вместо (M^+) при $m/z = 428$, 13 %), триптофана – (M^+) при $m/z = 456$, 11 % (вместо (M^+) при $m/z = 451$, 17 %). Уровень дейтерированности, соответствующий увеличению молекулярной массы составил для [^2H]тирозина два (96 ат.% ^2H), [^2H]фенилаланина – пять (90 ат.% ^2H) и [^2H]триптофана – пять (98 ат.% ^2H) атомов дейтерия, что совпадает с данными по уровню дейтерированности исходных ароматических аминокислот – [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr, [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp, добавляемых в ростовую среду штамма продуцента. Полученные данные по уровню дейтерированности [^2H]фенилаланина, [^2H]тирозина и [^2H]триптофана позволяют сделать вывод о высокой селективности включения [^2H]ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина: дейтерий детектировался во всех остатках [^2H]ароматических аминокислот (табл. 4). Присутствие в масс-спектре ЭУ пиков Молекулярных ионов (M^+) протонированных и полудейтерированных аналогов фенилаланина с (M^+) при $m/z = 413$ –418, тирозина с (M^+) при $m/z = 428$ –430 и триптофана с (M^+) при $m/z = 453$ –457 с различными вкладами в уровни дейтерированности молекул, свидетельствует о сохранении небольшой доли минорных путей биосинтеза *de novo*, приводящим к разбавлению дейтериевой метки и определяется условиями биосинтеза ^2H -меченого БР (табл. 4). Кроме вышеобозначенных аминокислот в масс-спектре фиксируются пики молекулярных ионов метиловых эфиров N-Dns-глицина ((M^+), $m/z = 322$), N-Dns-аланина ((M^+), $m/z = 336$), N-Dns-валина ((M^+), $m/z = 364$) и N-Dns-лейцина/изолейцина ((M^+), $m/z = 378$). Как и следовало ожидать, эти аминокислотные остатки в бактериородопсине не содержат дейтерия.

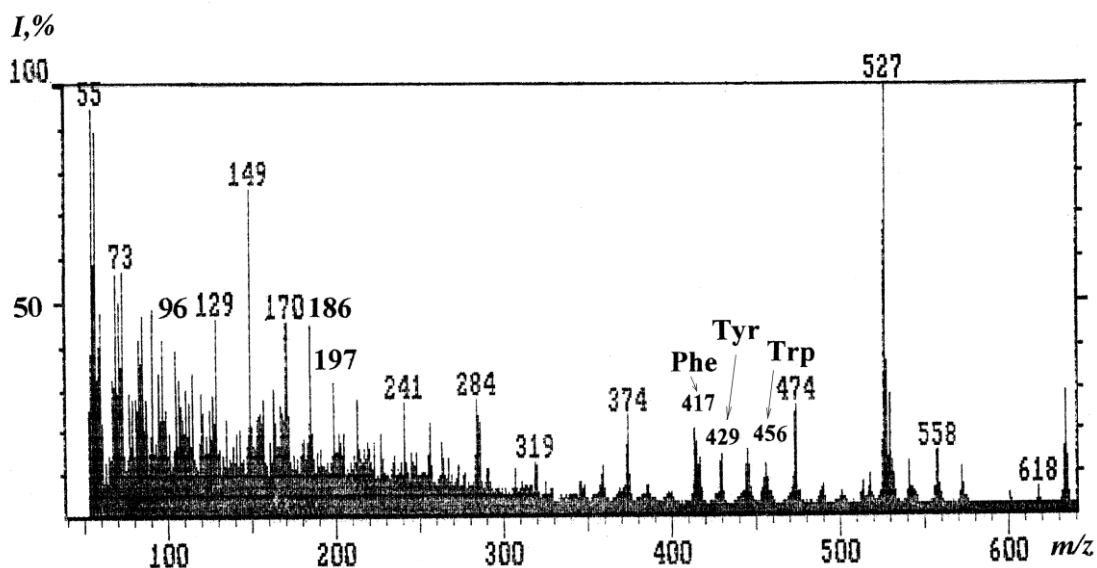


Рис. 8. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата бактериородопсина на синтетической среде с [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe (0,26 г/л), [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr (0,2 г/л) и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp (0,5 г/л) (условия гидролиза: 2 М Ва(ОН) $_2$ (в $^2\text{H}_2\text{O}$), 110 °С, 24 ч)

Таблица 4

Величины пиков молекулярных ионов $[\text{M}]^+$ в масс-спектре ЭУ удара метиловых эфиров N-Dns-[$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe, N-Dns-[$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr и N-Dns-[$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp и уровни дейтерированности

Соединение	Величина пика (M^+)	Интенсивность, %	Количество атомов дейтерия*	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода**
N-Dns-[$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe-OMe	413	7	1	13
	414	18	2	25
	415	15	3	38
	416	11	4	50
	417	14	5	63
	418	6	6	75
N-Dns-[$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr-OMe	428	12	–	–
	429	15	1	14
	430	5	2	29
N-Dns-[$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp-OMe	453	5	2	26
	454	6	3	38
	455	9	4	50
	456	11	5	64
	457	5	6	77

* Прочерк означает отсутствие включения дейтерия

** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH $_2$ -группах аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации и изотопного обмена в H $_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$.

Выводы

Проведённые исследования продемонстрировали эффективность масс-спектрометрии электронного удара N-Cbz-производных аминокислот и метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот для исследования уровней изотопного обогащения молекул аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, полученных биосинтетически с использованием микроорганизмов. Метод незаменим для изучения состава пула аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов, выращенных на средах со стабильными изотопами и гидролизатов белков биомассы.

Примечания:

1. Мосин О.В. Изучение методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных стабильными изотопами ^2H и ^{13}C с высокими степенями изотопного обогащения, автореф. дисс. канд. хим. наук. Москва: МГАТХТ им. М.В. Ломоносова. 1996.
2. LeMaster D. M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1990. Vol. 19(2). P. 243–266.
3. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment // *J. Chem. Educ.* 1986. Vol. 62(7). P. 633–638.
4. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот бактериальных объектов // *Биоорганическая химия.* 1996. т. 22, № 10–11. С. 856–869.
5. Crespi H. L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins. *Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds. Proceedings of the Second International Symposium.* New York: Elsevier. 1986. 115 p.
6. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Методы получения аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O // *Биотехнология.* 1996. № 10. С. 24–40.
7. Matthews H. R., Kathleen S., Matthews K. and Stanley J. Selectively deuterated amino acid analogues. Synthesis, incorporation into proteins and NMR properties // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1977. V. 497. P. 1–13.
8. LeMaster D. M., Cronan J. E. 'Biosynthetic production of ^{13}C -labeled amino acids with site-specific enrichment', // *Journal of Biological Chemistry.* 1982. V. 257. № 3. P. 1224–1230.
9. Mosin O.V. & Ignatov I. Microbiological synthesis of ^2H -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* // *International Journal of Biomedicine.* 2013. V. 3. № 2. P. 132–138.
10. Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И. Микробный синтез дейтерий-меченного L-фенилаланина факультативной метилотрофной бактерией *Brevibacterium methylicum* на средах с различными концентрациями тяжелой воды // *Биофармацевтический журнал.* 2012. т. 4, № 1. С. 11–22.
11. Patel G. B., Sprott G. D., Ekiel I. Production of specifically labeled compounds by methanobacterium espanolae grown on $\text{H}_2\text{-CO}_2$ plus ^{13}C acetate // *Applied and Environmental Microbiology.* 1993. V. 59. № 4. P. 1099–1103.
12. Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А. Биосинтез трансмембранного фотохромного белка [^2H]бактериородопсина, меченного дейтерием по остаткам ароматических аминокислот [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe, [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr and [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp // *Проблемы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2013. № 8. С. С. 29–39.
13. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2013. V. 7. № 3. P. 249–260.
14. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И.. Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1999. т. 35, № 1. С. 34–42.
15. Neugebauer D.C., Zingsheim H.P., Oesterhelt D. Recrystallization of the purple membrane *in vivo* and *in vitro* // *Journal Molecular Biology.* 1978. V. 123. С. 247–257.

16. Oesterhelt D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from *Halophilic Archaea* *Curr. Op. // Struct. Biol.* 1988. V. 8. P. 489–500.
17. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. № 8. P. 911–918.
18. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швец В.И. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых ^2H - и ^{13}C -аминокислот // *Биотехнология.* 1996. № 5. С. 25–34.
19. Karnaukhova E.N., Mosin O.V., Reshetova O.S. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* // *Amino Acids.* 1993. V. 5. N 1. P. 125.
20. Mosin O. V., Skladnev D. A., Shvets V. I. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 1998. Vol. 62(2). P. 225–229.
21. Мосин О.В., Игнатов И. Природный фото-преобразующий фотохромный трансмембранный белковый материал бактериородопсин из пурпурных мембран галобактерии *Halobacterium halobium* // *Нано и микросистемная техника.* 2013. № 7. С. 47–54.
22. Ignatov I., Mosin O.V. Photoreceptors in visual perception and additive color mixing. Bacteriorhodopsin in nano- and biotechnologies // *Advances in Physics Theories and Applications.* 2014. V. 27. P. 20–37.
23. Cohen J. S., Putter I. The isolation of deuterated amino acids. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. V. 222. P. 515–520.
24. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins // *Analytical Biochemistry.* 1974. V. 60, № 1. P. 45–50.
25. Егорова Т.А., Мосин О.В., Еремин С.В., Карнаухова Е.Н., Звонкова Е.Н., Швец В.И.. Разделение аминокислот белковых гидролизатов природных объектов методом ВЭЖХ в виде карбобензоксипроизводных // *Биотехнология.* 1993. № 8. С. 21–25.
26. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 1998. V. 62. № 2. P. 225–229.
27. Г. Шлегель. *Общая микробиология / под ред. Е.Н. Кондратьевой.* Москва: Мир. 1987. 255 с.

References

1. Mosin O.V. *Izuchenie metodov biotehnologicheskogo pooluchenija belkov, aminokislot i nukleozidov, mechennyh stabil'nymi izotopami ^2H i ^{13}C s vysokimi stepenjami izotopnogo obogashhenija, avtoref. diss. kand. him. nauk.* Moskva: MGATHT im. M.V. Lomonosova. 1996.
2. LeMaster D. M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1990. Vol. 19(2). P. 243–266.
3. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment // *J. Chem. Educ* 1986. Vol. 62(7). P. 633–638.
4. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvets V.I. Mass-spectrometric determination of levels of enrichment of ^2H and ^{13}C in molecules of amino acids of various bacterial objects // *Bioorganic Chemistry.* 1996. V. 22. № 10–11. P. 856–869.
5. Crespi H. L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins. *Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds. Proceedings of the Second International Symposium.* New York: Elsevier. 1986. 115 p.
6. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvec V.I. *Metody poluchenija aminokislot i belkov, mechennyh stabil'nymi izotopami ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O* // *Biotechnologija.* 1996. № 10. S. 24–40.
7. Matthews H. R., Kathleen S., Matthews K. and Stanley J. Selectively deuterated amino acid analogues. Synthesis, incorporation into proteins and NMR properties // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1977. V. 497. P. 1–13.
8. LeMaster D. M., Cronan J. E. 'Biosynthetic production of ^{13}C -labeled amino acids with site-specific enrichment', // *Journal of Biological Chemistry.* 1982. V. 257. № 3. P. 1224–1230.
9. Mosin O.V. & Ignatov I. Microbiological synthesis of ^2H -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-

positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* // *International Journal of Biomedicine*. 2013. V. 3. No 2. P. 132–138.

10. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Studying of microbial synthesis of deuterium labeled L-phenylalanine by methylotrophic bacterium *Brevibacterium Methylicum* on media with different content of heavy water // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2012. V. 4. No 1. P. 11–22.

11. Patel G. B., Sprott G. D., Ekiel I. Production of specifically labeled compounds by methanobacterium *espanolae* grown on H₂-CO₂ plus [¹³C]acetate // *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. V. 59. No 4. P. 1099–1103.

12. Mosin O.V., Shvec V.I., Skladnev D.A. Biosintez transmembrannogo fotohromnogo belka [2H]bakteriorodopsina, mechnogo dejteriem po ostatkam aromatcheskih aminokislot [2,3,4,5,6-2H₅]Phe, [3,5-2H₂]Tyr and [2,4,5,6,7-2H₅]Trp // *Problemy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii*. 2013. No 8. S. C. 29–39.

13. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of ²H-labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2013. V. 7. No 3. P. 249–260.

14. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. Incorporation of [2,3,4,5,6-²H]phenylalanine, [3,5-²H]tyrosine, and [2,4,5,6,7-²H]tryptophan into bacteriorhodopsin molecule of bacterium *Halobacterium halobium* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 1999. V.35. No 1. P. 34–42.

15. Neugebauer D.C., Zingsheim H.P., Oesterhelt D. Recrystallization of the purple membrane *in vivo* and *in vitro* // *Journal Molecular Biology*. 1978. V. 123. C. 247–257.

16. Oesterhelt D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from *Halophilic Archaea* *Curr. Op.* // *Struct. Biol.* 1988. V. 8. P. 489–500.

17. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. No 8. P. 911–918.

18. Skladnev D.A., Mosin O.V., Egorova T.A., Eremin S.V., Shvec V.I. Metilotrofnye bakterii – istochniki izotopnomechenyh 2N- i 13S-aminokislot // *Biotehnologija*. 1996. No 5. S. 25–34.

19. Karnaukhova E.N., Mosin O.V., Reshetova O.S. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* // *Amino Acids*. 1993. V. 5. N 1. P. 125.

20. Mosin O. V., Skladnev D. A., Shvets V. I. Biosynthesis of ²H-labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1998. Vol. 62(2). P. 225–229.

21. Mosin O.V., Ignatov I. Prirodnyj foto-preobrazujushhij fotohromnyj transmembrannyj belkovyj material bakteriorodopsin iz purpurnyh membran galobakterii *Halobacterium halobium* // *Nano i mikrosistemnaja tehnika*. 2013. No 7. S. 47–54.

22. Ignatov I., Mosin O.V. Photoreceptors in visual perception and additive color mixing. Bacteriorhodopsin in nano- and biotechnologies // *Advances in Physics Theories and Applications*. 2014. V. 27. P. 20–37.

23. Cohen J. S., Putter I. The isolation of deuterated amino acids.// *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. V. 222. P. 515–520.

24. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins // *Analytical Biochemistry*. 1974. V. 60, No 1. P. 45–50.

25. Egorova T.A., Mosin O.V., Eremin S.V., Karnaukhova E.N., Zvonkova E.N., Shvec V.I. Razdelenie aminokislot belkovyh gidrolizatov prirodnyh ob'ektom metodom VJeZhH v vide karbobenzoksiproizvodnyh // *Biotehnologija*. 1993. No 8. S. 21–25.

26. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. Biosynthesis of ²H-labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1998. V. 62. No 2. P. 225–229.

27. G. Shlegel'. *Obshhaja mikrobiologija* / pod red. E.N. Kondrat'evoj. Moskva: Mir. 1987. 255 s.

УДК 579.871.08:577.112.385.4.08

Микробиологический синтез ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот и белков различного уровня изотопного обогащения¹Олег Викторович Мосин²Игнат Игнатов³Дмитрий Анатольевич Складнев⁴Виталий Иванович Швец

¹Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская федерация

Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук

103316, Москва, ул. Талалихина, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

²Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария

Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ), директор НИЦ МБ.

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

³Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции

промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация

Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1.

E-mail: genetika@genetika.ru

⁴Московский государственный университет тонких химических технологий им.

М.В. Ломоносова, Российская Федерация

Академик РАН, доктор химических наук, заведующий кафедрой биотехнологии и нанобиотехнологии

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

Аннотация. Методом микробиологического синтеза получены и исследованы масс-спектрометрией электронного удара уровни включения стабильных изотопов дейтерия (^2H) и углерода-13 (^{13}C) в молекулы секретируемых аминокислот *L*-фенилаланин-продуцирующего штамма *Brevibacterium methylicum* и *L*-лейцин-продуцирующего штамма *Methylobacillus flagellatum* и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы при выращивании бактерий на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов [^2H]метанол, [^{13}C]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$. Также осуществлено включение *L*-[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланина, *L*-[3,5- ^2H]тирозина и *L*-[2,4,5,6,7- ^2H]триптофана в трансмембранный белок бактериородопсин, синтезируемый фотоорганотрофной галобактерией *Halobacterium halobium ET 1001*. Для масс-спектрометрического анализа мультикомпонентные смеси ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов (гидролиз в 6 М ^2HCl (3% фенол) и 2 М $\text{Ba}(\text{OH})_2$), модифицировали в *N*-бензилоксикарбонил-производные аминокислот и метиловые эфиры *N*-5-диметиламинонафталин-1-сульфонил-производных аминокислот, которые препаративно разделяли методом ОФ ВЭЖХ. Полученные [^2H]- и [^{13}C]аминокислоты представляли собой смеси, различающиеся количеством включенных в молекулу изотопов. Уровни включения ^2H и ^{13}C в молекулы секретируемых аминокислот и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы варьируют в зависимости от содержания ^2H - и ^{13}C -меченых субстратов в ростовых средах и различаются для разных аминокислот (до 20 ат.% для *L*-лейцина/изолейцина и до 97,5 ат.% для *L*-аланина).

Ключевые слова: стабильные изотопы; метилотрофные бактерии; галобактерии; изотопно-меченые аминокислоты; бактериородопсин.