



# European Reviews of Chemical Research

Has been issued since 2014. ISSN 2312-7708  
2014. Vol.(2). № 2. Issued 4 times a year

## EDITORIAL STAFF

**Dr. Bekhterev Viktor** – Sochi State University, Sochi, Russian Federation (Editor-in-Chief)  
**Dr. Kuvshinov Gennadiy** – Sochi State University, Sochi, Russian Federation

## EDITORIAL BOARD

**Dr. Elyukhin Vyacheslav** – Center of Investigations and Advanced Education, Mexico, Mexico  
**Dr. Maskaeva Larisa** – Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation  
**Dr. Md Azree Othuman Mydin** – Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia  
**Dr. Navrotskii Aleksandr** – Volgograd State Technical University, Volgograd, Russian Federation  
**Dr. Ojovan Michael** – Imperial College London, London, UK  
**Dr. Popov Anatoliy** – University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

The journal is registered by Federal Service for Supervision of Mass Media, Communications and Protection of Cultural Heritage (Russian Federation). Registration Certificate ПИИ № ФС77-57042 25.02.2014.

Journal is indexed by: **CrossRef** (UK), **Electronic scientific library** (Russia), **Journal Index** (USA), **Open Academic Journals Index** (Russia), **ResearchBib** (Japan), **Scientific Indexing Services** (USA)

All manuscripts are peer reviewed by experts in the respective field. Authors of the manuscripts bear responsibility for their content, credibility and reliability.

Editorial board doesn't expect the manuscripts' authors to always agree with its opinion.

Postal Address: 26/2 Konstitutcii, Office 6  
354000 Sochi, Russian Federation

Website: <http://ejournal14.com/en/index.html>  
E-mail: [evr2010@rambler.ru](mailto:evr2010@rambler.ru)  
Founder and Editor: Academic Publishing House *Researcher*

Passed for printing 15.12.14.  
Format 21 × 29,7/4.  
Enamel-paper. Print screen.  
Headset Georgia.  
Ych. Izd. l. 5,1. Ysl. pech. l. 5,8.  
Circulation 500 copies. Order № 102.

**European Reviews of Chemical Research**

**2014**

**№ 2**



# Европейские обзоры химических исследований

Издается с 2014 г. ISSN 2312-7708  
2014. № 2 (2). Выходит 4 раза в год.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Бехтерев Виктор** – Сочинский государственный университет, Сочи, Российская Федерация (Гл. редактор)

**Кувшинов Геннадий** – Сочинский государственный университет, Сочи, Российская Федерация

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Елюхин Вячеслав** – Центр исследований и передового обучения, Мехико, Мексика

**Маскаева Лариса** – Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Российская Федерация

**Мд Азри Отхуман Мудин** – Университет Малайзии, Пенанг, Малайзия

**Навроцкий Александр** – Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Российская Федерация

**Ожован Михаил** – Имперский колледж Лондона, г. Лондон, Великобритания

**Попов Анатолий** – Пенсильванский университет, Филадельфия, США

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия (Российская Федерация). Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-57042 25.02.2014.

Журнал индексируется в: **CrossRef** (Великобритания), **Journal Index** (США), **Научная электронная библиотека** (Россия), **Open Academic Journals Index** (Россия), **ResearchBib** (Япония), **Scientific Indexing Services** (США)

Статьи, поступившие в редакцию, рецензируются. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несут авторы публикаций.

Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов.

Адрес редакции: 354000, Российская Федерация,  
г. Сочи, ул. Конституции, д. 26/2, оф. 6  
Сайт журнала: <http://ejournal14.com>  
E-mail: [evr2010@rambler.ru](mailto:evr2010@rambler.ru)

Учредитель и издатель: ООО «Научный  
издательский дом "Исследователь"» - Academic  
Publishing House *Researcher*

Подписано в печать 15.12.14.

Формат 21 × 29,7/4.

Бумага офсетная.

Печать трафаретная.

Гарнитура Georgia.

Уч.-изд. л. 5,1. Усл. печ. л. 5,8.

Тираж 500 экз. Заказ № 102.

## CONTENTS

Ekaterina A. Fedorova, Larisa N. Maskaeva, Vyacheslav F. Markov The Thermodynamic Estimation of Forming Possibility of $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ thin Films and Investigation of the Composition and Morphology .....	76
Aleksey Y. Kirsanov, Vyacheslav F. Markov, Larisa N. Maskaeva Computer Simulation as a way to Determine the Conditions of Purposeful Synthesis of $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$ Solid Solutions by Hydrochemical Deposition .....	86
Oleg Mosin, Ignat Ignatov, Dmitry Skladnev, Vitaly Shvets Biosynthetic incorporation of deuterium-labeled aromatic amino acids - [ $2,3,4,5,6$ - $^2\text{H}_5$ ]phenylalanine, [ $3,5$ - $^2\text{H}_2$ ]tyrosine and [ $2,4,5,6,7$ - $^2\text{H}_5$ ]tryptophan into the molecule of transmembrane protein bacteriorhodopsin from halobacterium <i>Halobacterium halobium ET 1001</i> .....	92
Oleg Mosin, Ignat Ignatov, Dmitry Skladnev, Vitaly Shvets Microbiological Synthesis of $^2\text{H}$ - and $^{13}\text{C}$ -Labeled Amino Acids and Proteins With Various Levels of Isotopic Enrichment .....	109

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. 2, No. 2, pp. 76-85, 2014

DOI: 10.13187/erchr.2014.2.76  
[www.ejournal14.com](http://www.ejournal14.com)



UDC 546.561

### The Thermodynamic Estimation of Forming Possibility of $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ thin Films and Investigation of the Composition and Morphology

<sup>1</sup> Ekaterina A. Fedorova<sup>2</sup> Larisa N. Maskaeva<sup>3</sup> Vyacheslav F. Markov

<sup>1</sup> Ural federal university of a name of the first President of Russia B.N.Yeltsin, Russian Federation 620002, Ekaterinburg, Mira Street, 19  
Third year of training, graduate student  
E-mail: ka\_fed-ra@mail.ru.

<sup>2</sup> Ural federal university of a name of the first President of Russia B.N.Yeltsin, Russian Federation 620002, Russia, Ekaterinburg, Mira Street, 19  
D. Sc. (Chemical), Professor  
E-mail: mln@ural.ru

<sup>3</sup> Ural federal university of a name of the first President of Russia B.N.Yeltsin, Russian Federation 620002, Russia, Ekaterinburg, Mira Street, 19  
D. Sc. (Chemical), Professor  
E-mail: v.f.markov@ustu.ru

#### Abstract

The boundary formation conditions of solid phase of copper(I) selenide and copper(I) hydroxide determined by means of the thermodynamic analysis for systems “copper(II) chloride – hydroxylamine hydrochloride – sodium selenosulphate” considering the formation of crystal nucleus with critical radii. It is shown that obtaining nanocrystalline films of copper(I) selenide nonstoichiometric composition  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  is possible by chemical deposition. The thickness of the thin film layers determined by the method interferometry, amounted to 100–400 nm. The composition and morphology of the deposited semiconductor material investigated by energy-dispersive spectroscopy and scanning electron microscopy. Revealed that freshly layers consist of polyhedral shape crystallites, and composition corresponds to the formula  $\text{Cu}_{1.5}\text{Se}$ .

**Keywords:** the boundary conditions of formation; ionic equilibrium; copper(I) selenide; chemical bath deposition.

#### Введение

Известно, что функциональные свойства полупроводниковых наноматериалов в значительной степени определяются особенностями технологии их получения. С этой точки зрения, большой интерес представляет исследование степени влияния контролируемых условий роста синтезируемых слоев на возможность варьирования параметров формирующихся наноструктур (стехиометрический состав, кристаллическая структура и др.). Установив указанную зависимость, можно легко управлять физико-химическими свойствами полупроводниковых соединений, тем самым расширив область их применения.

Значительный интерес для микро- и оптоэлектроники, а также солнечной энергетики представляет тонкопленочный материал селенида меди(I) [1–4], при этом повышенное внимание обусловлено его возможностью формироваться в различных стехиометрических составах, что обеспечивает разнообразие специфических фото- и термоэлектрических свойств. Так, согласно работам [1, 5, 6], ширина запрещенной зоны, характерная для тонких пленок селенида меди(I) нестехиометрического состава  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ , изменяется в диапазоне 1,1–2,3 эВ. Указанные значения являются оптимальными как для применения пленок  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  в качестве поглощающего материала и прекурсора многокомпонентных солнечных элементов, в частности,  $\text{Cu}(\text{In,Ga})\text{Se}_2$ , так и для использования селенида меди(I) в качестве прозрачных слоев в полупроводниковых солнечных преобразователях.

За последние годы для получения тонкопленочных наноструктур  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  было освоено большое количество методов: однократное и вакуумное испарение, селенизация [2, 3], молекулярно-лучевая эпитаксия [7], катодное осаждение [3], золь-гель метод [1, 8], электрохимическое осаждение [1, 3, 7, 8], сонохимический [6] и сольвотермальный метод получения [1, 6, 8]. Однако высокотемпературный характер процессов, лежащих в их основе, необходимость в глубоком вакууме, использование исходных веществ высокой чистоты и достаточно сложного аппаратного оформления с одной стороны сужают возможности получения метастабильных фаз, а с другой – удорожают их синтез.

С точки зрения создания доступных функциональных элементов на основе селенида меди(I) химическое осаждение тонких пленок из водных сред [9] является многообещающей эффективной тонкопленочной технологией, отличающейся простотой, экономичностью, экологической безопасностью, а также гибкостью управления процессом и широкими возможностями варьирования состава и функциональных свойств.

Авторы работ [10–12] синтезировали тонкие пленки селенида меди(I) химическим осаждением из растворов, при этом используя различные условия процесса и реакционные смеси, тем самым, получая материалы с различным стехиометрическим составом и кристаллической структурой, что значительно повлияло на полупроводниковые свойства функциональных элементов.

Очевидно, что для получения качественных тонкопленочных материалов химическим осаждением из растворов, необходимо учитывать большое количество переменных параметров таких, как природа реагентов и комплексообразующих агентов, pH реакционной ванны, температура и время осаждения, природа подложки, которые оказывают существенное влияние на конечный состав и свойства продуктов. Поэтому весьма актуальным является не только поиск новых реакционных смесей, обеспечивающих получение высокофункциональных пленок  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ , но и комплексные физико-химические исследования, заключающиеся в обоснованном выборе условий целенаправленного синтеза селенида меди(I).

Настоящая работа посвящена термодинамической оценке возможности образования твердой фазы селенида меди(I) в системе “хлорид меди – гидросиламин солянокислый – селеносульфат натрия”, химическому осаждению тонких пленок  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ , а также изучению их состава и морфологии.

#### Экспериментальная часть

Выбор состава реакционной смеси и определение условий коллоидно-химического осаждения пленок селенида меди(I) значительно облегчается после проведения термодинамических расчетов, позволяющих спрогнозировать граничные условия осаждения указанного труднорастворимого соединения, а также примесной фазы в виде гидроксида меди. Анализ литературных данных и проведенные предварительные исследования позволили выбрать основные компоненты реакционной смеси для синтеза этого полупроводникового материала.

Гидрохимическое осаждение пленок селенида меди осуществляли на предварительно обезжиренные полированные ситалловые пластины марки СТ-50-1 размером 30×24 мм из реакционной смеси, содержащей хлорид меди  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , гидросиламин солянокислый  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  и селеносульфат натрия  $\text{Na}_2\text{SeSO}_3$ . Заметим, что гидросиламин солянокислый вводился в реакционную смесь для восстановления двухвалентной меди  $\text{Cu}^{2+}$  в ее одновалентную форму  $\text{Cu}^+$ .

Синтез пленок осуществляли при температуре 333 К в течение 120 минут в герметичных реакторах из молибденового стекла, в которые помещали подложки, закрепленные в специально изготовленные фторопластовые держатели. Реакторы устанавливали в жидкостный термостат марки ТС-ТБ-10, обеспечивающий точность поддержания температуры  $\pm 0,1^\circ\text{K}$ .

Толщина синтезированных слоев оценивали с помощью интерференционного микроскопа (микроинтерферометра Линника) МИИ-4М.

Изучение структурно-морфологических характеристик и элементного состава полученных тонких пленок проводили методом растровой электронной микроскопии. Микроскоп MIRA3LMV использовали для получения электронно-микроскопических изображений с увеличением от 10 000 до 100 000 крат при ускоряющем напряжении электронного пучка 10 кВ. Также применяли растровый электронный микроскоп JEOL JSM-5900 LV с приставкой для энерго-дисперсионного (EDX) анализа – рентгеновским спектрометром EDS Inca Energy 250. При проведении элементного анализа глубина анализируемого слоя составляла  $\sim 1$  мкм при напряжении первичного пучка 20 кВ. Точность определения элементного состава пленок составляла около 10 %.

Тип проводимости полупроводниковых слоев устанавливался методом измерения термоэдс.

### Результаты и их обсуждение

Для выбора оптимальных условий химического осаждения твердой фазы селенида меди(I) из раствора был проведен термодинамический расчет концентрационной области и pH его образования, а также основной примесной фазы – гидроксида меди(I) по методике, описанной в [9, 13]. С этой целью был проведен анализ ионных равновесий, устанавливающихся в многокомпонентной системе: “хлорид меди(II) – гидросиламин солянокислый – селеносульфат натрия”.

Как уже отмечалось ранее, гидросиламин солянокислый вводили в реакционную смесь для восстановления двухвалентной меди в одновалентную. Поэтому реакцию образования селенида меди(I) при использовании в качестве халькогенизатора селеносульфата натрия можно представить в следующем виде:



В основу анализа условий осаждения селенидов металлов из растворов, содержащих селеносульфат натрия, легло положение об обратимом характере его гидролитического разложения [14]. Необходимо иметь в виду, что в процессе взаимодействия селеносульфата натрия с водой происходит образование селеноводорода  $\text{H}_2\text{Se}$ .

Для определения концентрационных граничных условий осаждения селенида меди(I) селеносульфатом натрия, т.е. минимально необходимой концентрации соли металла, обеспечивающей образование твердой фазы, использовали выражение [9, 13]:

$$pC_{\text{H}} = \frac{1}{2} p\Pi_{\text{Cu}_2\text{Se}} - p\alpha_{\text{Cu}^+} - \frac{1}{2} (pk_{\text{H}_2\text{Se}} - 2p\text{H} + pK_{\text{CC}} + p[\text{SeSO}_3^{2-}]_{\text{H}} - p[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{H}}) - \frac{2\sigma V_{\text{M}}}{2,3RT r_{\text{кр}}}, \quad (2)$$

где  $p$  – показатель (отрицательный десятичный логарифм);  $C_{\text{H}}$  – минимально необходимая для образования твердой фазы концентрация соли меди;  $\Pi_{\text{Cu}_2\text{Se}}$  – произведение растворимости селенида меди(I);  $\alpha_{\text{Cu}^+}$  – долевая концентрация свободных ионов металла, способных вступать в химическую реакцию;  $k_{\text{H}_2\text{Se}}$  – константа ионизации селеноводорода, продукта разложения халькогенизатора;  $K_{\text{CC}}$  – константа гидролитического разложения селеносульфата натрия;  $[\text{SeSO}_3^{2-}]_{\text{H}}$  – начальная концентрация селеносульфат-ионов в растворе;  $[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{H}}$  – начальная концентрация сульфат-ионов в растворе;  $\sigma$  – удельная поверхностная энергия селенида металла ( $\text{Дж}/\text{м}^2$ );  $V_{\text{M}}$  – мольный объем селенида меди(I) ( $\text{м}^3/\text{моль}$ );  $r_{\text{кр}}$  – радиус зародыша критического размера ( $\text{м}$ );  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $T$  – температура процесса ( $\text{K}$ ).

Последнее слагаемое в выражении (2) характеризует соотношение Томпсона-Оствальда для критического пересыщения [15], учитывающее зарождение и устойчивое формирование твердой фазы, т.е. образование зародышей критического размера. Уравнение (2) достаточно полно описывает граничные условия образования твердой фазы селенида меди(I) при взаимодействии его соли с селеносульфатом натрия. Анализ указанного выражения показывает, что условия образования селенида, т.е. начальная концентрация соли меди, зависят от следующих параметров системы: pH реакционной смеси, концентрации селеносульфата натрия и величины долевой концентрации свободных ионов меди, способных вступать в химическую реакцию  $\alpha_{\text{Cu}^+}$ , которая определяется прочностью комплексных ионов металла в растворе. Наличие в системе сильных лигандов или их высокая концентрация позволяет регулировать количество незакомплексованных ионов металла в растворе, и, следовательно, скорость образования твердой фазы селенида меди(I).

Наряду с селенидом меди(I) в растворе возможно образование его гидроксида. Минимальную начальную концентрацию соли металла  $pC_{\text{H}}$ , обеспечивающую образование фазы гидроксида металла, определяли по уравнению [9]:

$$pC_{\text{H}} = p\text{PP}_{\text{CuOH}} - p\alpha_{\text{Cu}^+} - 2pK_{\text{W}} + 2p\text{H} \quad (3)$$

где  $\text{PP}_{\text{CuOH}}$  – произведение растворимости гидроксида одновалентной меди;  $K_{\text{W}}$  – ионное произведение воды.

Заметим, что осаждение гидроксида меди(I) определяется величинами pH и долей свободных ионов металла  $\alpha_{\text{Cu}^+}$  в реакционной ванне [16].

Уравнение (2) в графической форме в координатах  $pC_{\text{H}} = f(\text{pH})$  достаточно полно описывает граничные условия образования твердой фазы селенида меди(I) при взаимодействии соли меди с халкогенизатором. Определение начальной минимально необходимой концентрации металла проводилось с использованием термодинамических констант  $K_{\text{CC}}$ ,  $K_{\text{W}}$ ,  $k_{\text{H}_2\text{Se}}$ ,  $\text{PP}_{\text{Cu}_2\text{Se}}$ ,  $R$ , значений pH,  $\sigma$ ,  $V_{\text{M}}$  и расчетной величины  $\alpha_{\text{Cu}^+}$ , зависящей от pH.

Основными комплексообразующими агентами, препятствующими быстрому выделению меди(I) в осадок, в рассматриваемой системе “ $\text{CuCl}_2 - \text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl} - \text{Na}_2\text{SeSO}_3$ ” являются гидроксид- и хлорид-ионы, образующие комплексы со следующими показателями констант нестойкости, соответственно:  $pK_{\text{H}}(\text{CuOH}) = 6,0$  [17],  $pK_{\text{H}}(\text{CuCl}_2^-) = 5,35$  [18],  $pK_{\text{H}}(\text{CuCl}_3^{2-}) = 5,63$  [18].

Расчеты для построения зависимостей начальной концентрации металла от pH реакционной смеси  $pC_{\text{H}} = f(\text{pH})$  были проведены при следующих значениях термодинамических величин и констант:  $p\text{PP}_{\text{Cu}_2\text{Se}} = 60,80$  [19],  $p\text{PP}_{\text{CuOH}} = 14,70$  [19],  $pK_{\text{W}} = 14,00$  [18],  $pK_{\text{CC}} = 30,75$  [9],  $pK_{\text{H}_2\text{Se}} = 14,89$  [18],  $\sigma = 1,50 \text{ Дж/м}^2$  [20],

$$V_{\text{M}}^{\text{Cu}_2\text{Se}} = 30,5 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{моль}, r_{\text{кр}} = 3,5 \cdot 10^{-9} \text{ м}, T = 298 \text{ К}.$$

С использованием уравнений (2, 3) в графической форме были построены зависимости  $pC_{\text{H}} = f(\text{pH})$ , представленные на рис. 1, которые характеризуют равновесие, устанавливающееся в системе “ $\text{CuCl}_2 - \text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl} - \text{Na}_2\text{SeSO}_3$ ” между осадком  $\text{Cu}_2\text{Se}$  (кривые 1, 2) и находящимися в растворе комплексными формами меди. Условия образования твердой фазы  $\text{Cu}_2\text{Se}$  без учета кристаллизационного фактора описывает на рисунке кривая 1. Видно, что в используемой реакционной системе может образоваться и гидроксид одновалентной меди (кривая 3). Результаты выполненных расчетов позволили выбрать область pH и концентрации компонентов реакционной смеси, необходимые для осаждения пленок селенида меди(I).

Как следует из приведенных результатов расчетов, введение определенного количества селеносульфата натрия обеспечивает образование твердой фазы селенида меди(I) во всем рассматриваемом интервале значений pH. При этом наиболее предпочтительной является

щелочная область. Образование гидроксида меди(I) в заданных условиях становится возможным при pH больше 3,5. Гидроксидная фаза с одной стороны ответственна при химическом осаждении пленок за их адгезию к подложке, однако с другой затрудняет образование селенида металла. Таким образом, анализ ионных равновесий в системе позволяет предположить, что процесс формирования пленки селенида меди(I) будет протекать по гидроксидной схеме, то есть через образование фазы гидроксида меди(I) с последующей ее селенизацией.

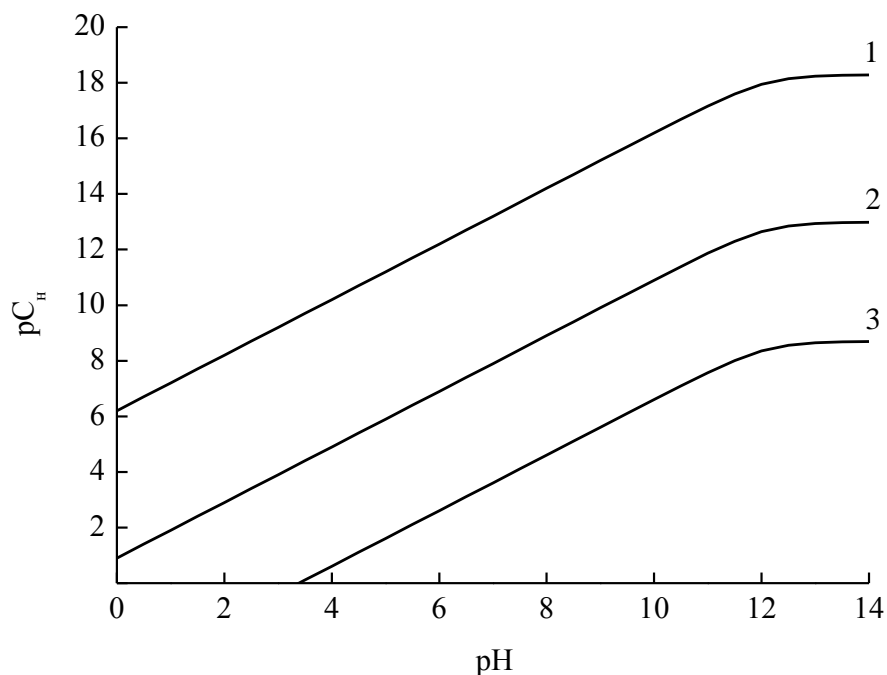


Рис. 1. Граничные условия образования твердых фаз  $\text{Cu}_2\text{Se}$  (1, 2) и  $\text{CuOH}$  (3) в системе “ $\text{CuCl}_2 - \text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl} - \text{Na}_2\text{SeSO}_3$ ” при 298 К: без учета кристаллизационного фактора (1); с учетом кристаллизационного фактора (2)

Стоит также отметить, что расчеты граничных условий осаждения селенида меди(I) селеносульфатом натрия осуществлялись при 298 К, однако, как показали проведенные предварительные эксперименты, пленки  $\text{Cu}_2\text{Se}$  целесообразно осаждать при более высоких температурах (333 К), обеспечивающих их быстрый рост.

В ходе проведенных экспериментов в системе “ $\text{CuCl}_2 - \text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl} - \text{Na}_2\text{SeSO}_3$ ” были синтезированы зеркальные пленки селенида меди темно-серого цвета толщиной от 100 до 400 нм, характеризующиеся хорошей адгезией к ситалловой подложке.

Для определения элементного состава пленок был использован метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX). В таблице приведены результаты элементного анализа типичного образца свежесозданного слоя.



**Элементный состав пленок, осажденных в системе “CuCl<sub>2</sub> – NH<sub>2</sub>OH·HCl – Na<sub>2</sub>SeSO<sub>3</sub>” по результатам энерго-дисперсионного анализа**

Элемент	Вес. %	Ат. %
Cu	52,97	54,88
Se	43,98	36,68
O	1,23	5,06
Cl	1,82	3,38

Результаты энерго-дисперсионного элементного анализа полученных слоев селенида меди показали, что они характеризуются относительно высокой нестехиометричностью. Из таблицы видно, что содержание меди в пленке превышает содержание селена в 1,5 раза, т.е. выполняется соотношение  $Cu/Se = 1,5$ . Отсюда можно заключить, что в ходе гидрохимического осаждения пленок селенида меди(I) в используемой реакционной системе были сформированы нестехиометрические по составу слои  $Cu_{1,5}Se$ . Стоит также отметить, что по данным элементного анализа отдельных агрегатов кристаллитов на поверхности соотношение содержания меди и селена в них несколько отличается и составляет  $1,63 \pm 0,1$ . Причина нестехиометрии заключается в присутствии в пленке кислородсодержащих фаз меди. Это объясняется, в первую очередь, спецификой гидрохимического синтеза, протекание которого предполагает возможность образования и включения в объем и поверхностные слои получаемых пленок кислородсодержащих примесей оксидной и гидроксидной природы.

Характеристические линии таких фоновых компонентов, как кремний, углерод, титан и кальций в энергетическом спектре, изображенном на рис. 2, обусловлены влиянием ситалловой подложки, в то время как наличие в тонкопленочной структуре хлора связано с введением в систему солянокислого гидроксиламина.

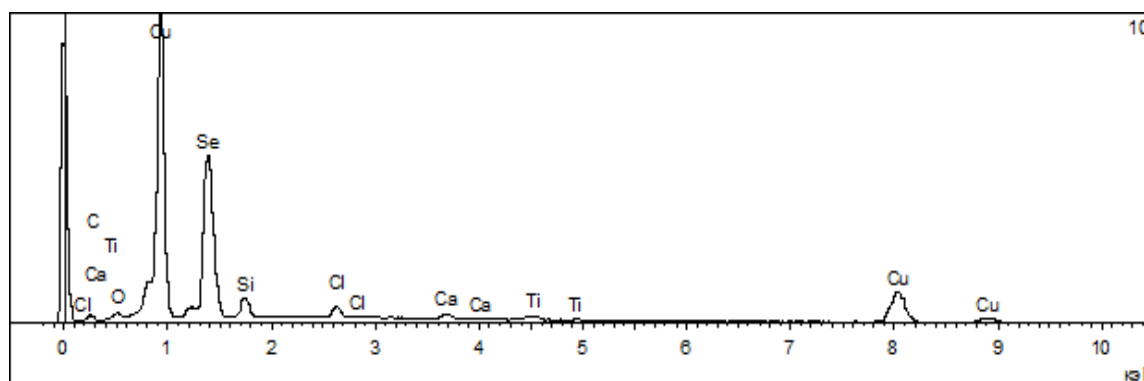


Рис. 2. Спектрограмма энерго-дисперсионного анализа тонких пленок  $Cu_{2-x}Se$ , полученных гидрохимическим осаждением при температуре синтеза 333 К

Электронно-микроскопические изображения свежесаженной пленки нестехиометрического состава  $Cu_{2-x}Se$  при различном увеличении, представлены на рис. 3.

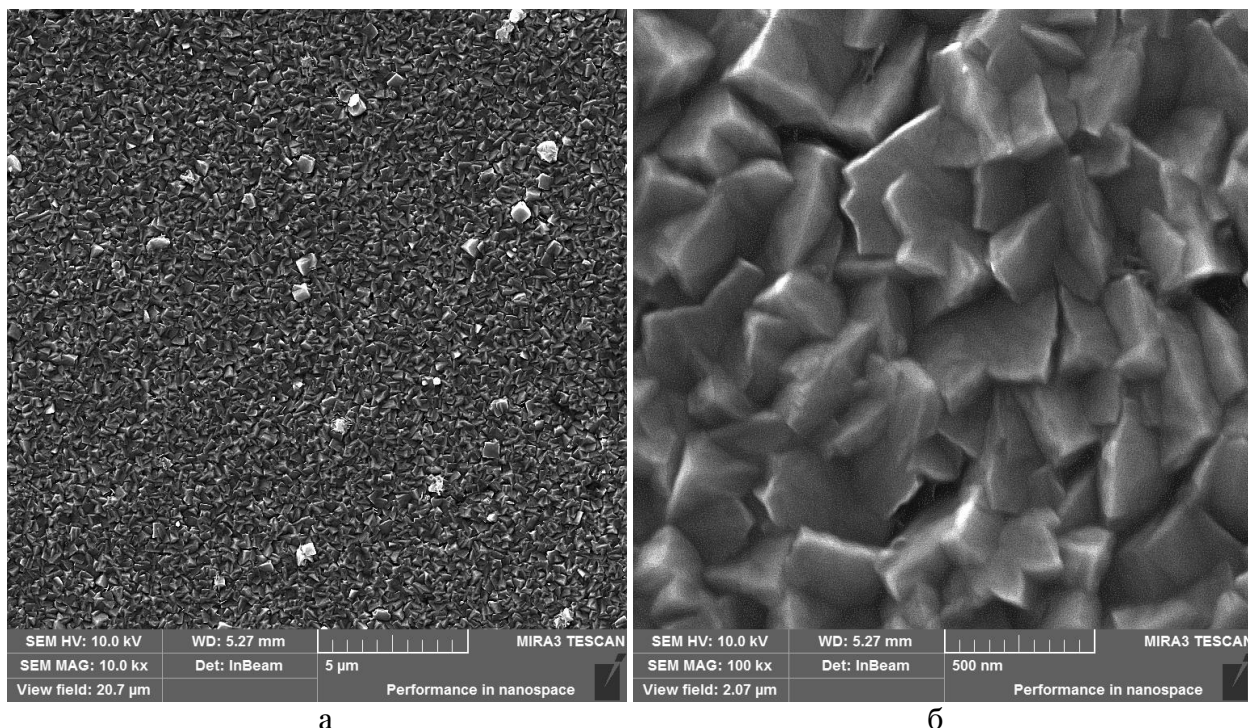


Рис. 3. Электронно-микроскопические изображения пленки  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ , полученной при 333 К и продолжительности процесса – 120 мин.  
Увеличение: 10 000 (а) и 100 000 (б)

Анализ микроизображений позволяет сделать вывод о том, что свежесажженные слои  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  состоят из кристаллитов полиэдрической формы.

В работе был определен тип проводимости синтезированных пленок  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  по знаку термоэдс при использовании горячего зонда. Было установлено, что, исходя из знака термоэдс в сравнении с полупроводниковым кремнием марки КДБ, осажженные слои соответствуют  $p$ -типу проводимости. Это полностью согласуется с литературными данными [21, 22]: для  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  характерна дырочная проводимость. Однако стоит помнить, что используемый метод дает лишь общие представления о полупроводниковых свойствах пленок.

### Выводы

1. Путем расчета ионных равновесий в системе “хлорид меди(II) – гидросиламин солянокислый – селеносульфат натрия” определены граничные условия и концентрационные области образования селенида меди(I), а также его гидроксида при температуре 298 К. Показано, что наиболее предпочтительной для осаждения твердой фазы селенида меди(I) является щелочная область рН.

2. Гидрохимическим осаждением были получены пленки селенида меди(I) нестехиометрического состава  $\text{Cu}_{1,5}\text{Se}$  толщиной 100–400 нм с хорошей адгезией к ситалловой подложке.

3. Электронно-микроскопическими исследованиями выявлено, что свежесажженная пленка  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  состоит из кристаллитов полиэдрической формы;

4. Полученные полупроводниковые слои  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  обладают дырочным типом проводимости, что было определено по результатам измерения знака термоэдс.

### Примечания:

1. Chemical synthesis of  $\text{Cu}_2\text{Se}$  nanoparticles at room temperature / F. Rong, Y. Bai, T. Chen et. al. // Materials research bulletin. 2012. Vol. 47. P. 92–95.

2. Zainal Z. Copper selenide thin films prepared using combination of chemical precipitation and dip coating method / Z. Zainal, S. Nagalingam, T.C. Loo // Materials Letters. 2005. Vol. 59. P. 1391–1394.

3. Dhanam M. High-temperature conductivity in chemical bath deposited copper selenide thin films / M. Dhanam, P.K. Manoj, R.R. Prabhu // *Journal of crystal growth*. 2005. Vol. 280. P. 425–435.
4. Liu T.-C. Characterization of  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  thin films synthesized from electrochemical deposition / T.-C. Liu, Y. Hu, W.-B. Chang // *Materials science and engineering B*. 2014. Vol. 180. P. 33–37.
5. Чопра К. Тонкопленочные солнечные элементы / К. Чопра, С. Дас. М.: Мир, 1986. 435 с.
6. Controllable synthesis of copper selenide nanocrystals through a green paraffin-acetate method / A. Zhang, Q. Ma, Z. Wang et. al. // *Materials chemistry and physics*. 2010. Vol. 124. P. 916–921.
7. Template synthesized Cu-Se microstructures as resonant tunneling diodes / M. Chaudhri, A. Vohra, S.K. Chakarvarti et. al. // *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2006. Vol. 17. P. 189–192.
8. Solvothermal growth and morphology study of  $\text{Cu}_2\text{Se}$  films / F. Lin, G.-Q. Bian, Z.-X. Lei et. al. // *Solid State Sciences*. 2009. Vol. 11. P. 972–975.
9. Марков В.Ф. Гидрохимическое осаждение пленок сульфидов металлов: моделирование и эксперимент / В.Ф. Марков, Л.Н. Маскаева, П.Н. Иванов. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 218 с.
10. Effect of thermal processing on optical and electrical properties of copper selenide thin films / V.M. García, L. Guerrero, M.T.S. Nair et. al. // *Superficies y Vacío*. 1999. Vol. 9. P. 213–218
11. Padam G.K. The properties of chemically deposited  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  thin films. *Thin Solid Films*. 1987. Vol. 150. P. 89–92.
12. Chemical bath deposition of cubic copper(I) selenide and its room temperature transformation to the orthorhombic phase / C. Lévy-Clément, M. Neumann-Spallart, S.K. Haram et. al. // *Thin Solid Films*. 1997. Vol. 302. P. 12–16.
13. Марков В.Ф. Расчет граничных условий образования твердой фазы сульфидов и селенидов осаждением тио- и селеномочевинной / В.Ф. Марков, Л.Н. Маскаева // *Журнал физической химии*. 2010. Т. 86. № 8. С. 1421–1426
14. Китаев Г.А. Анализ условий получения селенидов металлов в водных растворах селеносульфата натрия / Г.А. Китаев, А.Ж. Хворенкова // *Журнал прикладной химии*. 1999. Т. 71. № 8. С. 1261–1264.
15. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии. М.: Химия, 1989. 462 с.
16. Марков В.Ф. Расчет условий образования твердой фазы халькогенидов металлов при гидрохимическом осаждении / В.Ф. Марков, Л.Н. Маскаева, П.Н. Иванов // *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2004. Т. 6, № 4, С. 374–380
17. Martell A.E., Hancock R.D. Metal complexes in aqueous solutions / A.E. Martell, R.D. Hancock. New York: Plenum Press, 1996. 264 p.
18. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989. 448 с.
19. Кумок В.Н. Произведения растворимости / В.Н. Кумок, О.М. Кулешова, Л.А. Карабин. Новосибирск: Наука, 1983. 266 с.
20. Таусон В.Л. Физико-химические превращения реальных кристаллов в минеральных системах / В.Л. Таусон, М.Г. Абрамович. Новосибирск: Наука, 1988. 272 с.
21. The growth of  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  thin films using nanoparticles / A. Cho, S. Ahn, J.H. Yun et. al. // *Thin solid films*. 2013. Vol. 546. P. 299–307.
22. Filippo E. Synthesis and growth mechanism of dendritic  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  microstructures / E. Filippo, D. Manno, A. Serra // *Journal of alloys and compounds*. 2012. Vol. 538. P. 8–10.

## References

1. Chemical synthesis of  $\text{Cu}_2\text{Se}$  nanoparticles at room temperature / F. Rong, Y. Bai, T. Chen et. al. // *Materials research bulletin*. 2012. Vol. 47. P. 92–95.
2. Zainal Z. Copper selenide thin films prepared using combination of chemical precipitation and dip coating method / Z. Zainal, S. Nagalingam, T.C. Loo // *Materials Letters*. 2005. Vol. 59. P. 1391–1394.

3. Dhanam M. High-temperature conductivity in chemical bath deposited copper selenide thin films / M. Dhanam, P.K. Manoj, R.R. Prabhu // *Journal of crystal growth*. 2005. Vol. 280. P. 425–435.
4. Liu T.-C. Characterization of  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  thin films synthesized from electrochemical deposition / T.-C. Liu, Y. Hu, W.-B. Chang // *Materials science and engineering B*. 2014. Vol. 180. P. 33–37.
5. Chopra K. Tonkoplennyye solnechnyye elementy / K. Chopra, S. Das. M.: Mir, 1986. 435 s.
6. Controllable synthesis of copper selenide nanocrystals through a green paraffin-acetate method / A. Zhang, Q. Ma, Z. Wang et al. // *Materials chemistry and physics*. 2010. Vol. 124. P. 916–921.
7. Template synthesized Cu-Se microstructures as resonant tunneling diodes / M. Chaudhri, A. Vohra, S.K. Chakarvarti et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2006. Vol. 17. P. 189–192.
8. Solvothermal growth and morphology study of  $\text{Cu}_2\text{Se}$  films / F. Lin, G.-Q. Bian, Z.-X. Lei et al. // *Solid State Sciences*. 2009. Vol. 11. P. 972–975.
9. Markov V.F. *Gidrokhimicheskoe osazhdenie plenok sul'fidov metallov: modelirovanie i eksperiment* / V.F. Markov, L.N. Maskaeva, P.N. Ivanov. Ekaterinburg: UrO RAN, 2006. 218 s.
10. Effect of thermal processing on optical and electrical properties of copper selenide thin films / V.M. García, L. Guerrero, M.T.S. Nair et al. // *Superficies y Vacío*. 1999. Vol. 9. P. 213–218
11. Padam G.K. The properties of chemically deposited  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  thin films. *Thin Solid Films*. 1987. Vol. 150. P. 89–92.
12. Chemical bath deposition of cubic copper(I) selenide and its room temperature transformation to the orthorhombic phase / C. Lévy-Clément, M. Neumann-Spallart, S.K. Haram et al. // *Thin Solid Films*. 1997. Vol. 302. P. 12–16.
13. Markov V.F. Raschet granichnykh uslovii obrazovaniya tverdoi fazy sul'fidov i selenidov osazhdeniem tio- i selenomochevinoi / V.F. Markov, L.N. Maskaeva // *Zhurnal fizicheskoi khimii*. 2010. T. 86. № 8. S. 1421–1426.
14. Kitaev G.A. Analiz uslovii polucheniya selenidov metallov v vodnykh rastvorakh selenosul'fata natriya / G.A. Kitaev, A.Zh. Khvorenkova // *Zhurnal prikladnoi khimii*. 1999. T. 71. № 8. S. 1261–1264.
15. Frolov Yu.G. *Kurs kolloidnoi khimii*. M.: Khimiya, 1989. 462 s.
16. Markov V.F. Raschet uslovii obrazovaniya tverdoi fazy khal'kogenidov metallov pri gidrokhimicheskome osazhdenii / V.F. Markov, L.N. Maskaeva, P.N. Ivanov // *Kondensirovannyye sredy i mezhfaznyye granitsy*. 2004. T. 6. № 4. S. 374–380.
17. Martell A.E., Hancock R.D. *Metal complexes in aqueous solutions* / A.E. Martell, R.D. Hancock. New York: Plenum Press, 1996. 264 p.
18. Lur'e Yu.Yu. *Spravochnik po analiticheskoi khimii*. M.: Khimiya, 1989. 448 s.
19. Kumok V.N. *Proizvedeniya rastvorimosti* / V.N. Kumok, O.M. Kuleshova, L.A. Karabin. Novosibirsk: Nauka, 1983. 266 s.
20. Tauson V.L. *Fiziko-khimicheskie prevrashcheniya real'nykh kristallov v mineral'nykh sistemakh* / V.L. Tauson, M.G. Abramovich. Novosibirsk: Nauka, 1988. 272 s.
21. The growth of  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  thin films using nanoparticles / A. Cho, S. Ahn, J.H. Yun et al. // *Thin solid films*. 2013. Vol. 546. P. 299–307.
22. Filippo E. Synthesis and growth mechanism of dendritic  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$  microstructures / E. Filippo, D. Manno, A. Serra // *Journal of alloys and compounds*. 2012. Vol. 538. P. 8–10.

УДК 546.561

**Термодинамическая оценка возможности образования тонких пленок  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ , исследование их состава и морфологии**<sup>1</sup> Екатерина Алексеевна Федорова<sup>2</sup> Лариса Николаевна Маскаева<sup>3</sup> Вячеслав Филиппович Марков

<sup>1</sup> Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Российская Федерация  
620002, Свердловская область, Екатеринбург, ул. Мира, 19  
Аспирант

E-mail: ka\_fed-ra@mail.ru

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Российская Федерация  
620002, Свердловская область, Екатеринбург, ул. Мира, 19  
Профессор, доктор химических наук

E-mail: mln@ural.ru

<sup>3</sup> Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Российская Федерация  
620002, Свердловская область, Екатеринбург, ул. Мира, 19  
Профессор, доктор химических наук

E-mail: v.f.markov@ustu.ru

**Аннотация.** Проведен термодинамический анализ граничных условий образования твердых фаз селенида и гидроксида меди(I) в системе “хлорид меди(II) – гидроксилламин солянокислый – селеносульфат натрия” с учетом кристаллизационного фактора. Показана возможность получения химическим осаждением нанокристаллических пленок селенида меди(I) нестехиометрического состава  $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ . Толщина тонкопленочных слоев, определенная методом интерферометрии, составила 100–400 нм. Методами энергодисперсионной спектроскопии и растровой электронной микроскопии исследованы состав и морфология осажденного полупроводникового материала. Выявлено, что свежесоздаваемые слои состоят из кристаллитов полиэдрической формы, а состав соответствует формуле  $\text{Cu}_{1,5}\text{Se}$ .

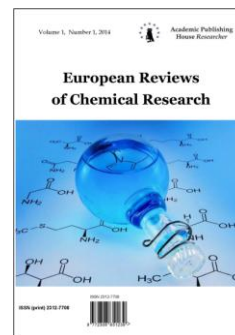
**Ключевые слова:** граничные условия образования; ионные равновесия; селенид меди(I); химическое осаждение из растворов.



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. 2, No. 2, pp. 86-91, 2014

DOI: 10.13187/erchr.2014.2.86  
[www.ejournal14.com](http://www.ejournal14.com)



UDC 546.816

## Computer Simulation as a way to Determine the Conditions of Purposeful Synthesis of $Ag_xPb_{1-x}S$ Solid Solutions by Hydrochemical Deposition

<sup>1</sup> Aleksey Y. Kirsanov  
<sup>2</sup> Vyacheslav F. Markov  
<sup>3</sup> Larisa N. Maskaeva

<sup>1</sup> Ural Federal University, Russian Federation  
28, Mira street, Ekaterinburg, Sverdlovskaya oblast, 620002  
E-mail: alexk\_ft@mail.ru

<sup>2</sup> Ural Federal University, Russian Federation  
28, Mira street, Ekaterinburg, Sverdlovskaya oblast, 620002  
Dr. (Chemistry), Professor  
E-mail: vfmarkov@list.ru

<sup>3</sup> Ural Federal University, Russian Federation  
28, Mira street, Ekaterinburg, Sverdlovskaya oblast, 620002  
Dr. (Chemistry), Professor  
E-mail: mln@ural.ru

### Abstract

In this paper authors have demonstrated the possibility of using aggregative growth model to search conditions of synthesis required composition  $Ag_xPb_{1-x}S_{1-\delta}$  thin films. According to simulation results concentration areas of forming supersaturated solid solution components with a maximum of  $Ag_2S$  up to 12,8 mol.% have established. The experiment confirmed the adequacy of the model for the  $PbS-Ag_2S$  system.

**Keywords:** computer simulating; hydrochemical deposition; lead sulfide; silver sulfide; solid solution.

### Introduction

Sensitivity to optical radiation and physico-chemical effects allows to use thin films metal sulfides in many branches of engineering, in particular for creating on the basis of their selective chemical sensors to control the air toxic gases [1]. Efficacy of sensory cells based on thin films of lead sulfide to determine the nitrogen oxides presence in the air has shown by us earlier [2].

Forming solid solutions  $Ag_xPb_{1-x}S$  based on lead sulfide can significantly extend the range of its electro and sensory properties, but according to the high-temperature phase diagram solubility limit  $Ag_2S$  in  $PbS$  is achieved at 970 K and no more than 0.4 mol. % [3], which corresponds to the solid solution  $Ag_{0.008}Pb_{0.992}S$ . So low rate explained by the fact that the individual silver and lead sulfides have different types of crystal lattices and space groups. Lead sulfide forms a simple cubic lattice (structure B1), and  $Ag_2S$  monoclinic or body-centered lattices

Despite the unsatisfactory conditions of isomorphic substitution, hydrochemical deposition method allows to extend the range of  $Ag_xPb_{1-x}S$  solid solution of substitution, due to colloid-

chemical stage presence in the basis [4]. At this stage, there is a formation of metastable supersaturated solid solutions [5].

The greatest difficulty is the selection of purposeful conditions for producing a  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  solid solution. One of perspective ways to create managed hydrochemical synthesis by co-precipitation of  $\text{PbS}$  and  $\text{Ag}_2\text{S}$  is a computer simulation. We have shown high efficiency of aggregative growth model to predict the composition of solid solution  $\text{Cd}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  and  $\text{Cu}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  in their hydrochemical synthesis [6,7].

The purpose of this research was to use a computer model to find hydrochemical deposition conditions purposeful synthesis of  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  substitutional solid solutions and their experimental verification.

### Materials and Methods

Film formation and growth computer model  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  is based on process of nucleus formation and primary clusters in reaction volume and further aggregative growth [8].

Regulations of rapid coagulation theory of Smolukhovskogho were used to set fundamental principle of solid phase formation, subject to stochastic nature of particles' motion.

To conduct calculation in acceptable time, volume of reaction mixture was conventionally divided into equal cubic "microvolumes", which is taken as pseudo-valid reactor with acceptable statistic deviations. Subsequently holistic picture of hydrochemical synthesis process was obtained by composition of descriptive status of "microvolumes". In reaction mixture balancing of reagent concentration in "microvolumes" was calculated by thermodynamic diffusion flows.

Second necessary criterion of the calculations in acceptable time is to set boundaries of concentration ranges per each of reagents. For the sake of this authors found concentration fields of individual metal sulfide co-formation. For revelation of sulphide formation  $\text{PbS}$  and  $\text{Ag}_2\text{S}$  collaborative area in temperature interval 298 – 343K analysis of ion equilibrium in multicomponent system was conducted, including lead acetate  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , silver nitrate  $\text{AgNO}_3$ , trisubstituted sodium citrate  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , ammonium hydroxide  $\text{NH}_4\text{OH}$  and thiocarbamide  $\text{N}_2\text{H}_4\text{CS}$ . Presence of citrate ions and thiocarbamide, binding in durable complex lead and silver respectively, in the reaction mixture prevents rapid emission of metal sulphide in settling.

An important feature of developed algorithm is simultaneous multithreaded control of all processes, coursed by synthesis in variety of reaction mixture micro-volumes.

In case of calculating of electronic structure, stability of lattices and interaction energy were used following approximations of quantum chemistry, necessary for solving Schrodinger equation: Born-Oppenheimer approximation, Hartree approximation, MO LCAO approximation (molecular orbital as a linear combination of atomic orbitals).

Calculations were made only on base of prior software with new source data, later were used its' average results. Quantum chemical calculations were conducted with application of "first principles" simulation program (the solution of first fundamental principles without additional empirical assumptions).

Density functional theory (DFT), which allows replacing many-electron wave function by electron density, using ab initio methods with given approaches and simplifications, enables to provide required calculations.

Simulating package houses major simplifications: valence approximation, approximation of local electron density (LDA+U); replacement of many-electron problem solution to the one-electron (with effective local potential); description of kinetic energy of electron movement by local approximation on the basis of free-electron theory; self-consistent field method.

For the purpose of determination of solid solution electron structure, were additionally used following approximations and calculation methods: generalized gradient approximations (GGA); self-interaction correction (SIC); optimized effective potential method; GW approximation (replacement of Coulomb potential in the Hartree-Fock approximation to the dynamically dispersive potential, furthermore exchange-correlation potential replaces by Green's function); full-potential method of linear muffin-tin orbitals (FP LMTO); pseudo potential method.

### Discussion

The result of the simulation software is a description of the entire volume of the reactor to the level of detail for each atom, and in particular deposited onto a substrate material which is divided

into "clusters". Accordingly, the composition of the resulting solid solutions  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  was defined internally developed software using the average value of a sequence of atomic conversion probability sample set of "clusters". Allowable error (statistical sampling error) was 4%.

Graphical interpretation of the calculation results in the coordinates "Content  $\text{Ag}_2\text{S}$  solid solution - function of the initial concentrations of the metal salts in the reaction mixture" is shown in Fig. 1.

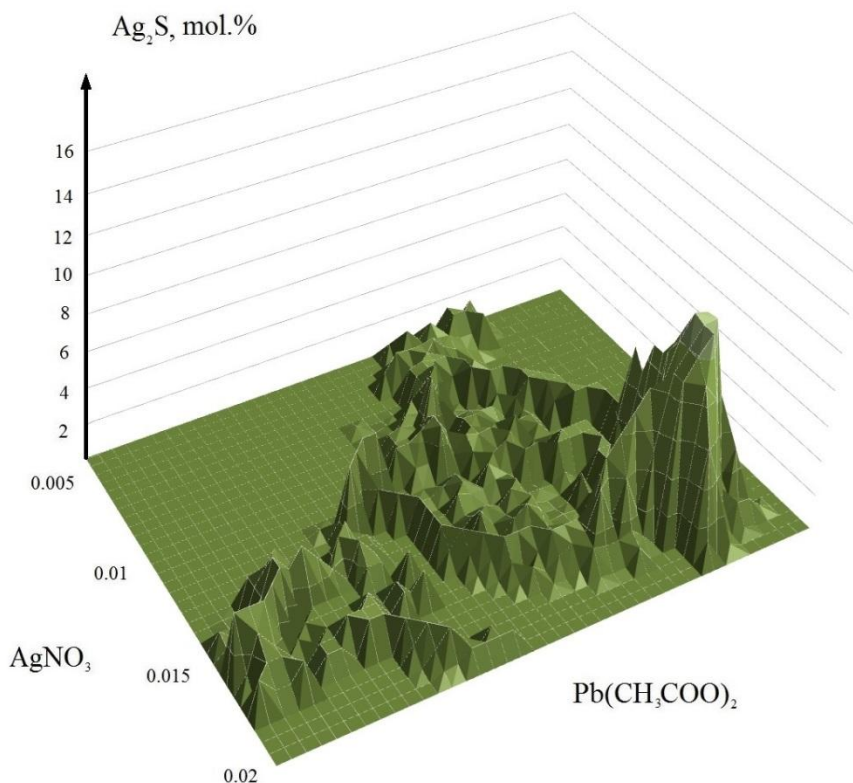


Fig. 1. The graphical interpretation of the results of computer simulation: the dependence of silver sulfide content in the solid solution  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  from the initial concentration of metal salt in the reaction mixture

As in the case of computer modeling of the solid solutions in the deposition system  $\text{PbS-CdS}$  [6], the surface has pronounced local maximum. They substitute the appropriate content component in the solid solution  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  in comparison with high phase diagram [3] greatly exceeds the limiting solubility of  $\text{Ag}_2\text{S}$  in the structure of  $\text{PbS}$ , which allows us to state of the formation of supersaturated solid solutions of substitution. Maximum content of  $\text{Ag}_2\text{S}$  in  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  was 12.8 mol.%. However, apparently, we cannot clearly determine it as the absolute maximum.

Besides solid solution  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$ , in "clusters" found a significant content of individual phases of silver sulfide, which introduces additional complexity in the interpretation of the data.

Fig. 2 shows the dependence of the substituting component by varying the initial concentration of the silver salt in the reaction mixture. It should be noted that it has an extreme character after reaching the maximum value of  $\text{Ag}_2\text{S}$  content in substitutional solid solution.



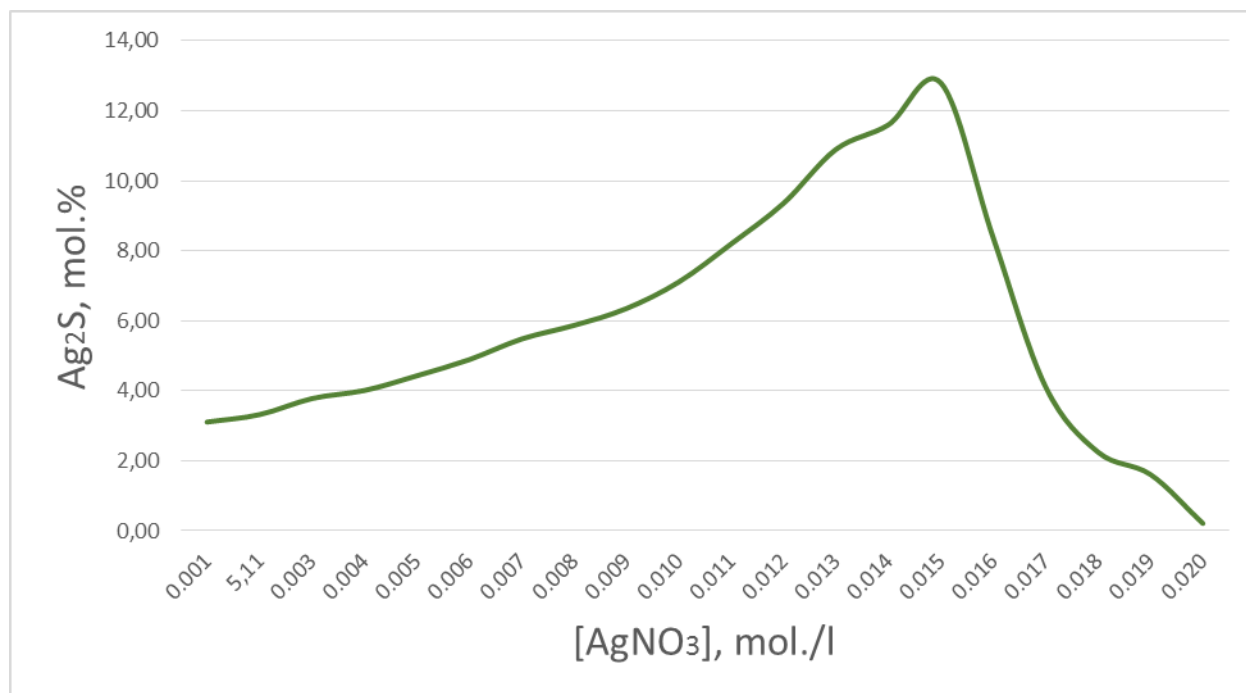


Fig. 2. Calculated concentration dependence substituting component by varying the concentration of the silver salt in the reaction mixture

We performed a series of experiments on hydrochemical deposition films  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  by coprecipitation individual metal sulphide  $\text{PbS}$  and  $\text{Ag}_2\text{S}$  to test the adequacy of the results. Synthesis was carried out for 90 minutes at a temperature of 303 K during a change in the reaction mixture lead acetate content from 0.01 to 0.04 mol/l, and while varying the concentration of the silver salt in the range of  $5,0 \times 10^{-5}$ – $1,2 \times 10^{-2}$  mol/l.

Analyzing the XRD patterns obtained films was observed the structure of cubic phase B1 only, the period of which is dependent on the film composition. Fig. 3 shows the X-ray films of lead sulfide and individual coprecipitating layers. We found that the period of the cubic phase of lead sulfide with increasing silver content in the reactor increased from 0.5934 to 0.5937 nm. It was interpreted as the formation of  $\text{PbS}$  by substitutional solid solutions  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$ . In the formation of solid solution the lattice period increased due to replacement of lead ions (II) with a radius of 0.120 nm lattice  $\text{PbS}$  to larger silver  $\text{Ag}^+$  ions with a radius of 0.126 nm.

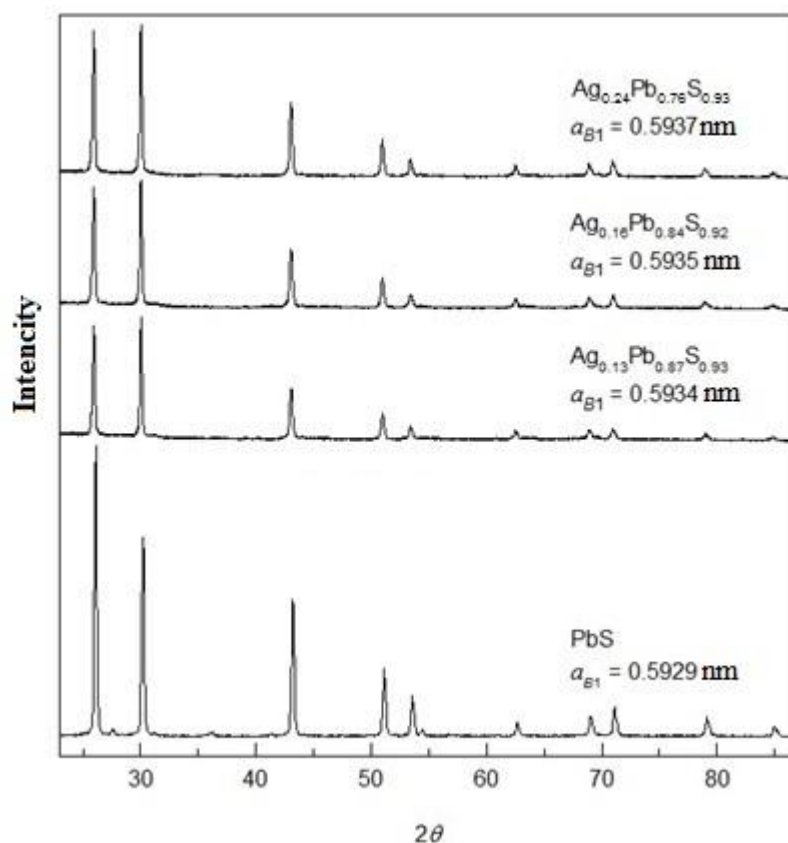


Fig. 3. XRD patterns PbS films and solid solutions  $\text{Ag}_{0.13}\text{Pb}_{0.87}\text{S}_{0.93}$ ,  $\text{Ag}_{0.16}\text{Pb}_{0.84}\text{S}_{0.92}$  and  $\text{Ag}_{0.24}\text{Pb}_{0.76}\text{S}_{0.92}$  obtained by co-precipitation of sulfides of lead and silver at  $T = 303 \text{ K}$

Elemental analysis of the films coprecipitated sulphide PbS and  $\text{Ag}_2\text{S}$  formed microanalyzer Superzond JCXA-733c on three points on the content of lead, silver and sulfur. We evaluated the number of elements in the films obtained by varying the composition of the reaction mixture.

Comparative results of calculations and experimental data are given in the table.

Table: The experimental data and computer simulations on the effect of synthesis conditions on the composition of hydrochemical coprecipitated solid solution films  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$ .

Synthesis conditions	Formulaic composition of the $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}_{1-\delta}$ solid solution (simulating result)	Formulaic composition of the $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}_{1-\delta}$ solid solution (based on lattice period)
$[\text{AgNO}_3]$ , мол/л		
0,001	$\text{Ag}_{0,07}\text{Pb}_{0,93}\text{S}_{0,96}$	$\text{Ag}_{0,08}\text{Pb}_{0,92}\text{S}_{0,96}$ ( $a = 0,59319 \text{ nm}$ )
0,002	$\text{Ag}_{0,11}\text{Pb}_{0,89}\text{S}_{0,95}$	$\text{Ag}_{0,10}\text{Pb}_{0,90}\text{S}_{0,95}$ ( $a = 0,59324 \text{ nm}$ )
0,005	$\text{Ag}_{0,15}\text{Pb}_{0,85}\text{S}_{0,93}$	$\text{Ag}_{0,13}\text{Pb}_{0,87}\text{S}_{0,93}$ ( $a = 0,59338 \text{ nm}$ )

0,010	$\text{Ag}_{0,16}\text{Pb}_{0,84}\text{S}_{0,92}$	–
0,012	$\text{Ag}_{0,17}\text{Pb}_{0,83}\text{S}_{0,92}$	$\text{Ag}_{0,16}\text{Pb}_{0,84}\text{S}_{0,92}$ ( $a = 0,59348 \text{ nm}$ )
0.0144	$\text{Ag}_{0,25}\text{Pb}_{0,75}\text{S}_{0,93}$	$\text{Ag}_{0,24}\text{Pb}_{0,76}\text{S}_{0,93}$ ( $a = 0,59370 \text{ nm}$ )

The table shows that with increasing concentration of silver salt in the reaction mixture in its solid phase content increases monotonously while reducing the lead. Among the samples studied  $\text{Ag}_2\text{S}$  maximum content in the  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  solid solution was 8.5 mol.%. The discrepancy between the results of simulation and experiment does not exceed 14.4%, which is certainly acceptable. Noteworthy significant non-stoichiometry of sulfur in the composition of the solid solution. This occurrence may be explained by oxygen-containing metal phase in film, in particular, sodium hydroxide, lead, whose formation is confirmed by calculations of ionic equilibria. Detected non-stoichiometry on the sulfur content in the deposited solid solutions in general is reflected in the writing of their composition  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}_{1-\delta}$ .

### Summary

Computer simulation of the  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}_{1-\delta}$  solid solutions hydrochemical synthesis process was carried out. The potential conditions for the formation of supersaturated solid solutions with a replacement component, exceeding the solubility limit  $\text{Ag}_2\text{S}$  in  $\text{PbS}$  according to high temperature phase diagram were founded.  $\text{Ag}_2\text{S}$  concentration in solid solution has a number of local maximums on a calculated surface. Its absolute maximum of 12.8 mol.%.

The experimental results confirmed the adequacy of the simulation results. The maximum discrepancy between experiment and computer simulation results was 14.4%. Receipt of the solid solutions  $\text{Ag}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}_{1-\delta}$  with the concentration of component replacement stated above the solubility limit in the areas calculated local maximum was confirmed.

The research was supported by the project of the Ministry of Education and Science by government contract No 4.1270.2014 / K "Development of physical and chemical bases and algorithm colloid-chemical synthesis of metal chalcogenides films for photonics and sensor technology".

### References:

1. Vasiliev R.B., Ryabova L.I., Rumyantseva M.N., Gaskov A.M. (2004) Inorganic structures as materials for gas sensors, Russian Chemical Reviews, p.1019
2. Markov V.F., Maskaeva L.N. (2001) The semiconductor sensor of nitrogen oxides analyzer based lead sulfide, Journal of Analytical Chemistry 73, pp. 846-850.
3. Shelimova L.E., Tomashik V.N., Grytsiv V.I. (1991) State Diagrams in semiconductor materials (chalcogenide based systems Si, Ge, Sn, Pb) (Science, Moscow), p. 368.
4. Markov V.F., Maskaeva L.N., Ivanov P.N. (2006) Hydrochemical film deposition of metal sulfides: simulating and experiment (UB RAS, Ekaterinburg), p. 217.
5. Maskaeva L.N., Markov V.F., Moskaleva A.A. (2011) Hydrochemical synthesis of metal chalcogenides films. Part 7. Preparation of thin films of  $\text{PbS}-\text{Ag}_2\text{S}$  by ion exchange replacement, Butlerov Communications 26, pp. 36-42.
6. Kirsanov A.Y., Markov V.F., Maskaeva L.N. (2013) The simulation of the formation of solid solutions  $\text{Cd}_x\text{Pb}_{1-x}\text{S}$  hydrochemical deposition, Bulletin of the South Ural State University 5, p. 35.
7. Kirsanov A.Y., Markov V.F., Maskaeva L.N. (2012) The simulation of the hydrochemical synthesis of supersaturated solid solutions in the system  $\text{PbS} - \text{CuS}$ , Fundamental problems of modern materials 9, pp. 634-639.
8. Markov V.F., Maskaeva L.N. (2011) Features of formation of metal sulfide films from water solutions, Butlerov Communications 24, pp. 1523-1532.

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. 2, No. 2, pp. 92-108, 2014

DOI: 10.13187/erchr.2014.2.92  
[www.ejournal14.com](http://www.ejournal14.com)



UDC 537.86 + 577.37

**Biosynthetic incorporation of deuterium-labeled aromatic amino acids - [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]phenylalanine, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]tyrosine and [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tryptophan into the molecule of transmembrane protein bacteriorhodopsin from halobacterium *Halobacterium halobium ET 1001***

<sup>1</sup> Oleg Mosin  
<sup>2</sup> Ignat Ignatov  
<sup>3</sup> Dmitry Skladnev  
<sup>4</sup> Vitaly Shvets

<sup>1</sup> 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

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

<sup>3</sup> 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 Dorozhniy proezd, 1  
E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup> M.V. Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Russian Federation  
Academician of Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry)  
119571, Moscow, Vernadskogo avenue, 86  
E-mail: mitht@mitht.ru

### Abstract

It was carried out the method for microbiological preparation and isolation of trans membrane photo-transforming protein bacteriorhodopsin (output 8–10 mg), labeled with deuterium on residues of [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]phenylalanine, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]tyrosine, and [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tryptophan. The protein was allocated from membranes of photoorganotrophic halobacterium *Halobacterium halobium ET 1001* by cellular lysis by distilled water, processing of bacterial biomass by ultrasound, alcohol extraction of low and high-weight molecular impurities, cellular RNA, carotenoids and lipids, with the subsequent solubilization of final product with 0,5% SDS-Na and fractionation by methanol. The homogeneity of the synthesized product, and the selectivity of deuterium incorporation into the molecule was proved by combination of preparative and analytical protein methods including electrophoresis in 12,5% PAAG with 0,1% SDS-Na, gel filtration chromatography on Sephadex G-200, reverse-phase HPLC, electron impact mass-

spectrometry of methyl esters of N-5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl) derivatives of amino acids.

**Keywords:** *Halobacterium halobium* ET 1001; [<sup>2</sup>H]bacteriorhodopsin; [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe; [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr; [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Trp; biosynthesis; electron impact mass-spectrometry; RP HCLP.

### Ведение

Бактериородопсин (БР), названный по аналогии с белком зрительного аппарата млекопитающих родопсином, был выделен в 1971 году В. Стохениусом (США) и Д. Остерхельтом из клеточной мембраны экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* [1]. Этот фотопреобразующий мембранный белок с молекулярной массой ~26,5 кДа представляет собой хромопротеид, который содержит в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью 13-*транс*-ретинольного С<sub>20</sub>-каротиноида – аналога витамина А, связанного альдиминной связью с остатком лизина-216 белковой части молекулы. Наряду с БР в клеточной мембране галобактерий содержится небольшое количество других сопутствующих каротиноидных пигментов, основной из которых бактериоруберин, определяет устойчивость галобактерий к солнечному излучению [2].

Полипептидная цепь БР состоит из 248 аминокислотных остатков, 67% которых являются гидрофобными, образованными с участием ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана [3]. Согласно структурным исследованиям, молекула БР состоит из семи находящихся в конформации  $\alpha$ -спирали сегментов, пронизывающих всю толщу мембраны клетки в направлении, перпендикулярном её плоскости [4]. Гидрофобные домены молекулы БР представляют собой трансмембранные сегменты, а гидрофильные домены выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные  $\alpha$ -спиральные тяжи белковой молекулы [5].

В клеточной мембране молекула БР выполняет функции светозависимого протонного насоса, перекачивающего протоны через мембрану клетки и создающего электрохимический градиент протонов Н<sup>+</sup> на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании. При поглощении кванта света происходит обратимая фотоизомеризация 13-*Z*-БР ( $\lambda_{\text{макс}} = 548$  нм) (квантовый выход 0,03 при  $t = 20$  °С) в *all-E*-БР ( $\lambda_{\text{макс}} = 568$  нм), инициирующая каскад фотохимических реакций с образованием промежуточных интермедиантов – J<sub>625</sub>, K<sub>590</sub>, L<sub>550</sub>, M<sub>412</sub>, N<sub>560</sub>, и O<sub>640</sub> [6] с последующим отрывом Н<sup>+</sup> из ретинального остатка БР и его присоединением со стороны цитоплазмы. В результате между внутренней и внешней поверхностью мембраны образуется градиент концентрации Н<sup>+</sup>, приводящий к тому, что освещенные клетки галобактерий начинают синтезировать АТФ, т.е. преобразуют энергию света в химическую энергию связей. Этот процесс обратим и в темноте протекает в обратном направлении, что позволяет галобактериям развиваться в темноте, переключая фотосинтетический метаболизм на гетеротрофный [7]. Таким образом, молекула БР ведет себя как фотохромный переносчик с малым временем релаксации – переходом из возбужденного состояния в основное. Оптические и динамические характеристики БР изменяются в зависимости от условий получения пурпурных мембран (ПМ) и составом полимерной матрицы.

Уникальные свойства БР обеспечивают широкий диапазон био-, нано-технологических и биофизических приложений, в которых он может найти применение. Благодаря своей высокой светочувствительности и разрешающей способности БР используется в молекулярной биоэлектронике как природный фотохромный материал [8]. Кроме этого, БР очень привлекателен, как модельный объект для исследований, связанных с изучением функциональной активности и структурных свойств фотопреобразующих мембранных белков в составе искусственных энерго- и фотопреобразующих мембран [9].

Для структурно-функциональных исследований с БР целесообразно вводить в молекулу белка в качестве изотопной метки дейтерий (<sup>2</sup>H), позволяющий использовать для анализа изотопного включения метод высокочувствительной масс-спектрометрии ЭУ после химической модификации аминокислот в их летучие производные [10]. Большое научно-прикладное значение имеет БР, меченный дейтерием по остаткам функционально важных



ароматических аминокислот – [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина, [ $^2\text{H}$ ]тирозина и [ $^2\text{H}$ ]триптофана, участвующих в гидрофобном взаимодействии полипептидной цепи белка с липидным бислоем клеточной мембраны [11].  $^2\text{H}$ -меченые ароматические аминокислоты могут быть химически синтезированы методом обратного изотопного обмена ( $^1\text{H}$ – $^2\text{H}$ ) в молекулах протонированных аминокислот – [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланин в 85%-ной  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  при 50 °С, [3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозин в 25%-ной  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  при слабом кипячении реакционной смеси, [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофан в 75%-ной [ $^2\text{H}$ ]трифторуксусной кислоте при 25 °С [12].

Целью настоящей работы являлась разработка метода получения и выделения БР, меченного дейтерием по остаткам функционально важных ароматических аминокислот – [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина, [3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозина и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофана, а также исследование уровней дейтерированности молекулы БР методом масс-спектрометрии ЭУ метиловых эфиров N-5-(диметиламино) нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот после их разделения методом ОФ ВЭЖХ.

## Материалы и методы

### Объект исследования

В работе использовали каротиноидсодержащий штамм экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* ET 1001, полученный из коллекции культур МГУ. Штамм модифицирован селекцией отдельных колоний на твердой (2%-ный агар) пептоновой среде с 4,3 М NaCl. Все неорганические соли предварительно перекристаллизовывали в 99,9 ат.%  $^2\text{H}_2\text{O}$  (“Изотоп”, РФ),  $^2\text{H}_2\text{O}$  дистиллировали над  $\text{KMnO}_4$  с последующим контролем изотопной чистоты  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (Bruker Daltonics, Германия) (рабочая частота – 70 МГц, внутренний стандарт –  $\text{Me}_4\text{Si}$ ).

### Синтез L-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина

40 г фенилаланина растворяли в 300 мл 85%-ной  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) и нагревали с обратным водяным холодильником при 50–60 °С при перемешивании 3 сут. По окончании реакционную смесь охлаждали, нейтрализовали 30%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH = 5,5. Продукт экстрагировали этанолом. Выход 24 г (58,7%);  $T_{\text{пл}} = 271\text{--}273$  °С;  $[\alpha]_{\text{d}}^{25} = 4,47$  (5 М HCl);  $pK_a = 2,20$  (COOH), 9,31 ( $\text{NH}_2$ );  $R_f = 0,6$  (n-бутанол–уксусная кислота–вода (12 : 3 : 5 об.%)). УФ-спектр (0,1 М HCl):  $[\lambda_{\text{макс}} \text{ нм} (\epsilon \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1})]$ : 257,5 ( $\epsilon$  195). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) ( $\delta$ , ppm):  $\delta$  3,25 (2H, H $\beta$ ),  $\delta$  4,4 (1H, H $\alpha$ ),  $\delta$  7,2–7,4 (0,07H), УД 90 ат.%  $^2\text{H}$ . Масс-спектр ЭУ [(M) $^+$  m/z (I, %)]: 165 (34), метиловый эфир N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина: 417 (14), 418 (6).

### Синтез L-[3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозина

100 г тирозина растворяли в 150 мл 3 М  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ . Реакционную смесь нагревали 2 сут при 40–50 °С с обратным водяным холодильником в токе азота. По окончании нейтрализовали 30%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH = 4,5 и охлаждали 1 сут при 0 °С. Кристаллический продукт фильтровали, промывали  $^2\text{H}_2\text{O}$  и сушили при 10 мм рт. ст. Выход 90 г (86,5%);  $T_{\text{пл}} = 316\text{--}317$  °С;  $[\alpha]_{\text{d}}^{25} = 10,03$  (5 М HCl);  $pK_a = 2,20$  (COOH), 9,21 ( $\text{NH}_2$ );  $R_f = 0,45$  (n-бутанол–уксусная кислота–вода (12 : 3 : 5, об.%)). УФ-спектр (0,1 М HCl)  $[\lambda_{\text{макс}} \text{ нм} (\epsilon \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1})]$ : 223 ( $\epsilon$  8200) и 274,5 ( $\epsilon$  1340). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (1М  $^2\text{HCl}$ ) ( $\delta$ , ppm):  $\delta$  3,32 (2H),  $\delta$  4,35 (1H),  $\delta$  6,9 (1H),  $\delta$  7,2 (2H), УД 96 ат.%  $^2\text{H}$ . Масс-спектр ЭУ [(M) $^+$  m/z (I, %)]: 181 (21), метиловый эфир N-Dns-[3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозина: 429 (15), 430 (5).

### Синтез L-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофана

К 40 мл 99,9%-ной  $^2\text{H}_2\text{O}$  добавляли при 4 °С и перемешивании 80 мл трифторуксусного ангидрида (0,5 моль) и выдерживали 2 ч при 4 °С, затем дробными порциями добавляли 25 г триптофана. Реакционную смесь выдерживали 3 сут в темноте при 22 °С, растворитель удаляли при 10 мм рт. ст., нейтрализовали 30%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH = 5,9, охлаждали 1 сут при 0 °С. Кристаллический продукт фильтровали, промывали  $^2\text{H}_2\text{O}$  и сушили при 10 мм рт. ст. Выход 19 г (60,3%);  $T_{\text{пл}} = 283\text{--}285$  °С;  $[\alpha]_{\text{d}}^{25} = 2,8$  (1 М HCl);  $pK_a = 2,46$  (COOH), 9,41 ( $\text{NH}_2$ );  $R_f = 0,5$  (n-бутанол–уксусная кислота–вода (12 : 3 : 5, об.%)). УФ-спектр (0,1 М HCl)  $[\lambda_{\text{макс}} \text{ нм} (\epsilon$

$M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ): 218 ( $\epsilon$  33500), 278 ( $\epsilon$  5550), 287,5 ( $\epsilon$  4550). Спектр  $^1H$ -ЯМР ( $CF_3COOH$  в  $^2H_2O$ ) ( $\delta$ , ppm):  $\delta$  3,4 (2H, H $\beta$ ),  $\delta$  4,4 (1H, H $\alpha$ ),  $\delta$  7,3 (1H, H $\epsilon$ ),  $\delta$  7,2–7,4 (0,1H, In-H), УД 98 ат.%  $^2H$ . Масс-спектр ЭУ [(M) $^+$   $m/z$  (I, %)]: 204 (28), метиловый эфир N-Dns-[ $^2H$ ]триптофана: 455 (9), 456 (11).

### **Синтез N-Dns-[ $^2H$ ]аминокислот**

К 4 мг сухого гидролизата БР в 1 мл 2 М  $NaHCO_3$  (pH = 9–10) порциями при перемешивании добавляли 25,6 мг Dns-хлорида в 2 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при перемешивании при 40 °С, подкисляли 2 М HCl до pH = 3,0 и экстрагировали этилацетатом (3  $\times$  5 мл). Объединенный экстракт промывали дист.  $H_2O$  до pH = 7,0 (2  $\times$  1 мл), сушили безводным  $Na_2SO_4$ , растворитель удаляли при 10 мм рт. ст. Выход 15,3 мг (78%). Последующий синтез метиловых эфиров N-Dns-[ $^2H$ ]аминокислот проводили обработкой образцов N-Dns-аминокислот в составе белкового гидролизата БР газообразным диазометаном по методике, указанной в работе [13].

### **Биосинтез БР**

Биосинтетический БР (выход 8–10 мг с 1 г биомассы) получен в синтетической среде, в которой протонированные фенилаланин, тирозин и триптофан были замещены их дейтерированными аналогами –  $L$ -[2,3,4,5,6- $^2H_5$ ]фенилаланином,  $L$ -[3,5- $^2H_2$ ]тирозином и  $L$ -[2,4,5,6,7- $^2H_5$ ]триптофаном (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;  $D,L$ -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; АМФ – 0,1; УМФ – 0,1; NaCl – 250;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 20; KCl – 2;  $NH_4Cl$  – 0,5;  $KNO_3$  – 0,1;  $KH_2PO_4$  – 0,05;  $K_2HPO_4$  – 0,05;  $Na^+$ -цитрат – 0,5;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  –  $3 \cdot 10^{-4}$ ;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,065;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  –  $4 \cdot 10^{-5}$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  –  $5 \cdot 10^{-4}$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  –  $5 \cdot 10^{-5}$ ; глицерин – 1,0; биотин –  $1 \cdot 10^{-4}$ ; фолиевая кислота –  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ; витамин  $B_{12}$  –  $2 \cdot 10^{-5}$ . Ростовую среду автоклавировали 30 мин при 0,5 атм, pH довели 0,5 М KOH до 6,5–6,7. Выращивание галобактерии проводили в колбах Эрленмейера, вместимостью 500 мл (объем реакционной смеси 100 мл) 4–5 сут при 35 °С в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере 380-S (Biorad Labs, Венгрия) и освещении монохромными лампами ЛДС-40 (ООО “Альфа-Электро”, Россия) (3 лампы  $\times$  1,5 лк). Последующие операции по выделению БР проводили с использованием светозащитной лампы с оранжевым светофильтром ОРЖ-1.

### **Выделение фракции пурпурных мембран (ПМ)**

Сырую биомассу (1 г) промывали дист.  $H_2O$  и осаждали на центрифуге Т-26 (Carl Zeiss, Германия) (1500  $g$ , 20 мин). Осадок суспендировали в 100 мл дист.  $H_2O$  и выдерживали 3 ч при 4 °С. Реакционную смесь центрифугировали (1500  $g$ , 15 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл дист.  $H_2O$  и дезинтегрировали ультразвуком (22 кГц, 3  $\times$  5 мин) в водяной бане со льдом (0 °С). Клеточный гомогенат после промывки дист.  $H_2O$  суспендировали в 10 мл буфера 125 мМ NaCl, 20 мМ  $MgCl_2$ , 4 мМ Трис-HCl, (pH = 8,0), добавляли 5 мкг РНК-азы I (2–3 ед акт.) и инкубировали 2 ч при 37 °С. Затем добавляли 10 мл того же буфера, выдерживали 10–12 ч при 0 °С. Водную фракцию отделяли центрифугированием (1500  $g$ , 20 мин), осадок ПМ обрабатывали 50%-ным этанолом (5  $\times$  7 мл) при 0 °С с последующим отделением растворителя. Процедуру повторяли трижды до получения бесцветных промывных вод. Содержание белка в пробах определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) по соотношению  $D_{280}/D_{568}$  (молярные коэффициенты светопоглощения при длинах волн 280 и 568 нм:  $\epsilon_{280} = 1,1 \cdot 10^5$  и  $\epsilon_{568} = 6,3 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  [14]. Регенерацию ПМ проводили как описано в работе [15]. Выход фракции ПМ – 120 мг (химическая чистота 80–85%).

### **Выделение БР**

Суспензию ПМ (в H<sub>2</sub>O) (1 мг/мл) растворяли в 1 мл 0,5% ДДС-На, инкубировали 5–7 ч при 30 °С с последующим центрифугированием (1200 g, 15 мин). Осадок отделяли, к супернатанту добавляли дробными порциями метанол (3 × 100 мл) при 0 °С, выдерживали 14–15 ч при 0 °С и центрифугировали при охлаждении (1200 g, 15 мин). Фракционирование проводили трижды, уменьшая концентрацию 0,5% ДДС-На до 0,2 и 0,1%. Кристаллический белок (8–10 мг) промывали холодной дист. <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (2 × 1 мл) и центрифугировали (1200 g, 15 мин).

### **Очистка БР**

Пробу белка (5 мг) растворяли в 100 мкл буферного раствора и помещали на колонку, размерами 150 × 10 мм; неподвижная фаза – Сефадекс G-200 (Pharmacia, США) (удельный объем упакованных гранул – 30–40 ед. на 1 г сух. сефадекса), размер гранул – 40×120 мкм, уравновешенную буферным раствором, содержащим 0,1 % ДДС-На и 2,5 мМ ЭТДА. Колонка была оснащена UV/VIS детектором Waters 2487 (Waters Corp., США) с детекцией при длинах волн 280 и 568 нм. Элюирование проводили при 20±25 °С 1 мМ Трис-НСl буфером (pH = 7,6) со скоростью 10 мл/см<sup>2</sup> · ч. Объединенные белковые фракции подвергали сублимационной сушке, запаивали в стеклянные ампулы (10 × 50 мм) и хранили в морозильной камере при -12 °С.

### **Электрофорез БР**

Проводили в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-На в соответствии с протоколом фирмы LKB (Швеция). Для количественного определения содержания синтезированного в клетке белка проводили сканирование покрашенного в растворе кумасси-голубой R-250 электрофоретического геля на лазерном денситометре Beckman CDS-200 (Beckman Coulter, США).

### **Спектры поглощения**

Регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) в диапазоне длин волн  $\lambda = 200\text{--}700$  нм.

### **ОФ ВЭЖХ метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот**

Проводили на жидкостном хроматографе Knauer Smartline (Knauer, Германия), снабженным УФ-детектором UF-2563 и интегратором C-R 3A (Shimadzu, Япония), используя колонку, t = 20±25 °С, размерами 250×10 мм с неподвижной обращенной фазой Separon SGX C18, 7 мкм (Kova, Словакия); подвижная фаза: (А) – ацетонитрил–трифторуксусная кислота = 100 : 0,1–0,5 об.% и (Б) – ацетонитрил = 100 об.% в условиях градиентного элюирования; объем пробы – 50–100 мкл; скорость элюирования – 1,5 мл/мин. Результаты градиентного элюирования показаны в таблице 1. Выход индивидуальных метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот – 75–89%; хроматографическая чистота – 95–98 %.

Таблица 1

**Результаты одноступенчатого градиентного разделения смеси метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ на колонке 250×10 мм, t = 20±25 °С, с октадецилсилановым силикагелем Separon SGX C18, 7 мкм (Kova, Словакия)**

Номер обработки	Компоненты подвижной фазы, об. %		Время элюирования, мин
	А*	Б**	
1	90	10	10
2	80	20	10
3	60	40	10
5	50	50	10



6	30	60	5
8	20	80	5
9	10	90	5
10	0	100	5

\* А – ацетонитрил – трифторуксусная кислота = 100 : 0,1–0,5 об.%

\*\* Б – ацетонитрил = 100 об.%

### **Масс-спектры метиловых эфиров *N*-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот**

Получены методом электронного удара (ЭУ) на масс-спектрометре MB-80A (Hitachi, Япония) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющем напряжении 8 кВ и температуре катодного источника 180–200 °С. Сканирование анализируемых образцов проводили при разрешении 7500 усл. ед., используя 10%-ную резкость изображения.

### **Обсуждение результатов**

#### **Биосинтез БР**

Выбор стратегии биосинтеза <sup>2</sup>H-меченого БР с использованием штамма экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* ET 1001 определялся целью исследования, связанной с изучением принципиальной возможности получения <sup>2</sup>H-меченых трансмембранных фотопреобразующих белков в микропрепаративных количествах для реконструкции искусственных мембран в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и структурно-функциональных исследований. При выборе [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланина, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозина и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофана в качестве источников дейтерия учитывалась их исключительная важность в гидрофобном взаимодействии молекулы БР с липидным бислоем клеточной мембраны, устойчивость к реакциям (<sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H) обмена в водной среде в условиях выращивания штамма-продуцента, а также возможность применения метода высокочувствительной масс-спектрометрии ЭУ для последующего анализа. <sup>2</sup>H-меченый БР получен при росте штамма фотоорганотрофных галобактерий *H. halobium* ET 1001 в синтетической среде (4,3 М NaCl) с [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланином, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозином и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофаном. В оптимальных условиях выращивания *H. halobium* ET 1001 (период инкубации 4–5 сут, *t* = 35 °С при освещении монохромным светом при  $\lambda = 560$  нм) в клетках синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы  $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1,0$  идентичный природному БР. Рост штамма в синтетической среде с дейтерированными ароматическими аминокислотами (рисунок 1, кривая 2) ингибировался незначительно по сравнению с контролем (рисунок 1, кривая 1) на протонированной среде, что существенно упрощает и удешевляет оптимизацию условий биосинтеза <sup>2</sup>H-меченого БР, заключающуюся в эквивалентной замене протонированных ароматических аминокислот в среде выращивания на их дейтерированные аналоги – [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланином (0,26 г/л), [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозином (0,2 г/л) и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофаном (0,5 г/л).

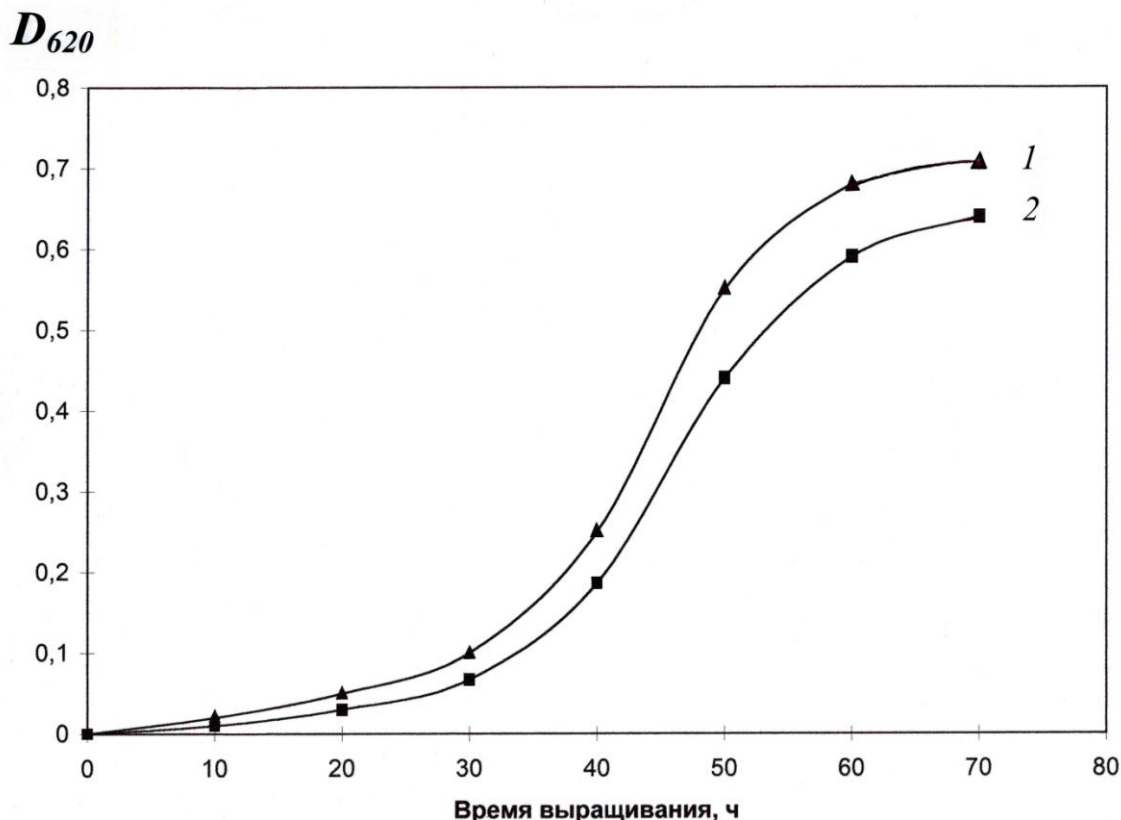


Рис. 1. Динамики роста галобактерии *H. halobium* ET 1001 в различных экспериментальных условиях: 1 – протонированная синтетическая среда; 2 – синтетическая среда с дейтерированными ароматическими аминокислотами – [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланином (0,26 г/л), [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозином (0,2 г/л) и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофаном (0,5 г/л)

Основными этапами эксперимента являлись: выращивание галобактерий *H. Halobium* ET 1001 на синтетической среде; дезинтеграция клеток и лизис клеточных стенок; выделение фракции ПМ; очистка РМ от низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов; растворение ПМ в 0,5%-ном растворе ионного детергента – ДДС-Na с образованием микроэмульсии; осаждение БР из микроэмульсии метанолом; гель-проникающая хроматография на сефадексе G-200; электрофорез в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na. Поскольку выделяемый белок локализуется в ПМ, освобождения от низкомолекулярных примесей и внутриклеточного содержимого достигали осмотическим шоком клеток дистиллированной водой на холоде после удаления 4,3 М NaCl и последующим разрушением клеточной оболочки ультразвуком с частотой 22 кГц. Последующую обработку клеточного гомогената РНК-азой I (2–3 ед. акт.) проводили для разрушения клеточной РНК. Поскольку фракция ПР наряду с выделяемым белком в комплексе с липидами и полисахаридами содержала примесь связанных каротиноидов и посторонних белков, применялись специальные методы фракционирования белка без повреждения его природной структуры и диссоциации ретинального остатка. Это существенно усложняло задачу выделения индивидуального бактериородопсина с применением методов декаротинизации и делипидизации (удаление каротиноидов и липидов), а также очистки и колоночной ГПХ на сефадексе. Декаротинизация, заключающаяся в многократной обработке суспензии ПМ 50%-ным этанолом при 0 °С, являлась рутинным, но обязательным этапом, несмотря на значительные потери хромопротеина. Использовалось не менее пяти обработок 50%-ным этанолом, чтобы получить спектр поглощения суспензии очищенных от каротиноидов (пик 4) и (пик 5) ПМ (степень хроматографической чистоты 80–85%), показанного на рисунке 2 на различных стадиях обработки (B) и (C) относительно природного БР (A). Образование 13-

ретиальпротеинового комплекса в молекуле БР приводит к bathochromному сдвигу в спектре поглощения ПМ (рисунок 2, С) – основной пик (1) при максимуме поглощения  $\lambda = 568$  нм, вызванный световой изомеризацией хромофора по  $C_{13}=C_{14}$ -кратной связи определяется наличием 13-*транс*-ретиального остатка в основной спектральной форме БР<sub>568</sub>; дополнительный малоинтенсивный пик (2) при  $\lambda = 412$  нм характеризует незначительную примесь образующейся на свету спектральной формы *мета*-бактериородопсина ( $M_{412}$ ) с депротонированной альдиминной связью между остатком 13-*транс*-ретиала и белком, а общий пик (3) при  $\lambda = 280$  нм определяется поглощением ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) в полипептидной цепи белка (для чистого БР соотношение поглощений  $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1$ ). Данный метод получения БР позволяет контролировать содержание ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана в ростовой среде, добавляемых в количествах 0,26, 0,2 и 0,5 г/л.

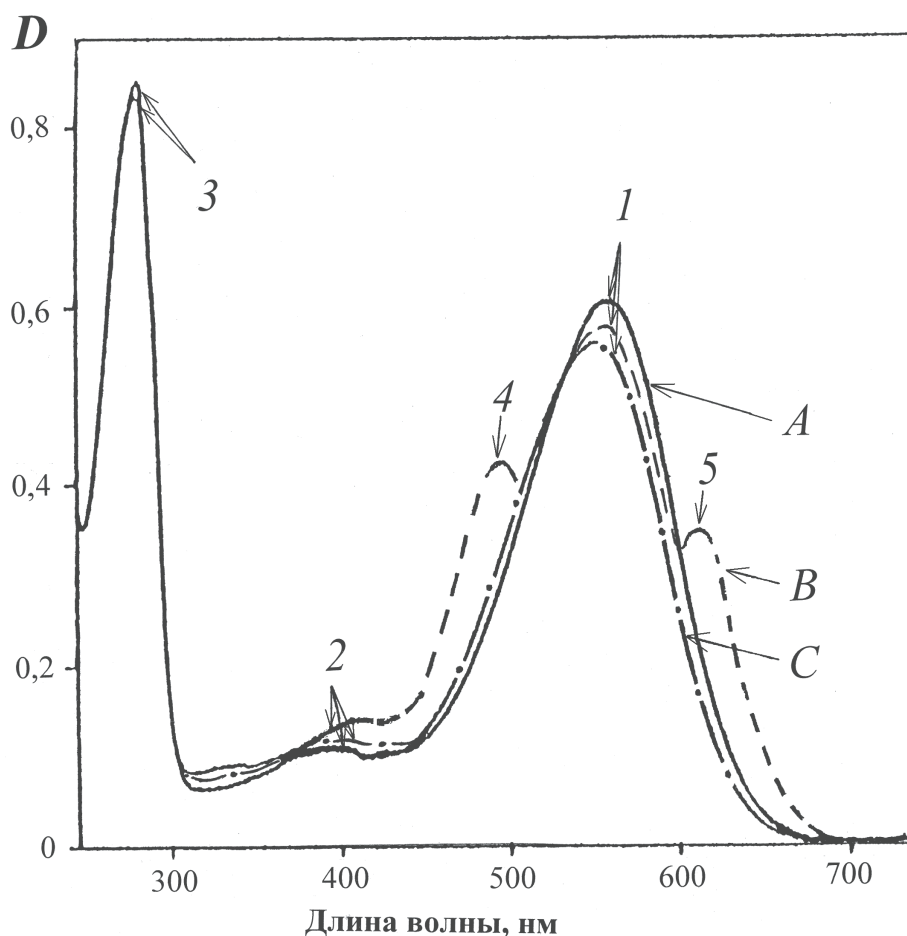


Рис. 2. Спектры поглощения суспензии ПМ (50%-ный этанол) на различных стадиях обработки: А – природный БР; В – ПМ после промежуточной обработки; С – очищенные от посторонних каротиноидов ПМ. Пик (1) соответствует основной спектральной форме БР<sub>568</sub>, (2) – примесь спектральной формы *мета*-бактериородопсина  $M_{412}$ , (3) – общий пик поглощения ароматических аминокислот, (4) и (5) – пики посторонних каротиноидов. В качестве контроля использовали природный БР

### Выделение и очистка БР

Фракционирование и хроматографическая очистка белка являлись следующим необходимым этапом. Поскольку БР, будучи трансмембранным белком, пронизывает билипидный слой в виде семи  $\alpha$ -сегментов, применение сульфата аммония и других традиционных высаливающих агентов не дает положительного результата при выделении белка. Решение задачи заключалось в переводе БР в растворимую форму за счет

коллоидного растворения (солюбилизации) полученной фракции ПМ в 0,5%-ном растворе ДДС-На с последующим низкотемпературным осаждением белка метанолом.

Использование в качестве ионного детергента ДДС-На диктовалось необходимостью максимальной солюбилизации белка в природной биологически-активной форме в комплексе с 13-*транс*-ретиналом с комбинированием стадии делипидизации (очистки от липидов) и осаждения, поскольку БР, солюбилизированный в слабоконцентрированном 0,5%-ном растворе ДДС-На, сохраняет спиральную  $\alpha$ -конфигурацию [16]. Поэтому отпала необходимость использования органических растворителей — ацетона, метанола и хлороформа для очистки от липидов, а делипидизация и осаждение белка совмещались в одну единственную стадию, существенно упрощающую фракционирование белка и уменьшающую его потери при выделении. Значительным преимуществом метода является, что целевой белок в комплексе с молекулами липидов и детергента распределяется в надосадочной жидкости, а другие высокомолекулярные примеси и остатки клеточных мембран — в непрореагировавшем осадке, легко отделяемом центрифугированием. Фракционирование солюбилизованного в 0,5%-ном ДДС-На БР с его последующим выделением в кристаллическом виде проводилось в три стадии дробным осаждением метанолом при 0 °С, уменьшая концентрацию детергента от 0,5 до 0,2 и 0,1%.

Окончательная стадия очистки БР заключалась в отделении белка от низкомолекулярных примесей гель-проникающей хроматографией, для чего БР-содержащие фракции (3 мг), растворенные в 100 мкл буфера, дважды пропускали через колонку (10 × 150 мм) с декстрановым сефадексом G-200 (Pharmacia, США), уравновешенную буферным раствором с 0,1%-ным ДДС-На и 2,5 мМ ЭТДА. Элюирование проводили при 20±25 °С 1 мМ Трис-НСl буфером (рН = 7,6) со скоростью 10 мл/см<sup>2</sup> · ч. Суммарные данные по очистке БР от каротиноидов и фосфолипидов показаны в таблице 2.

Согласно разработанному методу получено 8–10 мг <sup>2</sup>H-меченого БР из 1 г сухой бактериальной биомассы, гомогенность которого подтверждена электрофорезом в 12,5%-ным ПААГ с 0,1%-ным ДДС-На, регенерацией апомембран с 13-*транс*-ретиналом и ОФ ВЭЖХ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот.

Таблица 2

### Суммарные результаты по выделению и очистке БР различными методами

Образец	Содержание ПМ, моль ПМ/моль БР	Степень очистки от каротиноидов и фосфолипидов, %	Выход БР*, %
Фракция ПМ	20,5	–	–
ПМ после промывки EtOH:			
1 промывка	16,9	65	93
2 промывка	15,1	70	90
3 промывка	14,5	76	88
4 промывка	13,6	81	84
5 промывка	13,2	84	80
БР, перекристаллизованный из MeOH	12,9	86	75
БР после очистки на колонке с сефадексом G-200	10,2	92	86

\* Выход указан в масс.% по отношению к БР, солюбилизированному в 0,5% ДДС-На.

### Гидролиз БР

Условия проведения гидролиза <sup>2</sup>H-меченого БР определялись необходимостью предотвращения реакций изотопного (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) обмена водорода на дейтерий в молекуле фенилаланина и сохранения остатков триптофана в белке. Рассматривались два альтернативных варианта – кислотный и щелочной гидролиз. Кислотный гидролиз белка в

стандартных условиях (6 М HCl или 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 110 °С, 24 ч) приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот в белке [17], которые для настоящего исследования не играют существенной роли. Модификация этого метода, заключающаяся в добавлении в реакционную среду фенола, тиогликолевой кислоты, β-меркаптоэтанола, позволяет сохранить до 80–85% триптофана [18]. Использование толуолсульфонокислоты с 0,2% 3-(2-аминоэтил)-индолом или 3 М меркаптоэтансульфонокислоты также эффективно для сохранения триптофана (до 93%) [19]. Однако для решения поставленной задачи вышеперечисленные методы непригодны, поскольку обладают существенным недостатком: в условиях кислотного гидролиза с высокой скоростью происходит изотопный (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот [20]. Поэтому даже проведение гидролиза в дейтерированных реагентах (6 М <sup>2</sup>HCl, 2 М <sup>2</sup>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) не позволяет получать реальные данные о включении дейтерия в белок.

При щелочном гидролизе белка (2 М Ba(OH)<sub>2</sub> или 4 М NaOH, 110 °С, 24 ч) реакций изотопного (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) обмена практически не наблюдается (исключением является протон (дейтерон) у атома С2 гистидина, а триптофан не разрушается, что определило выбор этого метода гидролиза в настоящей работе. Упрощение процедуры выделения смеси свободных аминокислот за счет нейтрализации H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) явилось причиной выбора в качестве гидролизующего агента 2 М Ba(OH)<sub>2</sub>. Возможная *D,L*-рацемизация аминокислот при щелочном гидролизе не влияла на результат последующего масс-спектрометрического исследования уровня дейтерированности молекул ароматических [<sup>2</sup>H]аминокислот.

### **Исследование уровня дейтерированности БР масс-спектрометрией ЭУ**

Для изучения включения ароматических [<sup>2</sup>H]аминокислот в молекулу БР использовали метод масс-спектрометрии ЭУ после модификации смеси аминокислот гидролизата БР в метиловые эфиры N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот. Чтобы получить воспроизводимый результат по уровню дейтерированности <sup>2</sup>H-меченого белка, сначала регистрировали полный скан масс-спектр ЭУ смеси метиловых эфиров N-Dns-производных [<sup>2</sup>H]аминокислот, полученных из гидролизата БР. Затем проводили разделение метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных ароматических аминокислот обращенно-фазовой ВЭЖХ и получали масс-спектры ЭУ для каждой выделенной индивидуальной [<sup>2</sup>H]аминокислоты. Уровень дейтерированности рассчитывали по разнице пиков молекулярных ионов [M]<sup>+</sup> производных дейтерированных и протонированных аминокислот.

Полный масс-спектр электронного удара ЭУ смеси метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот, показанный на рисунке 3 (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 дансилхлоридом и диазометаном. Анализируемые [<sup>2</sup>H]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]<sup>+</sup> полиморфно расщеплялись на отдельные кластеры со статистическим набором значений *m/z* в зависимости от количества водородных атомов в молекуле. Учитывая эффект изотопного полиморфизма, подсчет уровня дейтерированности молекул [<sup>2</sup>H]аминокислот проводили по наиболее распространенному пику молекулярного иона (M)<sup>+</sup> в каждом кластере с математически усредненной величиной [M]<sup>+</sup> (рисунок 3) – для <sup>2</sup>H-меченого производного фенилаланина пик молекулярного иона определялся [M]<sup>+</sup> при *m/z* 417, 14% (вместо [M]<sup>+</sup> при *m/z* 412, 20% для немеченого производного (пики немеченых аминокислот не показаны)), [<sup>2</sup>H]тирозина – [M]<sup>+</sup> при *m/z* 429, 15% (вместо [M]<sup>+</sup> при *m/z* 428, 13%), [<sup>2</sup>H]триптофана – [M]<sup>+</sup> при *m/z* 456, 11% (вместо [M]<sup>+</sup> при *m/z* 451, 17%). Уровень дейтерированности, соответствующий увеличению молекулярной массы составил для [<sup>2</sup>H]тирозина один (96 ат.% <sup>2</sup>H), [<sup>2</sup>H]фенилаланина – пять (90 ат.% <sup>2</sup>H) и [<sup>2</sup>H]триптофана – пять (98 ат.% <sup>2</sup>H) атомов дейтерия, что совпадает с данными по уровню дейтерированности исходных ароматических [<sup>2</sup>H]аминокислот – [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr, [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe и [2,4,5,6,7-

$^2\text{H}_5\text{]Trp}$ , добавляемых в ростовую среду штамма продуцента. Полученные данные по уровню дейтерированности  $[\text{}^2\text{H}]$ фенилаланина,  $[\text{}^2\text{H}]$ тирозина и  $[\text{}^2\text{H}]$ триптофана позволяют сделать вывод о высокой селективности включения экзогенных  $[\text{}^2\text{H}]$ ароматических аминокислот в молекулу БР: дейтерий детектировался во всех остатках  $[\text{}^2\text{H}]$ ароматических аминокислот (таблица 3). Присутствие в масс-спектре ЭУ пиков  $[\text{M}]^+$  протонированных и полудейтерированных аналогов фенилаланина с  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  413–418, тирозина с  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  428–430 и триптофана с  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  453–457 с различными вкладами в уровни дейтерированности молекул, свидетельствует о сохранении в клетке небольшой доли минорных путей биосинтеза ароматических  $[\text{}^2\text{H}]$ аминокислот *de novo*, приводящим к разбавлению дейтериевой метки (таблица 3).

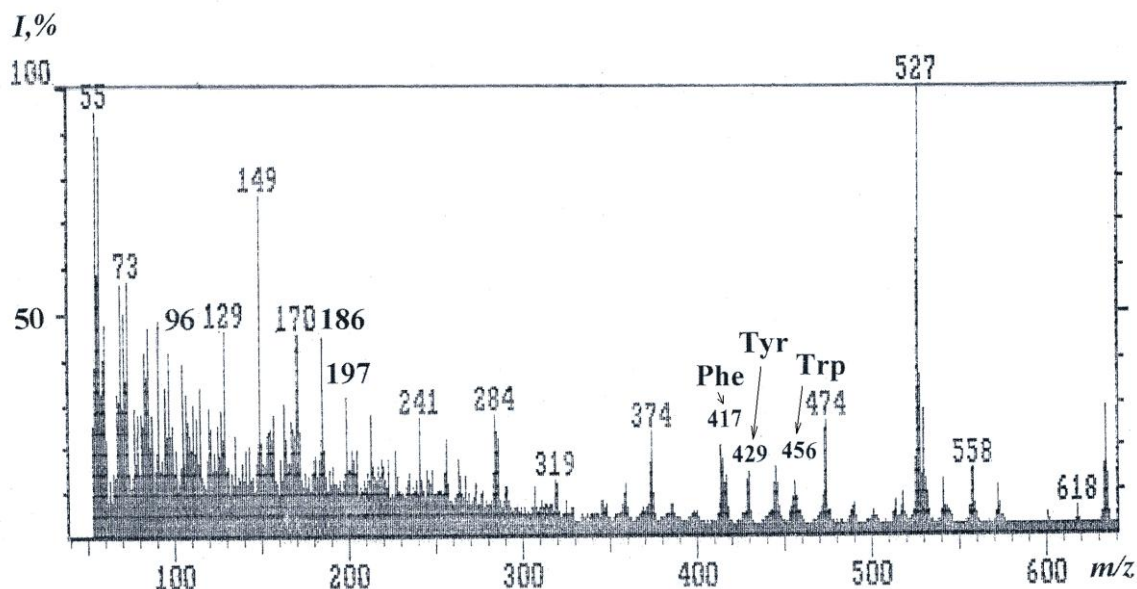


Рис. 3. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата БР, полученного при выращивании *H. halobium ET 1001* в синтетической среде с  $[\text{}^2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5\text{]Phe}$ ,  $[\text{}^3,5\text{-}^2\text{H}_2\text{]Tyr}$  и  $[\text{}^2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5\text{]Trp}$ . Пики молекулярных ионов аминокислот соответствуют их производным,  $I$  – интенсивность пиков (%)

Таблица 3

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

Соединение	Величина пика $[\text{M}]^+$	Интенсивность, %	Количество атомов дейтерия*	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода**
N-Dns- $[\text{}^2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5\text{]Phe-O}Me$	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- $[\text{}^3,5\text{-}^2\text{H}_2\text{]Tyr-O}Me$	428	12	–	–
	429	15	1	14
	430	5	2	29

N-Dns-[2,4,5,6,7- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]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

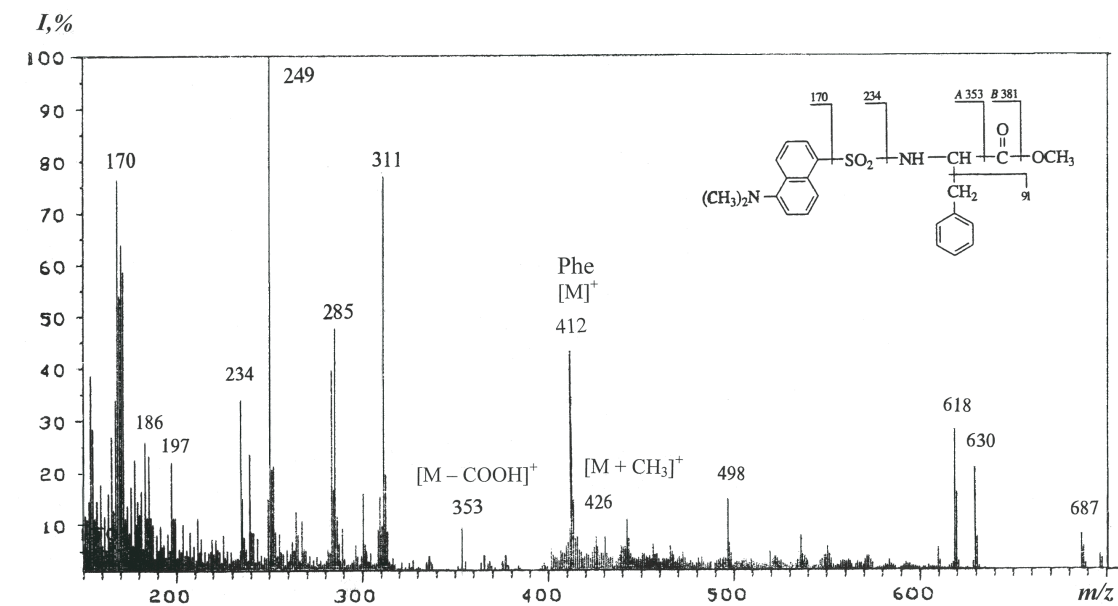
\*\* При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH<sub>2</sub>-группах аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации в H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O

Согласно данным масс-спектрометрического анализа, пики молекулярных ионов [M]<sup>+</sup> метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных ароматических аминокислот обладали низкой интенсивностью и полиморфно расщеплялись, поэтому области их молекулярного обогащения были сильно уширены. Кроме этого, масс-спектры компонентов смеси аддитивны, поэтому смеси можно анализировать, только если имеются спектры различных компонентов, записанные в тех же условиях. Проводимые вычисления предусматривают решение системы из *n* уравнений с *n* неизвестными для смеси из *n* компонентов. Для компонентов, концентрация которых превышает 10 мол.%, правильность и воспроизводимость результатов анализа составляет ±0,5 мол.% (при доверительной вероятности 90%). Поэтому для получения воспроизводимого результата необходимо хроматографически выделять индивидуальные производные [<sup>2</sup>H]аминокислот из белкового гидролизата.

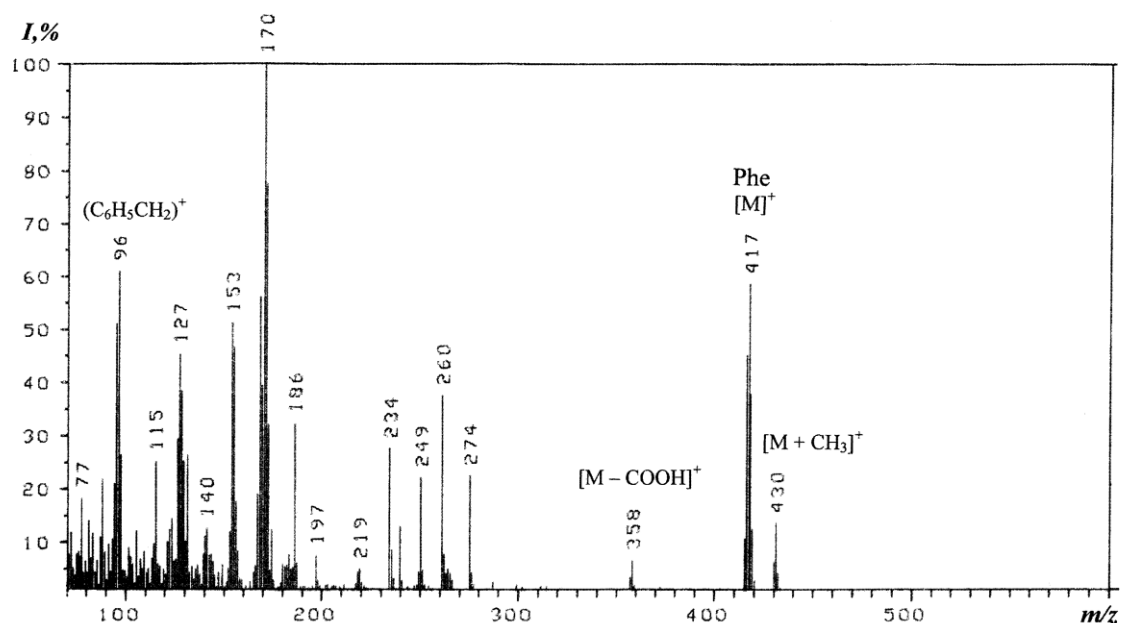
Для решения поставленной задачи использовали ОФ ВЭЖХ на октадецилсилановом силикагеле Separon SGX C18, 7 мкм, эффективность которого подтверждалась разделением смеси метиловых эфиров N-Dns-производных [<sup>2</sup>H]аминокислот из других микробных объектов, как метилотрофные бактерии и микроводоросли [21–23]. Данные по хроматографическому разделению метиловых эфиров N-Dns-производных [<sup>2</sup>H]аминокислот из различных природных источников не отличаются от таковых для немеченых метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот, поскольку изотопное обогащение молекул практически не сказывается на хроматографических характеристиках. Метод адаптировали к условиям хроматографического разделения смеси метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот гидролизата БР, заключающийся в оптимизации соотношения элюентов, форме градиента и скорости элюирования с колонки. Кроме того, при использовании градиента существенно увеличивается максимальное количество пиков, способных разместиться на хроматограмме – пиковая емкость, что весьма немаловажно при разделении сложных многокомпонентных смесей, каковыми являются белковые гидролизаты. В этом случае каждый из компонентов смеси разделяется при наиболее оптимальном составе элюента, за счет чего достигается их полное и качественное разделение за гораздо меньшее время, чем при изократическом режиме.

Наилучшее разделение достигалось при градиентном элюировании метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот смесью растворителей (А) – CH<sub>3</sub>CN–CF<sub>3</sub>COOH (100 : 0,1–0,5 об.%) и (Б) – CH<sub>3</sub>CN (100 об.%) за счет постепенного повышения концентрации компонента Б в смеси от 10 до 100%. Пробы растворяли в 10 мл MeOH и наносили в количестве 50–100 мкл на колонку (250×10 мм) с октадецилсилановым силикагелем Separon SGX C18, 7 мкм. При этом удалось разделить триптофан и трудно разрешимую пару фенилаланин/тирозин.





a)



б)

Рис. 4. Масс-спектры ЭУ метилового эфира N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]Phe в различных экспериментальных условиях: а) – немеченый метиловый эфир N-Dns-Phe; б) – метиловый эфир N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]Phe, выделенный из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ (б)

Степени хроматографической чистоты выделенных из смеси белкового гидролизата БР метиловых эфиров N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина, N-Dns-[3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозина и N-Dns-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофана составили 89, 91 и 90% соответственно. Полученный результат подтвердил рисунок 4, б на котором приведен масс-спектр ЭУ метилового эфира N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина, выделенного из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ (сканирование при  $m/z$  70–600, базовый пик  $m/z$  170, 100%) (масс-спектр приведен относительно немеченого метилового эфира N-Dns-фенилаланина (а), сканирование при  $m/z$  150–700, базовый пик  $m/z$  250, 100%). Доказательством включения дейтерия в молекулу фенилаланина является пик тяжелого молекулярного иона метилового эфира N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]фенилаланина ( $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  417, 59% вместо  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  412, 44% для немеченого производного фенилаланина) и дополнительный пик обогащенного дейтерием бензильного  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина при  $m/z$  96, 61% (вместо  $m/z$  91, 55% в



контроле (не показан)) (рисунок 4, б). Пики второстепенных фрагментов различной интенсивности со значениями  $m/z$  249, 234 и 170 являются продуктами вторичного распада дансильного остатка до N-диметиламинонафталина, низкоинтенсивный пик  $[M - COOCH_3]^+$  при  $m/z$  358, 7% ( $m/z$  353, 10%, контроль) является продуктом отщепления карбоксиметильной  $COOCH_3$ -группы из метилового эфира N-Dns- $[^2H]$ фенилаланина, а пик  $[M + CH_3]^+$  при  $m/z$  430, 15% ( $m/z$  426, 8%, контроль) – продуктом дополнительного метилирования по  $\alpha$ -аминогруппе  $[^2H]$ фенилаланина (рисунок 4, б). Согласно данным масс-спектрометрии ЭУ, разница между молекулярной массой “легкого” и “тяжелого” пиков  $[M]^+$  метилового эфира N-Dns-фенилаланина составляет пять единиц, что совпадает с первичными данными по уровню дейтерированности исходного  $[2,3,4,5,6-^2H_5]$ фенилаланина, добавляемого в среду выращивания. Масс-спектрометрические данные по уровням дейтерированности  $[3,5-^2H_2]$ тирозина и  $[2,4,5,6,7-^2H_5]$ триптофана также находятся в корреляции и подтверждены спектроскопией  $^1H$  ЯМР.

### Выводы

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой эффективности мечения БР дейтерием по остаткам ароматических аминокислот – Phe, Tug и Trp с выходом белка 8–10 мг на 1 г биомассы. Главным преимуществом метода является то, что выделенный БР сохраняет природную биологически активную конфигурацию в комплексе с 13-*транс*-ретином и способность к фотохимическим превращениям *in vitro*, что доказано электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-На и регенерацией апомембран с 13-*транс*-ретином. Метод также применим к получению других аналогичных БР трансмембранных белков галобактерий – сенсородопсина и галородопсина. В дальнейшем планируется получать полностью дейтерированные образцы БР для реконструкции функционально активных систем трансмембранных белков в тяжелой воде с  $[^2H]$ жирными кислотами и другими биологически активными соединениями. Эти исследования позволят дать ответ на вопрос, как функционирует БР в составе нативных мембран в условиях полного замещения протонов на дейтерий.

### Благодарности

Работа осуществлялась при поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 12.

### Примечания:

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. № 89. P. 149–160.
2. 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.
3. 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.
4. Grigorieff N. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin // Journal of Molecular Biology. 1996. V. 259. P. 393–421.
5. Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D. Closing on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 1999. V. 28. P. 367–399.
6. Haupts U., Tittor J., Bamberg E., Oesterhelt D. General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer model // Biochemistry. 1997. V. 36, № 2–7. P. 78–85.
7. Lanyi J.K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin // Journal of Structural Biology. 1998. V. 124. P. 164–178.
8. Hampp N., Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin and its potential in technical applications. In: Nanobiotechnology / Eds. Ch. Niemeyer, C. Mirkin. – Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 2004. 167 p.
9. Vought B.W., Birge R.R. (eds.) Molecular electronics and hybrid computers / in: Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering. NY: Wiley-Interscience. 1999. 490 p.

10. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот бактериальных объектов // Биоорганическая химия. 1996. т. 22, № 10–11. С. 856–869.
11. Mosin O.V., Karnaukhova E.N., Pshenichnikova A.B., Reshetova O.S. Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin / in: 6th Intern. Conf. on Retinal proteins. Leiden: Elsevier, 1994. p. 115.
12. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Методы получения аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  // Биотехнология. 1996. № 10. С. 24–40.
13. 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.
14. 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.
15. Rudiger M., Tittor J., Gerwert K., Oesterhelt D. Reconstitution of bacteriorhodopsin from the apoprotein and retinal studied by Fourier-transformed infrared spectroscopy // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 4867–4874.
16. Nonella M., Windemuth A., Schulten K. Structure of Bacteriorhodopsin and *in situ* isomerization of retinal: A molecular dynamics study // Journal Photochem. Photobiol. 1991. V. 54, № 6. P. 937–948.
17. Звонкова Е.Н., Зотчик Н.Ф., Филиппович Е.И., Митрофанова Т.К., Мягкова Г.И., Серебренникова Г.А. Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия. 1970. 68 с.
18. 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.
19. Liu T.Y., Chang Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan // J. Biol Chem. 1971. V. 246, № 9. P. 2842–2848.
20. Пшеничникова А.Б., Карнаухова Е.Н., Звонкова Е.Н., Швец В.И. Методы получения дейтерированных аминокислот // Биоорганическая химия. 1995. т. 21, № 3. С. 163–178.
21. 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.
22. Мосин О.В., Игнатов И., Складнев Д.А., Швец В.И. Штамм грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* – продуцент [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 1(6). С. 58–67.
23. Мосин О.В., Игнатов И. Биологическое воздействие дейтерия на клетки прокариот и эукариот // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 2(7). С. 122–131.

## References

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. № 89. P. 149–160.
2. 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.
3. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvec V.I.. Vkljuchenie dejterirovannyh aromaticeskikh aminokislot v molekulu bakteriorodopsina *Halobacterium halobium* // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 1999. V. 35, № 1. P. 34–42.
4. Grigorieff N. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin // Journal of Molecular Biology. 1996. V. 259. P. 393–421.
5. Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D. Closing on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 1999. V. 28. P. 367–399.
6. Haupts U., Tittor J., Bamberg E., Oesterhelt D. General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer model // Biochemistry. 1997. V. 36, № 2–7. P. 78–85.

7. Lanyi J.K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin // *Journal of Structural Biology*. 1998. V. 124. P. 164–178.
8. Hampp N., Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin and its potential in technical applications. In: *Nanobiotechnology* / Eds. Ch. Niemeyer, C. Mirkin. – Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 2004. 167 p.
9. Vought B.W., Birge R.R. (eds.) *Molecular electronics and hybrid computers* / in: *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*. NY: Wiley-Interscience. 1999. 490 p.
10. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvec V.I. Mass-spektrometričeskaja ocenka urovnja vključenija  $2N$  i  $13S$  v molekuly aminokislot bakterial'nyh ob'ektov // *Bioorganicheseskaja himija*. 1996. V. 22, № 10–11. S. 856–869.
11. Mosin O.V., Karnaukhova E.N., Pshenichnikova A.B., Reshetova O.S. Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin / in: *6th Intern. Conf. on Retinal proteins*. Leiden: Elsevier, 1994. p. 115.
12. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvec V.I. Metody poluchenija aminokislot i belkov, mečennyh stabil'nymi izotopami  $2N$ ,  $13S$ ,  $15N$ ,  $18O$  // *Biotehnologija*. 1996. № 10. S. 24–40.
13. Mosin O.V., Shvec V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Mikrobnij sintez dejterij-mečennogo L-fenilalanina fakul'tativnoj metilotrofnoj bakteriej *Brevibacterium mehylicum* na sredah s različnymi koncentracijami tjazheloj vody // *Biofarmaceutičeskij zhurnal*. 2012. V. 4, № 1. S. 11–22.
14. 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.
15. Rudiger M., Tittor J., Gerwert K., Oesterhelt D. Reconstitution of bacteriorhodopsin from the apoprotein and retinal studied by Fourier-transformed infrared spectroscopy // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 4867–4874.
16. Nonella M., Windemuth A., Schulten K. Structure of Bacteriorhodopsin and *in situ* isomerization of retinal: A molecular dynamics study // *Journal Photochem. Photobiol*. 1991. V. 54, № 6. P. 937–948.
17. Zvonkova E.N., Zotchik N.F., Filippovich E.I., Mitrofanova T.K., Mjagkova G.I., Serebrennikova G.A. *Himija biologičeski aktivnyh prirodnyh soedinenij*. M.: Himija. 1970. 68 s.
18. 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.
19. Liu T.Y., Chang Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan // *J. Biol Chem*. 1971. V. 246, № 9. P. 2842–2848.
20. Pshenichnikova A.B., Karnaukhova E.N., Zvonkova E.N., Shvec V.I. Metody poluchenija dejterirovannyh aminokislot // *Bioorganicheseskaja himija*. 1995. t. 21, № 3. S. 163–178.
21. Egorova T.A., Mosin O.V., Eremin S.V., Karnaukhova E.N., Zvonkova E.N., Shvec V.I. Razdelenie aminokislot belkovykh gidrolizatov prirodnyh ob'ektom metodom VJeZhH v vide karbobenzoksiproizvodnyh // *Biotehnologija*. 1993. № 8. S. 21–25.
22. Mosin O.V., Ignatov I., Skladnev D.A., Shvec V.I. Shtamm grampolozhitel'nyh fakul'tativnyh metilotrofnnyh bakterij *Brevibacterium methylicum* – producent  $[2H]$ fenilalanina // *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv*. 2014. № 1(6). S. 58–67.
23. Mosin O.V., Ignatov I. Biologičeskoe vozdejstvie dejterija na kletki prokariot i jeukariot // *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv*. 2014. № 2(7). S. 122–131.

УДК 537.86 + 577.37

**Биосинтетическое включение дейтерий-меченных ароматических аминокислот –  $[2,3,4,5,6-^2H_5]$ фенилаланина,  $[3,5-^2H_2]$ тирозина и  $[2,4,5,6,7-^2H_5]$ триптофана в молекулу трансмембранного белка бактериородопсина галобактерии *Halobacterium halobium ET 1001***

<sup>1</sup> Олег Викторович Мосин

<sup>2</sup> Игнат Игнатов

<sup>3</sup>Дмитрий Анатольевич Складнев

<sup>4</sup>Виталий Иванович Швец

<sup>1</sup> Московский 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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария

Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ)

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

<sup>3</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация

Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник ГосНИИГенетика

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1.

E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup> Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация

Академик РАН, доктор химических наук

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

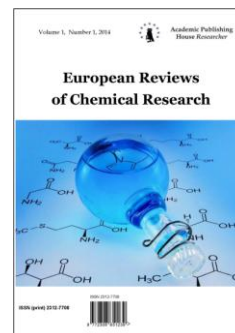
**Аннотация.** Разработан метод микробиологического синтеза и выделения фотопреобразующего трансмембранного белка бактериородопсина (выход 8–10 мг), меченного дейтерием по остаткам функционально-важных аминокислот – [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Trp. Белок выделен из мембран экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* ET 1001 лизисом клеток в дистиллированной воде, обработкой бактериальной биомассы ультразвуком, спиртовой экстракцией низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов, с последующей солюбилизацией конечного продукта в 0,5%-ном ДДС-Na и фракционированием метанолом. Гомогенность синтезируемого [<sup>2</sup>H]бактериородопсина и селективность включения дейтерия в молекулу исследованы комбинацией методов разделения и анализа белка, включая электрофорез в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na, гель-проникающую хроматографию на сефадексе G-200, ОФ ВЭЖХ, масс-спектрометрию ЭУ метиловых эфиров N-5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

**Ключевые слова:** *Halobacterium halobium* ET 1001; [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe; [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr; [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Trp; [<sup>2</sup>H]бактериородопсин; биосинтез; масс-спектрометрия ЭУ; ОФ ВЭЖХ.

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. 2, No. 2, pp. 109-132, 2014

DOI: 10.13187/erchr.2014.2.109  
[www.ejournal14.com](http://www.ejournal14.com)



UDC 579.871.08:577.112.385.4.08

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

<sup>1</sup>Oleg Mosin  
<sup>2</sup>Ignat Ignatov  
<sup>3</sup>Dmitry Skladnev  
<sup>4</sup>Vitaly Shvets

<sup>1</sup>Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation  
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)  
103316, Moscow, Talalihin ulitsa, 33  
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

<sup>2</sup>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

<sup>3</sup>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 Dorozhniy proezd, 1  
E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup>M.V. Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Russian Federation  
Academician of Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry)  
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  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  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 [ $^2\text{H}$ ]methanol, [ $^{13}\text{C}$ ]methanol and  $^2\text{H}_2\text{O}$ . It was also performed the incorporation of *L*-[ $^2,3,4,5,6$ - $^2\text{H}$ ]phenylalanine, *L*-[ $^3,5$ - $^2\text{H}$ ]tyrosine and *L*-[ $^2,4,5,6,7$ - $^2\text{H}$ ]tryptophan in bacteriorhodopsin synthesised in purple membranes of photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium* ET 1001. For mass-spectrometric analysis the multicomponental mixtures of  $^2\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -labeled amino acids, derived from cultural media and protein hydrolysates after hydrolysis in 6 M  $^2\text{HCl}$  (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.  $^2\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -labeled amino acids represented the mixtures differing in quantities of isotopes incorporated into molecule. The levels of  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  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  $^2\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -labelled substrates.

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

### Введение

Обогащение молекул стабильными изотопами ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ) 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,  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченные аминокислоты применяются для изучения пространственной структуры и конформационных изменений белков, взаимодействия белковых молекул, а также в химических синтезах некоторых изотопно-меченых 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.  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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 [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]соединений. При биосинтетическом получении  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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 [ $^{13}\text{C}$ ]метанол, [ $^2\text{H}$ ]метанол и  $^2\text{H}_2\text{O}$  [9, 10]. Этот подход включает также комплексное использование химических компонентов биомассы, выращенной на [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]ростовых субстратах и последующего выделения и фракционирования целевых  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ - меченых соединений. Другой подход заключается в сайт-специфическом обогащении аминокислот по определённым положениям молекул за счёт ассимиляции клеткой изотопно-меченых предшественников, например, [1,4-  $^{13}\text{C}$ ]сукцината, [1, 2-  $^{13}\text{C}$ ]ацетата и [1-  $^{13}\text{C}$ ]лактата [11].

Настоящая работа является продолжением исследований, направленных на биосинтетическое получение  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченых аминокислот за счёт утилизации низкомолекулярных меченых субстратов – [ $^2\text{H}$ ]метанола, [ $^{13}\text{C}$ ]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 [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]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-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланин (90 ат.% <sup>2</sup>H), *L*-[3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозин (96 ат.% <sup>2</sup>H) и *L*-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофан (98 ат.% <sup>2</sup>H) (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 [<sup>2</sup>H]метанол, [<sup>13</sup>C]метанол и <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O 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-<sup>2</sup>H]фенилаланином, *L*-[3,5-<sup>2</sup>H]тирозином, и *L*-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H]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; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 20; KCl – 2; NH<sub>4</sub>Cl – 0,5; KNO<sub>3</sub> – 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,05; цитрат натрия – 0,5; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 3·10<sup>-4</sup>; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,065; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 4·10<sup>-5</sup>; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 5·10<sup>-4</sup>; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 5·10<sup>-5</sup>); глицерин – 1,0; ростовые факторы (биотин – 0,1·10<sup>-3</sup>; фолиевая кислота – 10·10<sup>-3</sup>; витамин В<sub>12</sub> – 2·10<sup>-4</sup>).

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 H<sub>2</sub>O) контролировали на спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) по соотношению полос поглощения при λ = 280/568 нм (молярные коэффициенты светопоглощения: ε<sub>280</sub> = 1,1·10<sup>5</sup> М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [14] и ε<sub>568</sub> = 6,3·10<sup>4</sup> М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [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 А (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 М9 с  $^2\text{H}_2\text{O}$  и обычным метанолом, так как уровень включения  $^2\text{H}$  в молекулы аминокислоты за счёт ассимиляции [ $^2\text{H}$ ]метанола незначителен.

Поскольку в клетке происходит ассимиляция водорода (дейтерия) из  $\text{H}_2\text{O}$  ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) 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 М9 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 [ $^{13}\text{C}$ ]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  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот осуществляли в одну стадию за счет выращивания бактерий на водных средах М9, содержащих в качестве источника углерода-13 1 % [ $^{13}\text{C}$ ]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 <sub>3</sub> OH	0	100	1,1
7	<sup>13</sup> CH <sub>3</sub> 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.%) <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Данные опыта 6–7 приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде M9, содержащей 1 % метанол (6) или 1 % [<sup>13</sup>C]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-<sup>2</sup>H]фенилаланином, *L*-[3,5-<sup>2</sup>H]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H]триптофаном.

Основные этапы при выделении [<sup>2</sup>H]-и [<sup>13</sup>C]-аминокислот заключались в выращивании соответствующих штаммов-продуцентов на средах с мечеными субстратами – [<sup>2</sup>H]метанолом, [<sup>13</sup>C]метанолом и <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O или *L*-[2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H]фенилаланином, *L*-[3,5-<sup>2</sup>H]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H]триптофаном (бактериородопсин), отделении культуральных жидкостей (КЖ), содержащих секретирываемые 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.

<sup>2</sup>H- и <sup>13</sup>C-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  $\alpha$ -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 [ $^2\text{H}$ ]аминокислот в белке. Были рассмотрены два альтернативных варианта проведения гидролиза – кислотный и щелочной. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 М 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 ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ ) 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 М  $^2\text{HCl}$  с 3 % фенолом (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ )).

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

Для получения летучих производных аминокислоты переводили в метиловые эфиры N-Dns- [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]аминокислот или N-Cbz- [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]аминокислоты, которые затем разделяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ. Условия N-дериватизации [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]аминокислот отработывали таким образом, чтобы получить в масс-спектрах как можно более интенсивные пики их молекулярных ионов ( $\text{M}^+$ ) на уровне фона метаболитов среды. Для этого проводили прямую дериватизацию [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]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 ( $\text{M}^+$ ) 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- [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]аминокислоты были переведены в их метиловые эфиры. Для предотвращения обратного изотопного обмена ароматических протонов (дейтеронов) при этерификации дейтерий-меченых 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  $\alpha$ -NH-(Dns)-группе [ $^2\text{H}$ ]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  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот мультикомпонентных смесей в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов определяли аналитически методом масс-спектрометрии электронного удара. Метилловые эфиры N-Dns- $[\text{}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот или N-Cbz- $[\text{}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ 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- $[\text{}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ 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  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченных аминокислот, выделенных из культуральных жидкостей *B. methylicum* и *M. flagellatum* и гидролизатов белков в виде их N-Cbz- $[\text{}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот составили 96–98 %, при выходах – 67–89 %. Для отдельных  $[\text{}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ аминокислот оказалось более удобным разделение в виде метиловых эфиров N-Dns- $[\text{}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот. При этом степень хроматографической чистоты полученных из гидролизатов бактериородопсина метиловых эфиров N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ фенилаланина, N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ тирозина и N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ 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 ( $\text{M}^+$ ) при высоких молекулярных массах оказались весьма удобными для масс-спектрометрических исследований и позволяют идентифицировать  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -меченные аминокислоты в присутствии низкомолекулярных метаболитов среды и других продуктов дериватизации. Последний факт очень важен для изучения состава пула  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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 ( $\text{M}^+$ ) при  $m/z = 412$  и  $m/z = 378$  и к образованию дансильных фрагментов и продуктов их дальнейшего распада до N-диметиламинафталина, а также к образованию аминных  $\text{A}^+$  и аминоацильных фрагментов  $\text{B}^+$  (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  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот белковых гидролизатов.

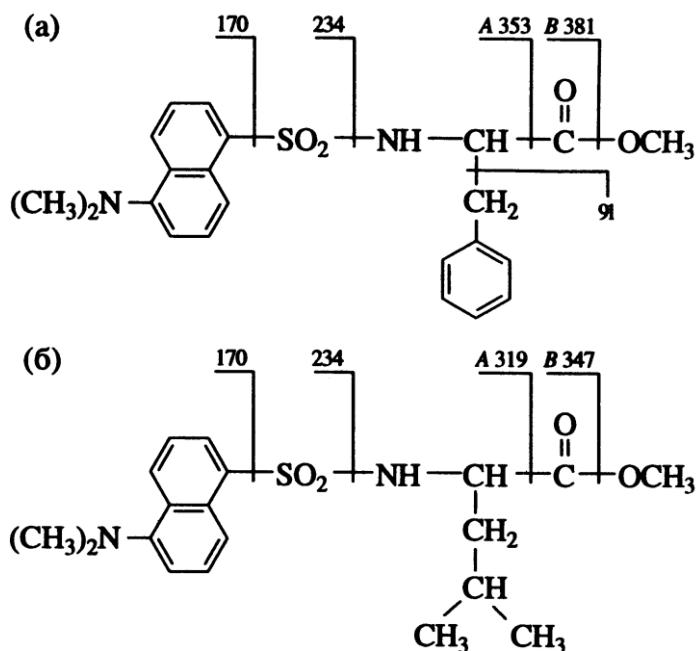


Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с  $M_r = 412$  (а) и N-Dns-лейцина с  $M_r = 378$  (б) при масс-спектрометрии электронного удара

При использовании в качестве источников стабильных изотопов [<sup>13</sup>C]метанола и <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, в клетке синтезируются изотопно-замещённые аминокислоты, различающиеся количеством атомов, замещённых на <sup>13</sup>C и <sup>2</sup>H. 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 [<sup>13</sup>C]аминокислот дериватизованной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной среды с 1 % [<sup>13</sup>C]метанолом (рис. 2 б), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns-[<sup>13</sup>C]глицина, N-Dns-[<sup>13</sup>C]аланина, N-Dns-[<sup>13</sup>C]валина, N-Dns-[<sup>13</sup>C]лейцина/[<sup>13</sup>C]изолейцина и N-Dns-[<sup>13</sup>C]фенилаланина. Следует подчеркнуть, что величина  $m/z$  для молекулярного иона ( $M^+$ ) метиловых эфиров N-Dns-[<sup>13</sup>C]лейцина и [<sup>13</sup>C]изолейцина в масс-спектрах электронного удара одинакова, поэтому данным методом нельзя точно идентифицировать эти аминокислоты. Максимальные уровни включения <sup>13</sup>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 [<sup>13</sup>C]аланина до 95 % для [<sup>13</sup>C]фенилаланина (рис. 2). Учитывая ауксотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснён вкладом экзогенного изолейцина в уровень изотопного включения [<sup>13</sup>C]лейцина, а также других метаболически связанных с ним аминокислот – [<sup>13</sup>C]аланина и [<sup>13</sup>C]валина.

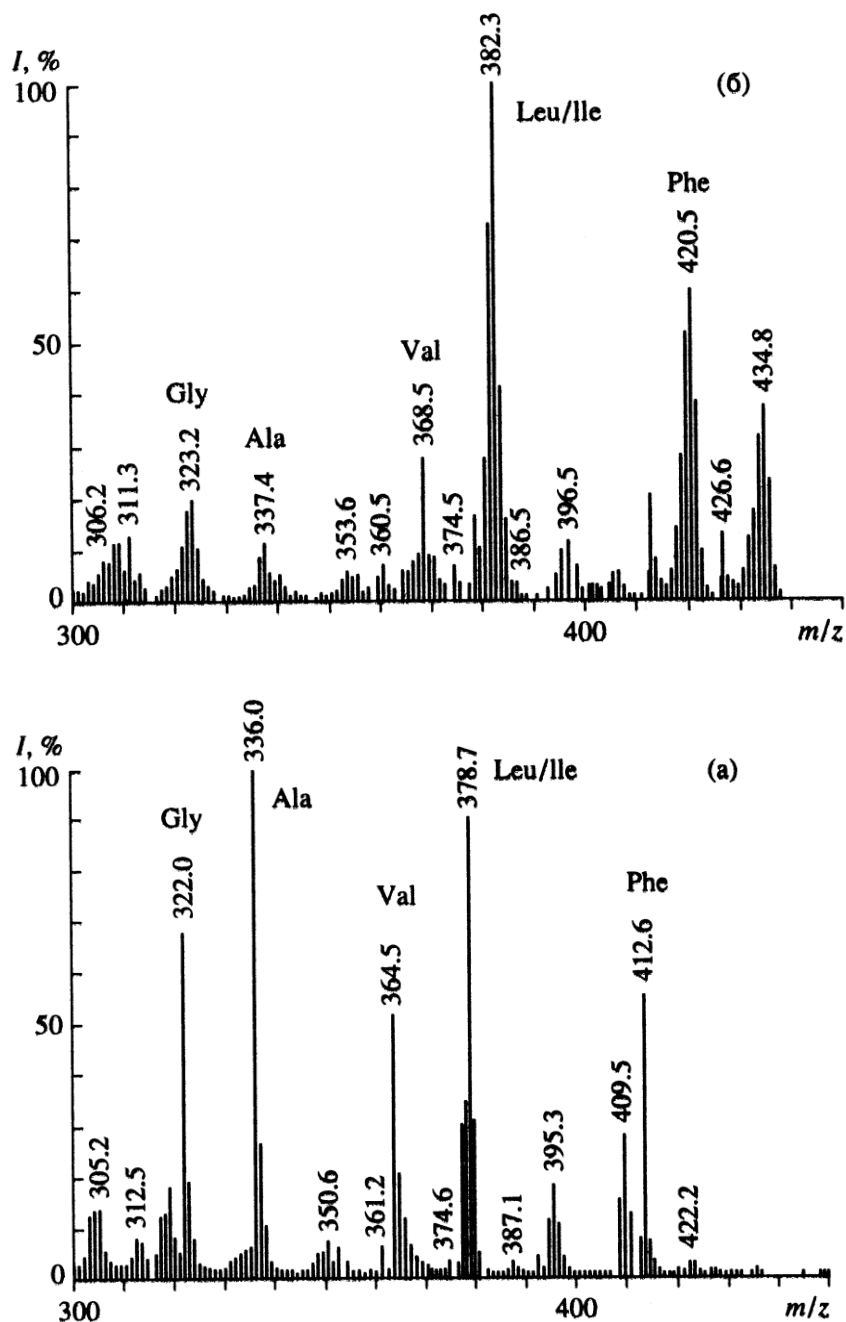


Рис. 2. Масс-спектры ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[<sup>13</sup>C]аминокислот из КЖ *M. flagellatum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 1 % метанол и H<sub>2</sub>O (контрольные условия); б) – 1 % [<sup>13</sup>C]метанол и H<sub>2</sub>O. Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов [M]<sup>+</sup> метиловых эфиров N-Dns-[<sup>13</sup>C]аминокислот. Интенсивность пиков приведена в %

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

Таблица 2

**Уровни включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  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  $^2\text{H}$  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  $^{13}\text{C}$  приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде М9, содержащей 1 % [ $^{13}\text{C}$ ]метанол.

Из масс-спектра метиловых эфиров N-Dns- $^2\text{H}$ 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 ( $\text{M}^+$ ) 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 [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина.



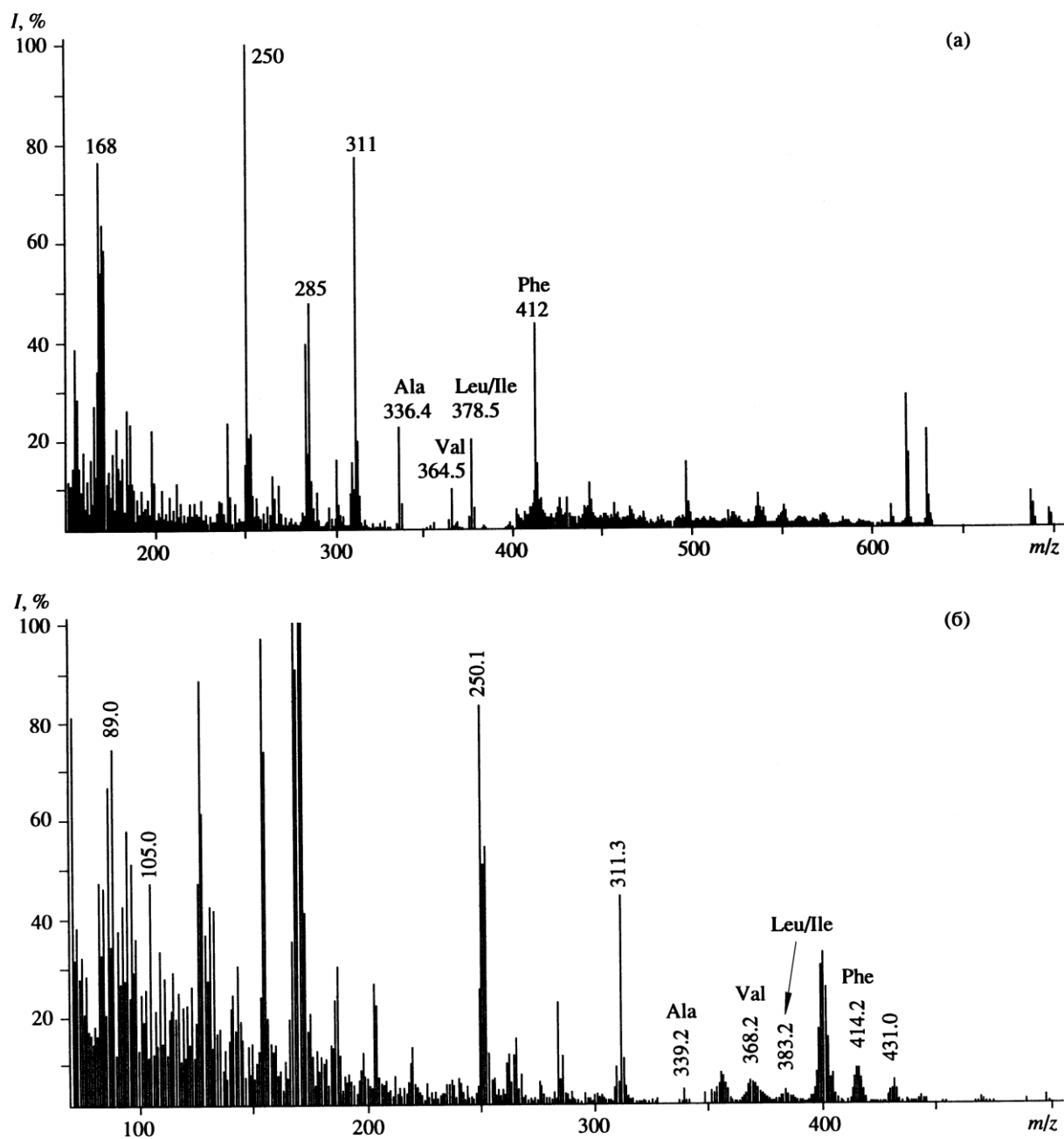


Рис. 3. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 2 % метанол и 98,0 %  $\text{H}_2\text{O}$  (контрольные условия); б) – 2 % [ $^2\text{H}$ ]метанол и 49,0 %  $^2\text{H}_2\text{O}$

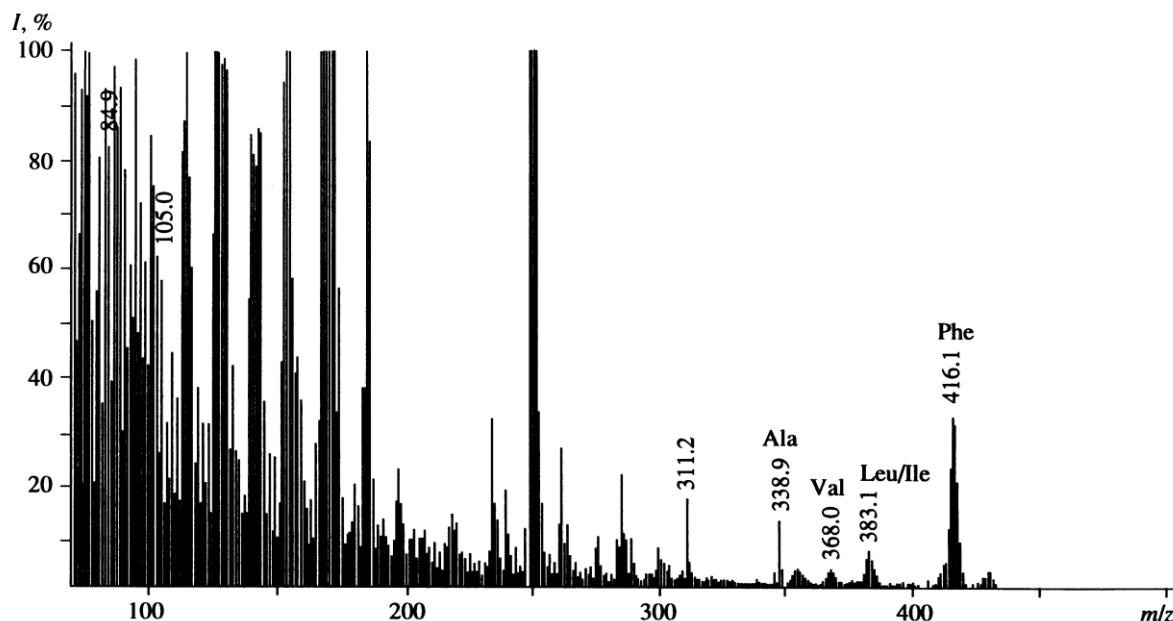


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [ $^2\text{H}$ ]метанол и 73,5 %  $^2\text{H}_2\text{O}$

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-[ $^2\text{H}$ ]фенилаланина ( $\text{M}^+$ ) с  $m/z = 416,1$  указывает на увеличение молекулярной массы [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина на 4,1 единицу, т. е., 51,2 % атомов водорода в молекуле [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина в этом случае замещены на дейтерий. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина за счет процесса биосинтеза *de novo*, т. е. по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым относятся протоны (дейтероны) при гетероатомах в  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ - группах аминокислот, которые замещаются за счёт лёгкости диссоциации в  $\text{H}_2\text{O}$  ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ).

Из таблицы 2 видно, что условиях ауксотрофности по *L*-лейцину уровни включения  $^2\text{H}$  в молекулы [ $^2\text{H}$ ]лейцина/[ $^2\text{H}$ ]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-[ $^2\text{H}$ ]аминокислот культуральной жидкости после выращивания бактерий *B. methylicum* в указанных условиях. Видно, что величина пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]фенилаланина ( $\text{M}^+$ ) 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 [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина уровень включения дейтерия в [ $^2\text{H}$ ]лейцин/[ $^2\text{H}$ ]изолейцин составил 50,0 ат.%, а в [ $^2\text{H}$ ]валин – 58,8 ат.%. Пик с  $m/z$  432, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]аминокислот КЖ на рис. 5 соответствует продукту дополнительного метилирования [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина по  $\alpha\text{-NH}_2$ - группе. Кроме этого, в масс-спектре фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина с  $m/z$  97 (вместо  $m/z$  с 91 в контроле), что указывает на то, что местами локализации 6 атомов дейтерия в молекуле [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина являются положения  $\text{C}_1\text{--C}_6$  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 [ $^2\text{H}$ ]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].

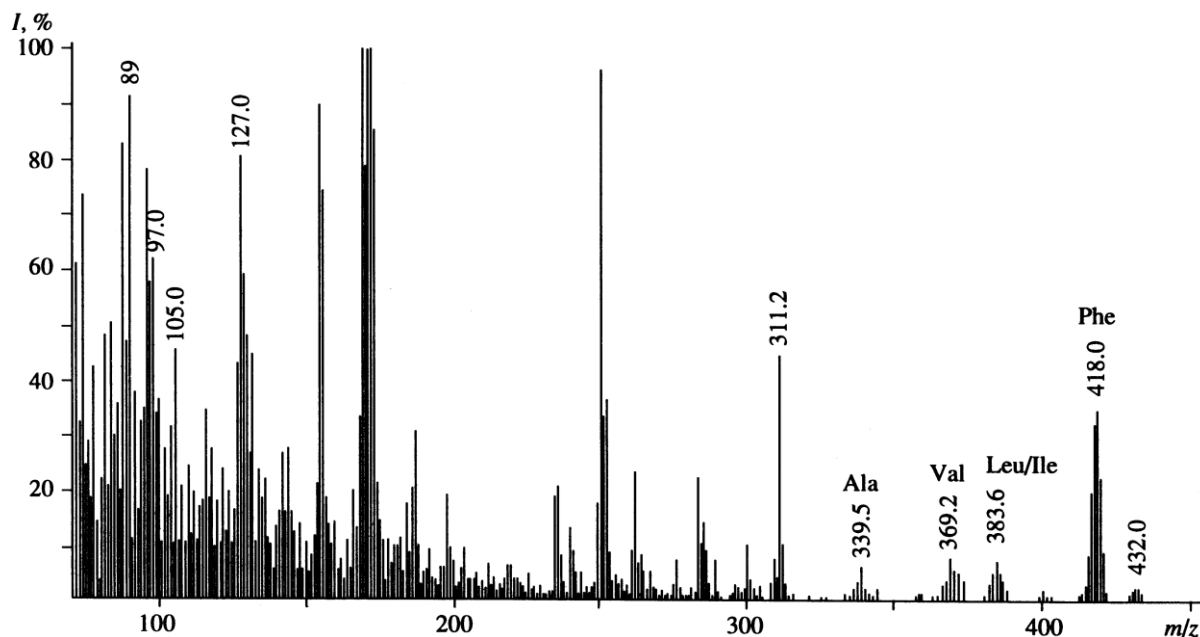


Рис. 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [ $^2\text{H}$ ]метанол и 98,0 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  (максимально дейтерированная среда)

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

Суммируя полученные данные по уровням включения  $^2\text{H}$ -и  $^{13}\text{C}$  в молекулы секретируемых аминокислот, можно сделать вывод о сохранении минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом лейцина и метаболически родственными 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.

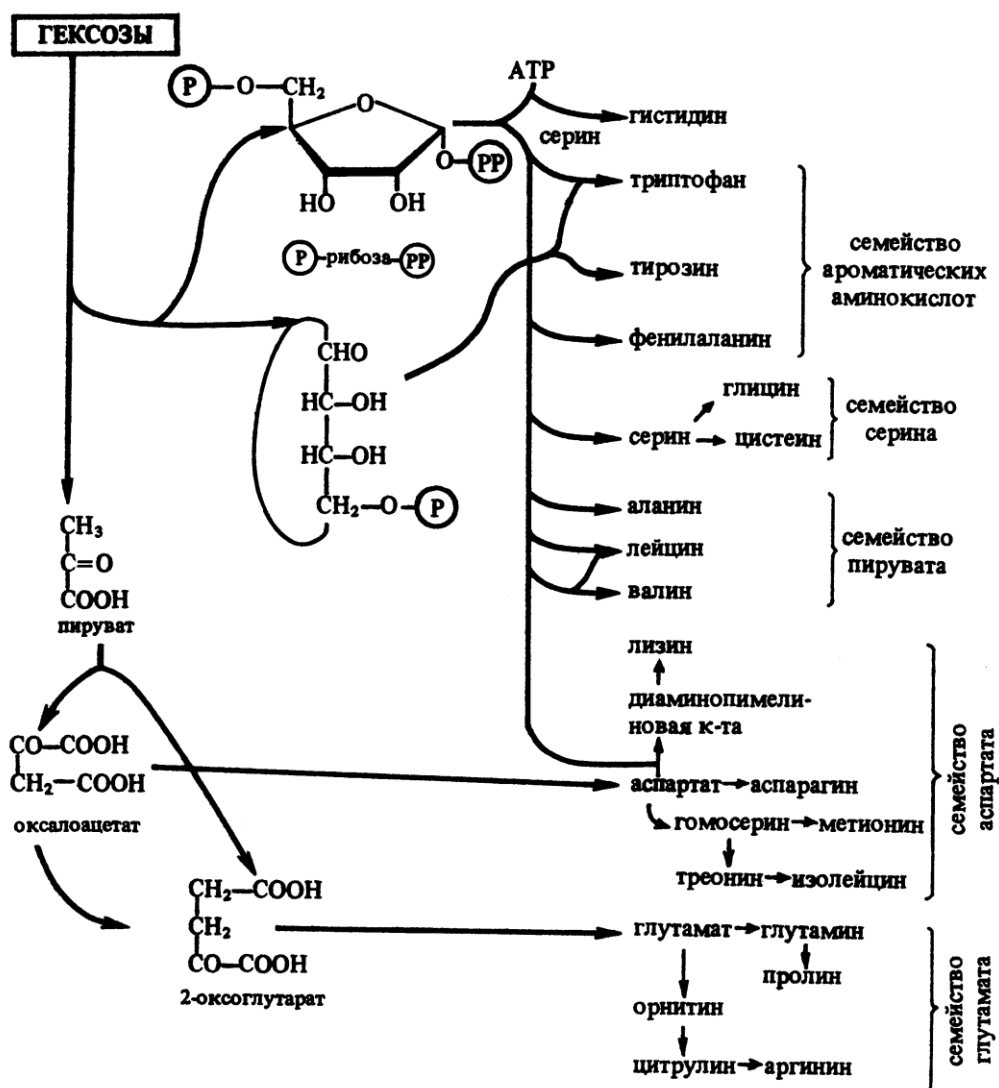


Рис. 6. Аминокислоты, необходимые для синтеза белков, образующиеся в клетке из предшественников (по Г. Шлегелю [27])

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-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот.

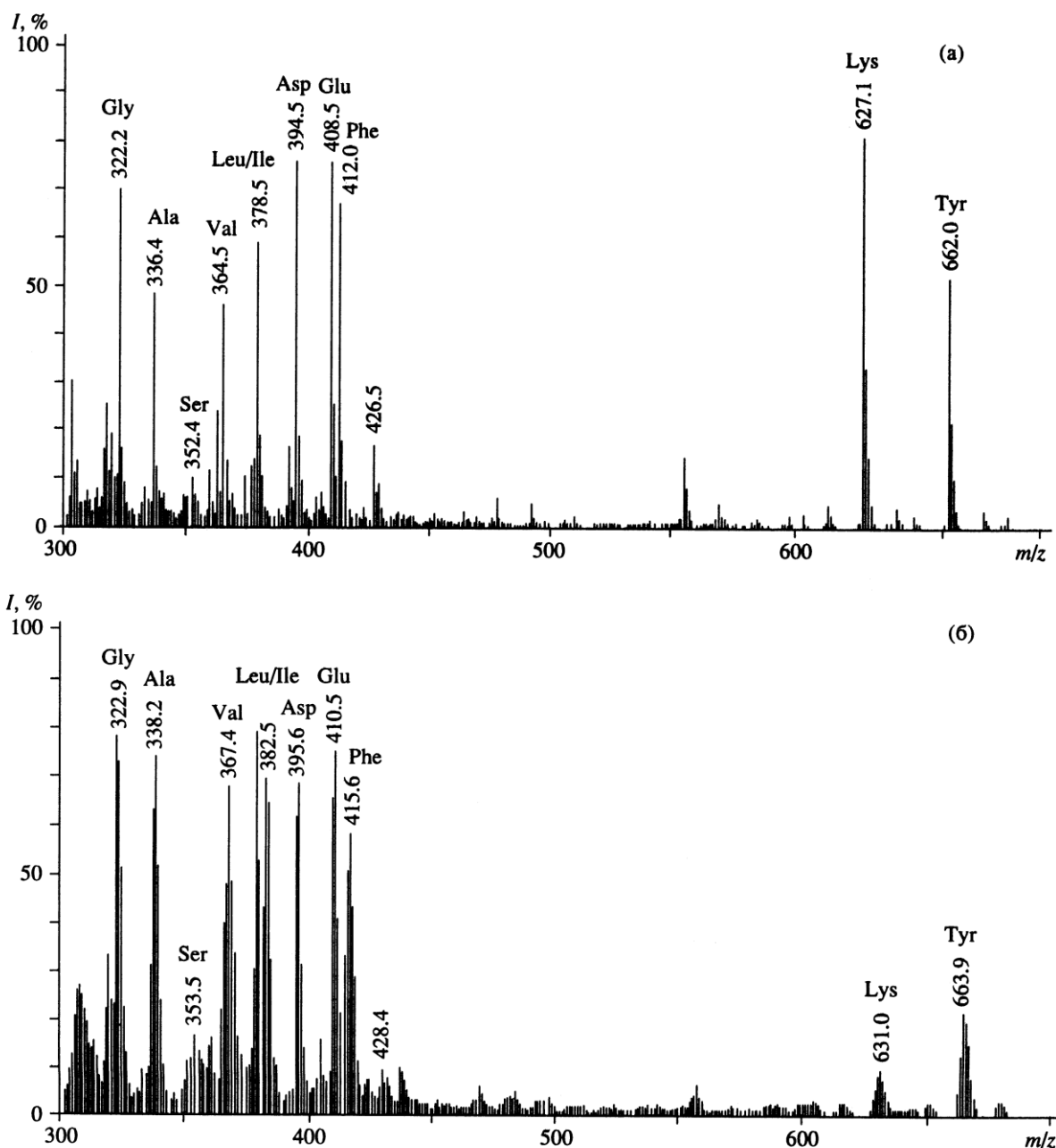


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]аминокислот из гидролизатов суммарных белков биомассы *B. methylicum* при выращивании в среде M9, содержащей 2 % метанол и  $\text{H}_2\text{O}$  (а) и 2 % [ $^2\text{H}$ ]метанол и 98,0 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  (б)

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

аминокислот. Что касается других [ $^2\text{H}$ ]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- $^2\text{H}$ производных аминокислот и метиловых эфиров их N-Dns- $^2\text{H}$ производных аминокислот и ионнообменной хроматографии, где детектируется уже 15 аминокислот (рис. 8, табл. 3).

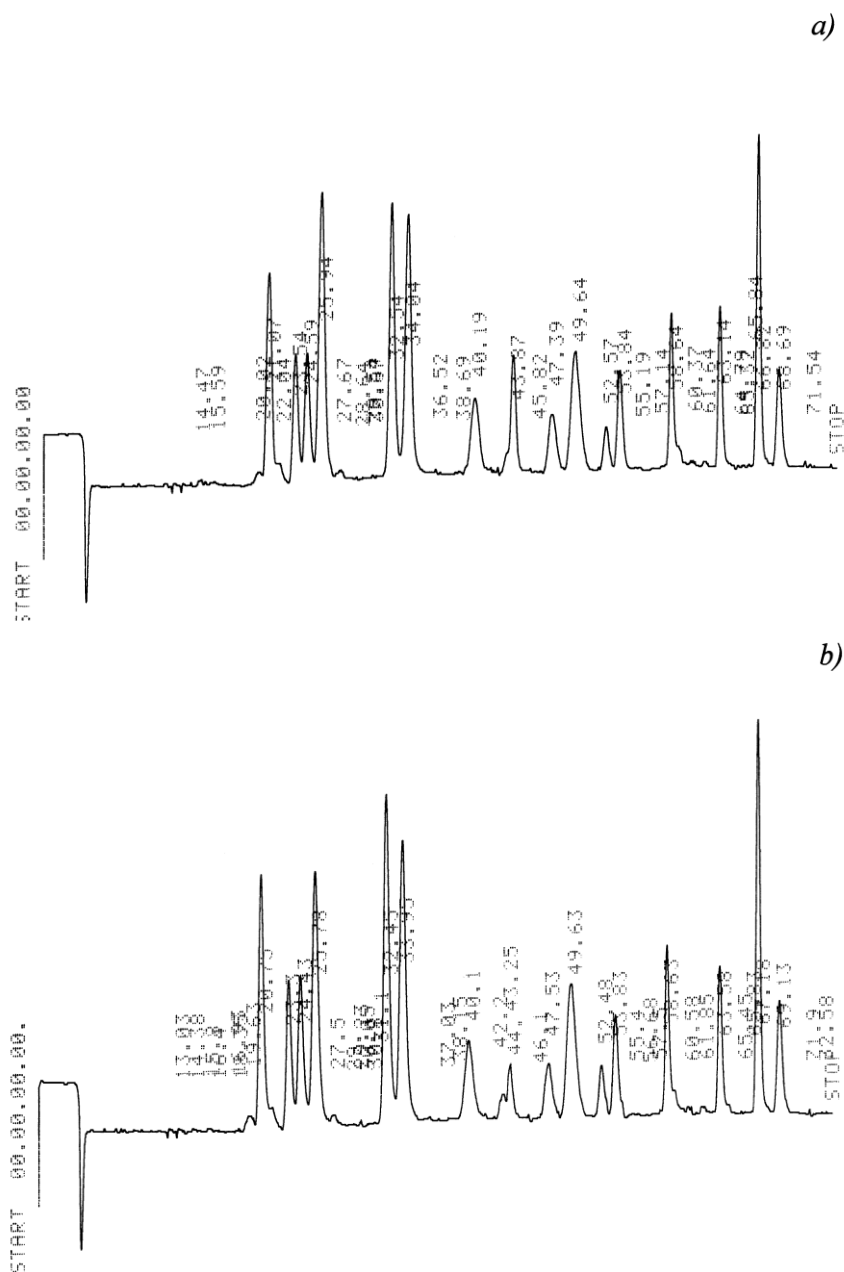


Рис. 8. Ионнообменная хроматография аминокислот, выделенных из гидролизатов протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток *B. methylicum* на максимально дейтерированной среде: Biotronic LC-5001 (230×3,2 mm) (“Eppendorf–Nethleler–Hinz”, Germany); подвижная фаза: UR-30 сульфонирующая стирольная смола (“Beckman–Spincso”, USA); 25  $\mu\text{m}$ ; 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 уровне 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% <sup>2</sup> H <sub>2</sub> 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 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и 2 % [<sup>2</sup>H]метанолом.

\*\* При подсчёте уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH<sub>2</sub> группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации и изотопного обмена в H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O

\*\*\* Проверк означает отсутствие данных.

Полученные данные свидетельствуют о возможности достижения максимальных уровней включения стабильных изотопов <sup>2</sup>H и <sup>13</sup>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 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (табл. 3). Как видно из табл. 3, при выращивании *V. methylicum* на среде с 98,0 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, уровни включения <sup>2</sup>H в остатки глицина, аланина, фенилаланина и тирозина составляют 90,0; 97,5; 95,0 и 92,8 %. В экспериментах по включению изотопа <sup>13</sup>C в суммарные белки биомассы за счёт ассимиляции [<sup>13</sup>C]метанола метилотрофными бактериями *M. flagellatum* также наблюдались высокие уровни изотопного включения в [<sup>13</sup>C]глицине (90,0 %), [<sup>13</sup>C]аланине (95,0 %) и [<sup>13</sup>C]фенилаланине (80,5 %) (табл. 2). Как и в случае с секретлируемыми аминокислотами, сниженные уровни включения стабильных изотопов в [<sup>13</sup>C]лейцине/изолейцине (49,0 %), а также в метаболически связанных с ним [<sup>13</sup>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 <sup>2</sup>H и <sup>13</sup>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 секретируемых 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- $^2\text{H}$ ]фенилаланин,  $L$ -[3,5- $^2\text{H}$ ]тирозин и  $L$ -[2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]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 [ $^2\text{H}$ ]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 [ $^2\text{H}$ ]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 [ $^2\text{H}$ ]тирозина два (96 ат.%  $^2\text{H}$ ), [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина – пять (90 ат.%  $^2\text{H}$ ) и [ $^2\text{H}$ ]триптофана – пять (98 ат.%  $^2\text{H}$ ) 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 [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина, [ $^2\text{H}$ ]тирозина и [ $^2\text{H}$ ]триптофана позволяют сделать вывод о высокой селективности включения [ $^2\text{H}$ ]ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина: дейтерий детектировался во всех остатках [ $^2\text{H}$ ]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  $^2\text{H}$ -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.

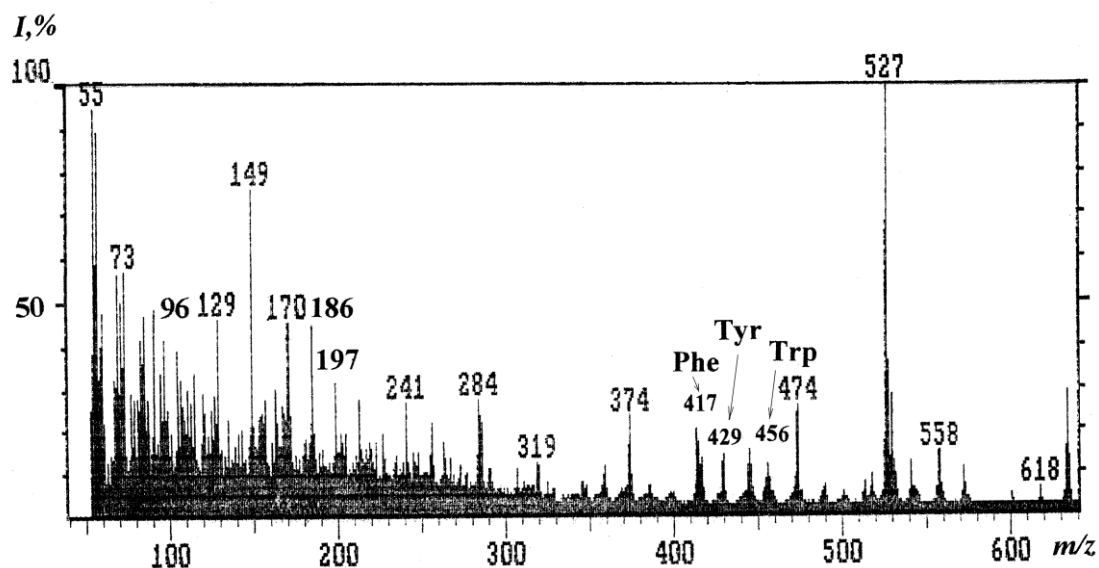


Рис. 8. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[ $^2\text{H}$ ]производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата бактериородопсина на синтетической среде с [ $2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$ ]Phe (0,26 г/л), [ $3,5\text{-}^2\text{H}_2$ ]Tyr (0,2 г/л) и [ $2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$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

Соединение	Величина пика ( $\text{M}^+$ )	Интенсивность, %	Количество атомов дейтерия*	Уровень дейтерирования, % 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 дейтерирования протоны (дейтероны) при COOH- и NH $_2$ -группах аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации и изотопного обмена в H $_2$ 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  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  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  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  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  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  // *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  $^{13}\text{C}$ -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  $^2\text{H}$ -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  $^{13}\text{C}$ 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 [ $^2\text{H}$ ]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. 29–39.
13. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of  $^2\text{H}$ -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. P. 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  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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  $^2\text{H}$ -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  $^2\text{H}$ -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  $^2\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  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  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  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  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$*  // *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  $^{13}\text{C}$ -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  $^2\text{H}$ -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 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> plus [<sup>13</sup>C]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 aromatičeskih aminokislot [2,3,4,5,6-2H<sub>5</sub>]Phe, [3,5-2H<sub>2</sub>]Tyr and [2,4,5,6,7-2H<sub>5</sub>]Trp // *Problemy biologičeskoj, medicinskoj i farmaceutičeskoj himii*. 2013. No 8. S. C. 29–39.

13. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of <sup>2</sup>H-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-<sup>2</sup>H]phenylalanine, [3,5-<sup>2</sup>H]tyrosine, and [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H]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 – istočniki izotopnomečenyh 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 <sup>2</sup>H-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-preobrazujuščij 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 <sup>2</sup>H-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  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченных аминокислот и белков различного уровня изотопного обогащения**<sup>1</sup> Олег Викторович Мосин<sup>2</sup> Игнат Игнатов<sup>3</sup> Дмитрий Анатольевич Складнев<sup>4</sup> Виталий Иванович Швец

<sup>1</sup> Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация

Старший научный сотрудник, канд. хим. наук

103316, Москва, ул. Талалихина, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария  
Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ)

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

<sup>3</sup> Государственный 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

<sup>4</sup> Московский государственный университет тонких химических технологий им.

М.В. Ломоносова, Российская Федерация

Академик РАН, доктор химических наук

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 ( $^2\text{H}$ ) и углерода-13 ( $^{13}\text{C}$ ) 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 [ $^2\text{H}$ ]метанол, [ $^{13}\text{C}$ ]метанол и  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Также осуществлено включение *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}$ ]фенилаланина, *L*-[3,5- $^2\text{H}$ ]тирозина и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]триптофана в трансмембранный белок бактериородопсин, синтезируемый фотоорганотрофной галобактерией *Halobacterium halobium ET 1001*. Для масс-спектрометрического анализа мультикомпонентные смеси  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченных аминокислот в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов (гидролиз в 6 М  $^2\text{HCl}$  (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 [ $^2\text{H}$ ]- и [ $^{13}\text{C}$ ]аминокислоты представляли собой смеси, различающиеся количеством включенных в молекулу изотопов. Уровни включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы секретируемых аминокислот и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы варьируют в зависимости от содержания  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченных 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-меченные аминокислоты; бактериородопсин.