



European Reviews of Chemical Research

Has been issued since 2014. ISSN 2312-7708
2014. Vol.(1). № 1. 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. 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 ПИ № 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
Founder and Editor: Academic Publishing House *Researcher*

Passed for printing 15.09.14.
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 № 101.

European Reviews of Chemical Research

2014

№ 1



Европейские обзоры химических исследований

Издается с 2014 г. ISSN 2312-7708
2014. № 1 (1). 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

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

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

Подписано в печать 15.09.14.

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 № 101.

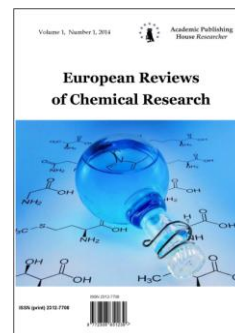
C O N T E N T S

Marat I. Abdullin, Azamat A. Basyrov, Sergey N. Nikolaev, Yuliya A. Koksharova, Nikolay V. Koltaev Defining the Conditions of 3D Printing Using Abs Plastic	4
Mohammad Asif Antimicrobial Potential of Nicotinic Acid Derivatives Against Various Pathogenic Microbes	10
Lili Janiashvili, Giuli Andronikashvili, Archil Varadashvili, Mzia Gagolishvili Heterofunctional Condensation of α, ω - Bis (Aminodimethylsilyl) Tetramethyl - Cyclodisilazanes With Dichloranhydride Tereftalic Acids and α, ω - Bis (β - Carboxyethyl) Dimethylsiloxanes	22
Mehmood A. Kalwar, Hakim A. Sahito, Barkat A. Kalwar, Madan Lal, Shahnawaz Fazlani Repellency and Antifeedant of Ticks Through Ethno Plant Extracts and Ivermectin on Buffalo Calves	27
Oleg Mosin, Ignat Ignatov, Dmitry Skladnev, Vitaly Shvets Microbiological Synthesis of ^2H - and ^{13}C -Labeled Amino Acids and Proteins With Various Levels of Isotopic Enrichment	36
Oleg Mosin, Ignat Ignatov Biosynthesis of ^2H -labeled Photochrome Trans-membrane Protein Bacteriorhodopsin by Halobacterium <i>Halobacterium Halobium</i>	60

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 1, No. 1, pp. 4-9, 2014

DOI: 10.13187/ejchr.2014.1.4
www.ejournal14.com



UDC 678.5.02

Defining the Conditions of 3D Printing Using Abs Plastic

- ¹ Marat I. Abdullin
² Azamat A. Basyrov
³ Sergey N. Nikolaev
⁴ Yuliya A. Koksharova
⁵ Nikolay V. Koltaev

¹⁻⁵ Bashkir State University, Russian Federation
450074, Ufa, Mingazheva St., 100
E-mail: ProfAMI@yandex.ru

Abstract

The article shows the possibility of printing materials using the 0809M ABS plastic. There have been determined the optimum temperature and feed rate of ABS filaments for obtaining prototypes of the highest quality. We have studied the physico-mechanical characteristics of the prototype, depending on the method of application of the polymeric material.

Keywords: 3D printing; 0809M ABS; three-dimensional prototyping; melt flow index; thermal stability; FDM.

Введение

Технология 3D печати является одной из наиболее бурно развивающихся технологий в современном мире [1-3]. Впервые появившись как инструмент для визуализации и прототипирования, 3D печать завоевывает все более обширные области приложения [4, 5]. Расширение области использования трехмерных прототипов в первую очередь связано с материалами, используемыми для печати, а также с физико-механическими характеристиками конечных прототипов [6]. Одним из наиболее перспективных видов трехмерного прототипирования признана технология FDM (fuseddepositionmodeling). Благодаря универсальности перерабатываемых материалов, возможности печати прототипов различной геометрии и доступности технология FDM является наиболее распространенной технологией 3D печати.

Целью данной работы являлось определение условий переработки АБС с использованием 3D принтера.

Экспериментальная часть

Использованные материалы: АБС-пластик марки 0809М, диаметр филамента 3 мм. Печать трехмерных прототипов осуществляли с использованием 3D принтера UnicBot.

Определение условий печати проводили на основании параметра заполняемости трехмерного прототипа, характеризующего отношение теоретического объема образца к реальному, и расчет которого проводили на основании следующей формулы:

$$W = \frac{V_P}{V_T} \cdot 100\% \quad \text{I)}$$

С учетом сложности определения реального объема образца, расчет заполняемости проводили с использованием отношений масс теоретического и реального образцов, с учетом плотности использованного образца АБС-пластика, равной 1,04 г/см³:

$$W = \frac{m_P}{m_T} \cdot 100\% \quad \text{II)}$$

На основе используемой формулы теоретическая масса модельного образца составляет 2,26г.

В качестве управляющей программы была использована программа Cugav.13.06.4[7]. В качестве тестовой модели для определения оптимальных условий печати трехмерных прототипов был использован полый цилиндр следующей геометрии: высота 20 мм, диаметр 20 мм, толщина стенки 2 мм. Условия печати были выбраны следующие: толщина слоев 0,2 мм, температуры 220–250°C, скорость подачи филамента 0,1 до 0,26 см³/мин.

Реологические свойства полимеров изучали методом капиллярной вискозиметрии на приборе ИИРТ в интервале температур 200–250°C при нагрузке 49Н. Показатель текучести расплава ПТР (г/10мин) вычисляли по формуле [8, 9]:

где m – масса расчётного отрезка экструдированного полимера, г;

t – время истечения полимера, с.

Для изучения термодеструкции применяли метод динамической ТГА в сочетании с ДТА и ДГГ. Динамическую ТГА проводили на дериватографе MettlerToledo TGA/DSC в

$$ПТР = \frac{600 \cdot m}{t} ,$$

интервале температур от 20 до 600 °С в атмосфере азота при одновременном удалении газообразных продуктов деструкции. Величина навески составляла 5,5±0,1 мг, скорость подъема температуры 5–20 °С/мин.

Обсуждение результатов

Наиболее распространенным полимером для 3D печати является АБС-пластик марки 0809М, однако вопрос об оптимальных условиях переработки данного полимера во многом остается открытым вследствие ограниченности литературных данных. Кроме того, сложность определения условий печати полимером определяется во многом отсутствием универсальности использованных входных параметров для печати, а именно скорости подачи и температуры переработки полимерного материала.

Температурное технологическое окно для переработки полимера, характеризующего интервал температур, при котором возможна переработка полимера, определяется в нижней границе текучестью полимерной системы, в верхней границе – деструкцией полимера при переработке. Так нижняя граница технологического окна может быть выявлена путем определения ПТР полимера при различных температурах. Экспериментальные данные свидетельствуют: АБС марки 0809М проявляет заметную текучесть при температуре выше 220°C, тогда как при температуре ниже 220°C показатель текучести расплава характеризуется значением ниже 5 г/10 мин. Известно, что переработка термопластов методом экструзии может быть эффективно произведена лишь в том случае, если вязкость расплава полимера в условиях переработки находится в интервале 10²÷10⁴Па·с (табл. 1). Данному условию удовлетворяет расплавы АБС-пластика при температуре выше 220°C. Таким образом, нижняя технологическая зона переработки АБС марки 0809М с использованием 3D принтера может быть осуществлена при температуре расплава выше 220°C.

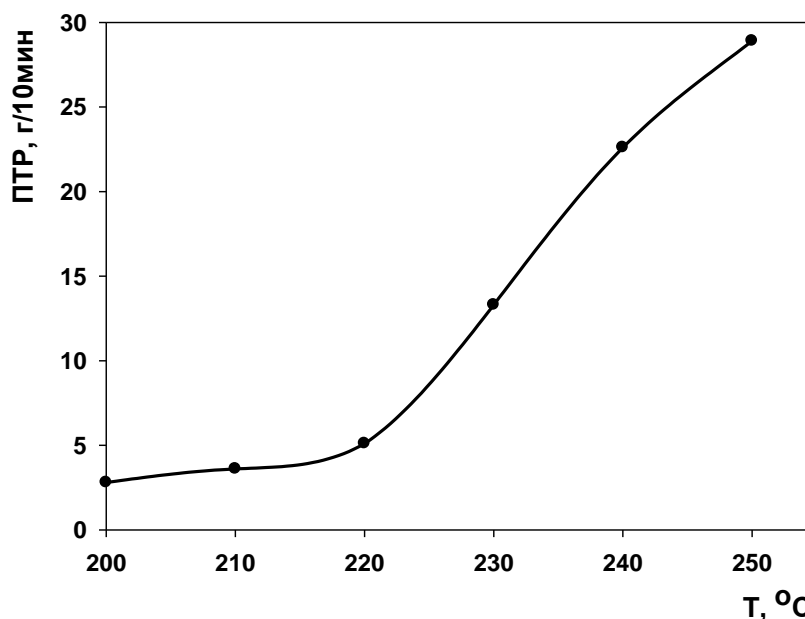


Рис. 1. Зависимость ПТР АБС марки 0809М от температуры.

Таблица 1

Реологические характеристики АБС марки 0809М

№	Т, °С	ПТР, г/10мин	η , Па×с	$\lg\eta$
1	200	2,8	27738	4,44
2	210	3,6	21574	4,33
3	220	5,1	15229	4,18
4	230	13,3	5840	3,77
5	240	22,6	3437	3,54
6	250	28,9	2687	3,43

При переработке термопластов методом экструзии из расплава верхний предел технологической температуры в экструдере определяется термальной стабильностью полимера. Термическое разложение АБС характеризовали с использованием термогравиметрического анализа. АБС-пластик в условиях анализа демонстрировал высокую термическую стабильность. Начало термической деструкции отмечалось при температуре выше 240-250°С (рис. 2), при этом максимальная степень термической деструкции отмечалась при температуре 410°С. Исходя из данных термогравиметрического анализа, максимальная температура переработки АБС-пластика составляет 250°С. Таким образом, переработка АБС-пластика может быть осуществлена в довольно узком технологическом окне от 220 до 250°С.

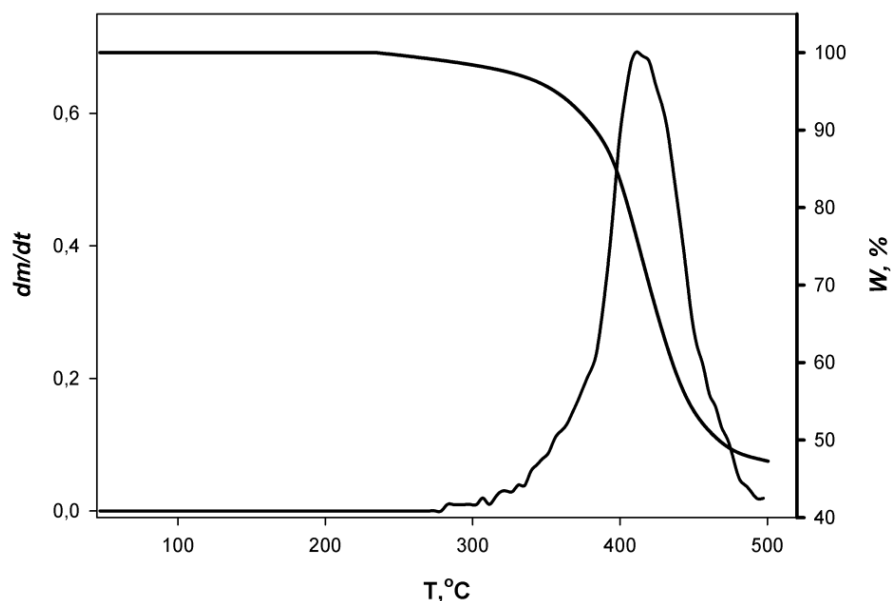


Рис. 2. Термограмма АБС марки 0809М (10°С/мин, 5,5 мг)

Установлено, что оптимальная область печати характеризуется достаточно узким интервалом в диапазоне заполнения тестовой модели 100 ± 5 % (рис. 3). При степени заполнения прототипа с использованием АБС-пластика >105 % наблюдается образование облоя на поверхности модели. Тогда как при степени заполнения прототипа менее 95 % наблюдается образование пропусков печатных слоев, что в свою очередь приводит к ухудшению физико-механических и эстетических характеристик конечных прототипов.



Рис. 3. Различная степень заполнения тестовой модели на основе АБС 0809М:
1 – $<95\%$; 2 – $\geq 105\%$

Экспериментальные данные свидетельствуют, что с увеличением скорости подачи филамента степень заполнения модельного образца закономерно увеличивается. При этом наблюдается практически линейный рост заполняемости образца, так при увеличении скорости подачи филамента от 0,1 до 0,27 см³/мин (240°С) степень заполняемости увеличивается от 78 до 113 % (рис. 4., кр.3). Данное явление объясняется тем, что с ростом подачи филамента увеличивается объемный выход полимера, и соответственно количество полимера, подаваемого по траектории движения печатной головки 3D принтера.

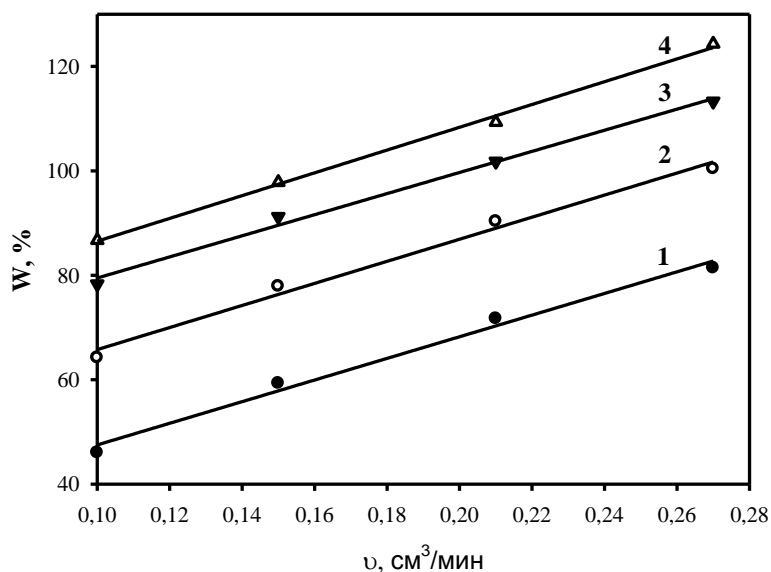


Рис. 4. Зависимость степени заполнения тестовой модели от скорости подачи полимерного филамента и температуры, °С: 1 – 220; 2- 230; 3 – 240; 4 – 250

Экспериментальные данные свидетельствуют, что печать трехмерных прототипов при температуре ниже 220°C практически неосуществима по причине низкой текучести при данной температуре АБС-пластика. Переработка АБС-пластика при температуре выше 250°C приводит к деструкции полимера, что в частности выражается в образовании газовых включений в состав полимера, переработанного с помощью экструдера на 3D принтере.

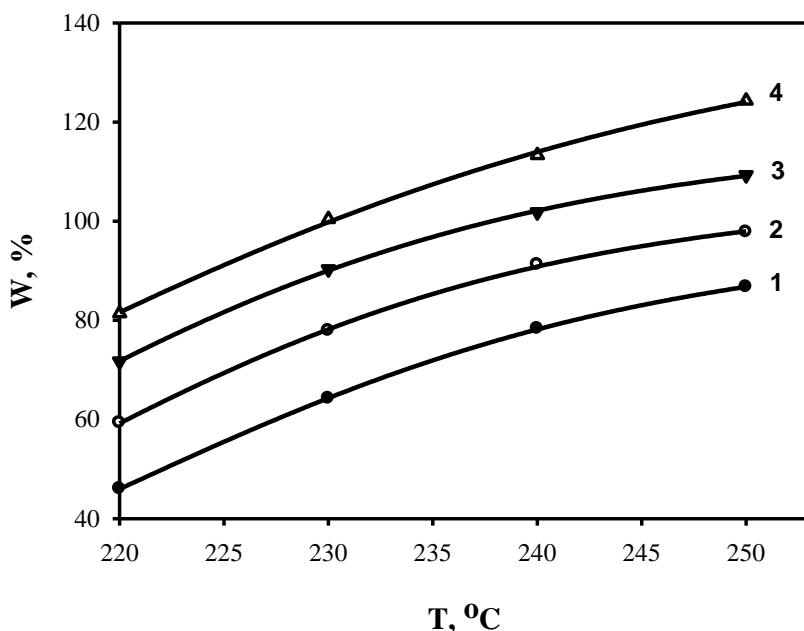


Рис. 5. Зависимость степени заполнения тестовой модели от температуры скорости подачи полимерного филамента, см³/мин: 1 – 0,1; 2- 0,15; 3 – 0,21; 4 – 0,27

Заключение

Таким образом, определены оптимальные условия печати трехмерных прототипов с использованием технологии 3D печати АБС-пластиком марки 0809М. Установлено, что

трехмерные прототипы с наиболее высокими эстетическими характеристикам могут быть получены при степени заполнения прототипа 100 ± 5 %. Данная степень заполнения может быть достигнута в достаточно узком интервале температур 220-250°C и скорости подачи филамента 0,1–0,27 см³/мин.

Примечания:

1. http://www.wipo.int/wipo_magazine/en/2013/02/article_0004.html; дата обращения 20.02.2014.
2. <http://www.explainingthefuture.com/3dprinting.html>; дата обращения 20.02.2014.
3. http://www.meti.go.jp/english/publications/pdf/journal2013_08a.pdf; дата обращения 20.02.2014.
4. <http://www.3ders.org/applications.html>; дата обращения 20.02.2014.
5. <http://3dprintingindustry.com/3dp-applications/>; дата обращения 20.02.2014.
6. <http://www.3ders.org/3d-printing-materials.html>; дата обращения 20.02.2014.
7. <http://software.ultimaker.com/>; дата обращения 20.02.2014.
8. Лапутько В.Н. и др. Пласт. Массы. №3. 1994. С. 31.
9. Калинин Э.Л., Саковцева М.Б. Свойства и переработка термопластов. Л.: Химия, 1983.

References:

1. http://www.wipo.int/wipo_magazine/en/2013/02/article_0004.html; data obrashcheniya 20.02.2014.
2. <http://www.explainingthefuture.com/3dprinting.html>; data obrashcheniya 20.02.2014.
3. http://www.meti.go.jp/english/publications/pdf/journal2013_08a.pdf; data obrashcheniya 20.02.2014.
4. <http://www.3ders.org/applications.html>; data obrashcheniya 20.02.2014.
5. <http://3dprintingindustry.com/3dp-applications/>; data obrashcheniya 20.02.2014.
6. <http://www.3ders.org/3d-printing-materials.html>; data obrashcheniya 20.02.2014.
7. <http://software.ultimaker.com/>; data obrashcheniya 20.02.2014.
8. Laput'ko V.N. i dr. Plast. massy. №3. 1994. S. 31.
9. Kalinchev E.L., Sakovtseva M.B. Svoistva i pererabotka termoplastov. L.: Khimiya, 1983.

УДК 678.5.02

Определение условий 3D печати АБС пластиком

¹Марат Ибрагимович Абдуллин

²Азамат Айратович Басыров

³Сергей Николаевич Николаев

⁴Юлия Александровна Кокшарова

⁵Николай Владимирович Колтаев

¹⁻⁵ Башкирский государственный университет, Российская Федерация
450074, г. Уфа, ул. Мингажева, 100
E-mail: ProfAMI@yandex.ru

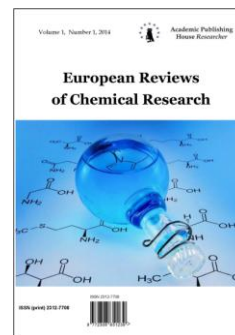
Аннотация. Показана возможность печати материалов с использованием АБС-пластика марки 0809М. Определены оптимальная температура и скорость подачи филаментов АБС для получения прототипов наиболее высокого качества. Изучены физико-механические характеристики прототипов в зависимости от способа наложения полимерного материала.

Ключевые слова: 3D печать; АБС 0809М; трехмерное прототипирование; показатель текучести; термостабильность; FDM.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 1, No. 1, pp. 10-21, 2014

DOI: 10.13187/ejchr.2014.1.10
www.ejournal14.com



UDC 54

Antimicrobial Potential of Nicotinic Acid Derivatives Against Various Pathogenic Microbes

Mohammad Asif

Department of Pharmacy, Guru Ram Das (PG) Institute of Management and Technology, Dehradun, (UK), 248009, India
Email: asif321@gmail.com

Abstract

Many human illnesses are caused by infections with microbes like viruses or bacteria or fungi. Amongst those various illnesses, certain tubercular, bacterial, viral and fungal infections are more common because of their tendency to develop new strains under any circumstances and developing resistance against the available drugs. This stimulated the scientists for development of novel molecules to combat these illnesses. Several nicotinic derivatives were evaluated for their antibacterial activity against tuberculosis. This review summarized the facts concerning nicotinic acid analogues. The nicotinic acid moiety of nicotinic acid has been introduced in a number of compounds with antimicrobial activity against various pathogens as well as resistant strains. Several nicotinic acid analogues have shown good antimicrobial activity. Therefore this class of compounds could be a good starting point to develop new lead compounds in the treatment of multi-drug resistant bacteria.

Keywords: Anti-bacterial; anti-fungal; nicotinic acid derivatives; multidrug-resistance.

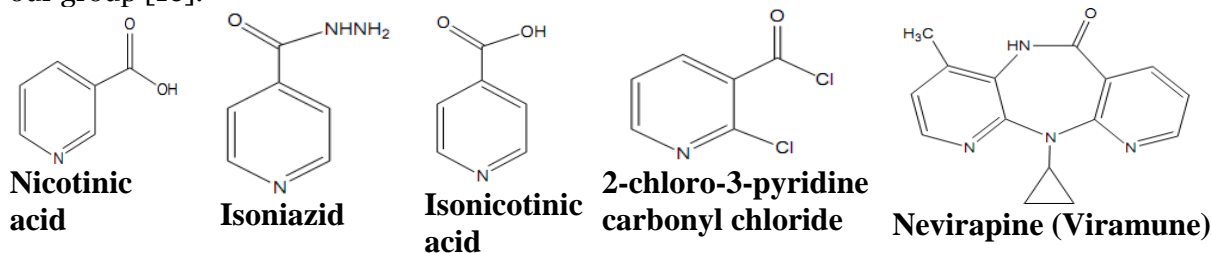
Introduction

Infectious microbial diseases remain a pressing problem worldwide, because microbes have resisted prophylaxis or therapy longer than any other form of life. In world up to 5% of all the infections are caused by fungi. Fungal infections in such a high risk patients progress rapidly and are difficult to diagnose and treat. Infectious diseases caused by bacteria have increased dramatically in recent years. In spite of many significant advances in antibacterial therapy, the widespread use and misuse of antibiotics have caused the emergence of bacterial resistance to antibiotics, which is a serious threat to public health. In particular, the emergence of multidrug resistant (MDR) gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *S. aureus*, and vancomycin-resistant Enterococci has become a serious problem in the treatment of bacterial diseases [1]. Therefore, the development of new compounds to deal with resistant bacteria has become one of the most important areas of antibacterial research today. Tuberculosis (TB) is an important health problem worldwide particularly in people infected with HIV virus. Other causes that increasing TB cases are MDR, resulting from inconsistent or partial treatment, and the lack of new drugs in the market [2]. Because of these problems, TB is a global health emergency. This contagious disease is caused by the *Mycobacterium tuberculosis*. One third of the world's population is infected by the TB bacterium and each year this disease affects around 8 million people and kills almost 3 million people [3]. At present, the treatment

against TB involves 3 or 4 different kinds of anti-TB drugs. These drugs usually are isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol. Multiple combinations are necessary to prevent the emergence of MDR organisms, which would lead to treatment failure [4, 5]. In spite of TB being a global health problem, about 40 years have past since a new drug was introduced into the market. Consequently, the development of new drugs with fewer toxic side effects, improved pharmacokinetics properties, potent activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including resistant strains, is urgently needed [6-9].

Nicotinic acids have proven to play a significant role in the synthesis of novel drug candidates with the use of different functional groups. Recently a series of Nicotinic acid derivatives have demonstrated significant antimicrobial activity. These compounds were screened for their wide range of biological activities, anti-TB activity against *M. tuberculosis*, antimicrobial activities against various bacteria, fungi, and yeast species. In addition, nicotinamide and nicotinic acid have been in use for 65 years due to their unusual antimicrobial spectrum. Many drugs possess modified pharmacological and toxicological properties when administered in form of metallic complexes [10-12]. In view of this it was interesting to synthesize several new compounds to evaluate the effect of amino acids on the bioactivity of both benzoic acid hydrazide and nicotinic acid hydrazide. The effect of metals such as Cu and Cd on the antibacterial activity of these compounds, thus both hydrazide ligands and complexes were tested for their antibacterial and antifungal activity.

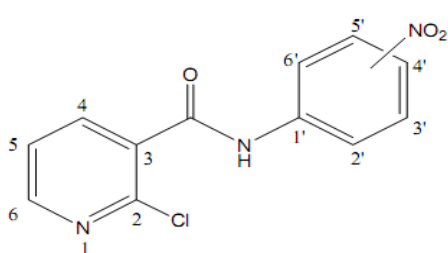
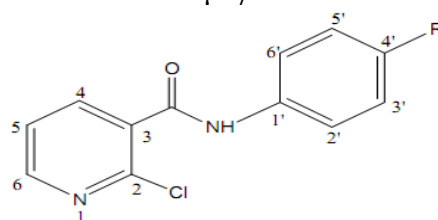
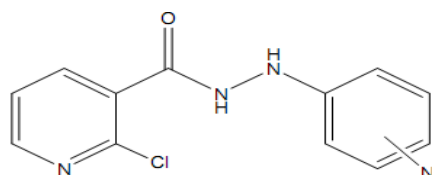
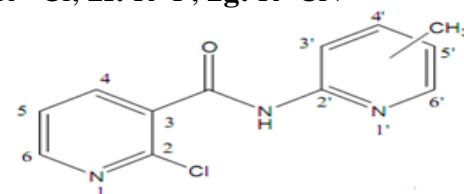
The pyridine nucleus is an important heteroaromatic class of compounds with a wide range of activities and it is present in many products such as drugs, vitamins, food, flavorings, plants, dyes, rubber products, adhesives, insecticides and herbicides [13]. In this context, nicotinic acid (pyridine-3-carboxylic acid), also known as niacin and vitamin B3, is found in various plants and animals and has vital roles in such biological processes as production of energy, signal transduction, regulation of gene expression and synthesis of fatty acids, cholesterol and steroids. Nicotinic acid derivatives and its isomers have also been investigated as an agent for the prevention or delay of the onset of type 1 diabetes mellitus. They also have anti-bacterial, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activities, and have putative activity against osteoarthritis and granuloma annulare. For example, it can be mentioned the importance of anti-tuberculosis first-line drug Isoniazid [14], which is an analogue of isonicotinic acid, an isomer of nicotinic acid. Nicotinic acid derivatives are also an important start material for the preparation of other biological activity compounds. Considering that, 2-chloro-3-pyridine carbonyl chloride is a useful intermediate for preparation of Nevirapine (Viramune), a valuable anti-AIDS drug [15]. Due to the importance of nicotinic acid derivatives and its isomers, the aim of this article is to evaluate the *in vitro* antibacterial activity against *M. tuberculosis* of several compounds of this class synthesized by our group [16].



A drug may be classified by the chemical type of the active ingredient or by the way it is used to treat a particular condition. Each drug can be classified into one or more drug classes. Nicotinic acid derivatives are highly specific antibacterial agents. Nicotinic acid derivatives are used for the treatment of microbial infections, as results in the rapid development of resistance. The substituted nicotinic acid is among the various heterocycles that have received most attention during last three decades as potential biomolecules. Nicotinic acid derivatives exhibit antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities. This pyridine congeners are associated with different biological properties like pesticidal, insecticidal and antifungal activities. Large quantity of nicotinic acid derivatives was equipped for their anti-microbial activities. In prolongation we planned to synthesis some new nicotinic acid derivatives with different substituted groups or atoms and different heterocycle moiety. With the emergence and raise of microbial organisms dead set against to manifold anti-biotic, and the long-lasting emphasis on healthcare costs, many researchers have tried to expand new, valuable anti-microbial reagents free of resistant and cost [17].

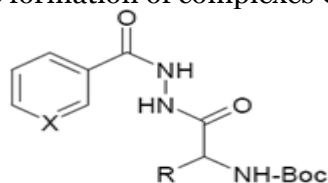
Nitro nicotinic derivatives:

The reaction between 2-chloro-3-pyridinecarbonylchloride and nitro anilines or nitro phenylhydrazines, leading to the compounds **1a-c**, **2a-g**, **3a-c**, and **4a-d** [18-20]. The *N*-nitro-2-chloronicotinamides, as well others *N*-aryl-2-chloronicotinamides were evaluated for their *in vitro* antibacterial activity against *M. tuberculosis* using the Alamar Blue (MABA) susceptibility test and the activity expressed as the MIC in mg/mL. However, none of the compounds above mentioned were active. The 1-(2-chloronicotinoyl)-2-(nitrophenyl) hydrazines **3a-c** were evaluated for their *in vitro* antibacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv using the Alamar Blue susceptibility test and the activity expressed as the MIC in $\mu\text{g/mL}$. However, none of the compounds above mentioned were active. The compounds **4a-d** were evaluated for their *in vitro* antibacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv using the MABA test and the activity expressed as the MIC in $\mu\text{g/mL}$. However, none of the compounds above mentioned were active. The anti-TB activities of compounds **1a-c**; **2a-g**; **3a-c**; **4a-d** were assessed against *Mtb* using the micro plate Alamar Blue assay (MABA). A serial dilution of the compounds **1a-c**; **2a-g**; **3a-c** and **4a-d** were made directly on the plate. The final drug concentrations tested were 0.01 to 20.0 $\mu\text{L/mL}$.

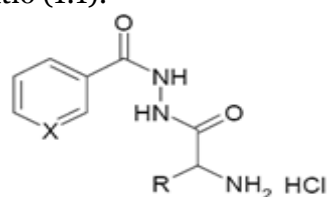
**1a:** o-nitro; **1b:** m-nitro; **1c:** p-nitro**2a:** R=H; **2b:** R=OMe; **2c:** R= Br; **2d:** R=I; **2e:** R= Cl; **2f:** R=F; **2g:** R=CN**3a:** o-nitro; **3b:** m-nitro; **3c:** p-nitro**4a:** 3'-methyl; **4b:** 4'-methyl; **4c:** 5'-methyl; **4d:** 6'-methyl

The coupling reaction of benzoic acid and nicotinic acid hydrazides with N protected L-amino acids including valine, leucine, phenylalanine, glutamic acid and tyrosine is reported. The target compounds, N-Boc-amino acid-(N`-benzoyl)- and NBoc (or *t*-butyloxycarbonyl)-amino acid-(N`-nicotinoyl) hydrazides **5a-5e** and **6a-6e** were prepared and purity using N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethylene]-N-methyl-methanaminium hexafluorophosphate N-oxide (HATU) as coupling reagent. The antimicrobial activity of the Cu and Cd complexes of the designed compounds was tested. The products were deprotected affording the corresponding amino acid-(N`-benzoyl) hydrazide hydrochloride salts (**7a-7e**) and amino acid-(N`-nicotinoyl) hydrazide hydrochloride salts (**8a-8e**). These compounds and their Cu and Cd complexes were also tested for their antimicrobial activity. Several compounds showed comparable activity to that of ampicillin against *S. aureus* and *E. coli* [21]. The reaction of benzoic acid hydrazide (**3**) with different N-Boc-L-amino acids in dimethylformamide in the presence of triethylamine (Et_3N) as a base and N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-yl-methyl-ene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide (HATU) as coupling reagent at 0°C gave the compounds **5a-5e**. Similarly, nicotinic acid hydrazide was reacted with the same N-Boc-L-amino acids to give the compounds **6a-6e**. Compounds **5** and **6** were subjected to N-deprotection. The latter series upon deprotection of Boc group afforded the new series of compounds **7** and **8**. Compounds **5**, **6**, **7** and **8** were allowed to undergo complexation with Cu and Cd. All complexes were obtained by reacting one equivalent of the ligands **5**, **6**, **7** or **8** once with 2 equivalents of $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ and once with 2 equivalents of $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in methanol. The Cu and Cd complexes were later decomposed and their Cu and Cd contents were analyzed by atomic absorption to

determine the ratio of complex formation of Cu and Cd to ligand. The atomic absorption analysis showed the formation of complexes Cu:L and Cd:L in the ratio (1:1).



X = CH; **5**; X = N; **6**



X = CH; **7**; X = N; **8**

a, R = CH(CH₃)₂; **b**, R = CH₂-CH₂-COOBn; **c**, R = CH₂-CH(CH₃)₂; **d**, R = CH₂-Ph; **e**, R = CH₂-[4-(OBn)C₆H₄].

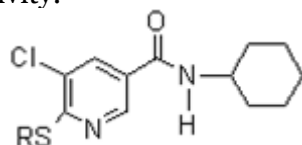
The compounds **5**, **6**, **7** and **8** and their **Cu** and **Cd** complexes have been evaluated for their antimicrobial activity. The MIC values listed in Table 1 show that all the test compounds have lower antifungal activity than clotrimazole.

Table 1: Minimal inhibitory concentration (MIC) of test compounds in µg/mL

Compound	E. coli	S. aureus	C. albicans	Compound	E. coli	S. aureus	C. albicans
Ampicillin	25	12.5	-----	(Cu:L),(1:1) of 6e	100	12.5	200
Clotrimazole	-----	-----	12.5	(Cd:L),(1:1) of 5a	100	>200	>200
5a	>200	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 5b	>200	25	>200
5b	>200	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 5c	>200	>200	>200
5c	100	100	>200	(Cd:L),(1:1) of 5d	>200	25	>200
5d	50	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 5e	>200	>200	>200
5e	>200	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 6a	>200	>200	>200
6a	>200	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 6b	>200	100	>200
6b	100	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 6c	100	>200	>200
6c	50	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 6d	>200	>200	>200
6d	100	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 6e	100	>200	>200
6e	50	>200	>200	(Cu:L),(1:1) of 7a	>200	>200	>200
7a	100	100	>200	(Cu:L),(1:1) of 7b	>200	>200	>200
7b	25	>200	>200	(Cu:L),(1:1) of 7c	>200	100	>200
7c	100	50	>200	(Cu:L),(1:1) of 7d	>200	50	>200
7d	100	>200	>200	(Cu:L),(1:1) of 7e	>200	50	>200
7e	200	50	>200	(Cu:L),(1:1) of 8a	>200	>200	>200
8a	25	>200	>200	(Cu:L),(1:1) of 8b	>200	>200	>200
8b	100	100	>200	(Cu:L),(1:1) of 8c	>200	>200	>200
8c	50	>200	>200	(Cu:L),(1:1) of 8d	100	>200	>200
8d	100	100	>200	(Cu:L),(1:1) of 8e	>200	100	>200
8e	50	100	>200	(Cd:L),(1:1) of 7a	100	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 5a	200	100	>200	(Cd:L),(1:1) of 7b	>200	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 5b	>200	>200	100	(Cd:L),(1:1) of 7c	100	12.5	>200
(Cu:L),(1:1) of 5c	100	50	>200	(Cd:L),(1:1) of 7d	50	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 5d	>200	50	>200	(Cd:L),(1:1) of 7e	>200	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 5e	200	25	>200	(Cd:L),(1:1) of 8a	>200	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 6a	>200	100	>200	(Cd:L),(1:1) of 8b	100	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 6b	>200	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 8c	>200	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 6c	>200	>200	>200	(Cd:L),(1:1) of 8d	100	>200	>200
(Cu:L),(1:1) of 6d	200	100	>200	(Cd:L),(1:1) of 8e	>200	>200	>200

The test compounds are more active against *S. aureus* and *E. coli*. Compounds **(Cu:L),(1:1)** of **6e** and **(Cd:L),(1:1)** of **7c** have antimicrobial activity against *S. aureus* comparable to that of

ampicillin, while the activity of compounds **(Cu:L),(1:1)** of **5e**, **(Cd:L),(1:1)** of **5b** and **(Cd:L),(1:1)** of **5d** is about 50% of that of ampicillin. Compounds **7b** and **8a** have antimicrobial activity against *E. coli* comparable to that of ampicillin, while the activity of compounds **5d**, **6c**, **6e**, **8c**, **8e**, **(Cd:L),(1:1)** of **7d** is about 50% of that of ampicillin. The utilized test organisms were: *E. coli* as an example of Gram-negative bacteria, *S. aureus* as an example of Gram-positive bacteria and *C. albicans* as yeast-like fungi. Ampicillin trihydrate and clotrimazole were used as standard antibacterial and antifungal agents, respectively. Solutions of the test compounds, ampicillin trihydrate and clotrimazole were prepared in DMSO to a concentration of 1600 µg/mL. Two fold dilutions of the compounds were prepared (800, 400 to 6.25µg/mL). Microorganism suspensions at 10⁶ CFU/mL (Colony Forming Unit/mL) concentrations were inoculated to the corresponding wells. At the end of the incubation period, the MIC were determined [21]. The 5-chloro-N-cyclohexyl-6-thio substituted-nicotinamide derivatives (**9a-h**) has been performed against gram positive and gram-negative bacteria. The compound **9c** has found excellent antibacterial activity [22]. The 5,6-dichloro nicotinoyl chloride was treated with cyclohexylamine. The antibacterial activity of all the compounds (**9a-h**) has been performed against gram positive and gram-negative bacteria. Test solution and streptomycin having concentration 40 mg/ml and 20 mg/ml were prepared in DMF. The inhibition zone for each test solution was measured in mm. The compounds were tested for their antibacterial activity against *E. Coli*, *S.Typhi*, *Streptococcus mutans* and *S. aureus* using streptomycin as standard drug. The biological activity of these compounds have been evaluated by filter paper disc method. The zone of inhibition are presented in Table 2. Compound **9c** were found to be more active against *S. aureus*, *S. mutans* *E. coli*. The compound **9c** is found to be more active against *S. aureus*, *E. coli* and *S. mutants*. The influence of methyl group in 4th position of thiazole ring of compound **9c** showed good activity compared to other synthesized compounds. From this it can be concluded that the methyl group at 4th position may be responsible for good antibacterial activity.

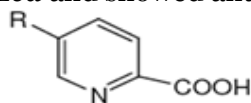
**9a-h****Table 2:** Antibacterial activity of 5-Chloro-N-Cyclohexyl-6-thio substituted nicotinamide derivatives 9a-9h

Compound	R	Concentration (mg/ml)	Zone of Inhibition in mm*			
			Gram +ve		Gram -ve	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>
9a		20	11	10	11	-
		40	11	15	12	15
9b		20	10	10	10	18
		40	14	12	12	23
9c		20	16	15	18	-
		40	22	15	22	23
9d		20	10	10	8	10
		40	--	10	11	12
9e		20	10	12	12	10
		40	12	16	15	12
9f		20	11	14	12	13
		40	12	15	14	15
9g		20	13	10	12	11

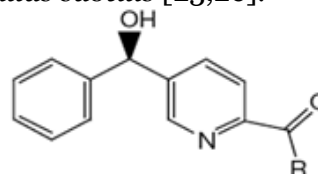
		40	14	12	13	13
9h		20	10	12	11	10
		40	11	13	12	11
Streptomycin		20	18	18	16	16
		40	---	22	20	22

* Average of three determinations

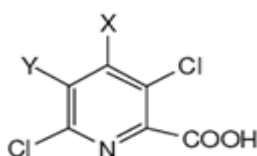
Vertilecanin C, a natural product and [methyl 2-(3-benzoylpicolinamido)acetate], 2 new phenyl-substituted derivatives of vertilecanin A were synthesized. Vertilecanin A type phenopicolinic acid derivatives were synthesized starting from nicotinic acid [23]. Picolinic acid and its derivatives are known as important organic compounds for humans and animals. Picolinic acid (**10**) itself plays a significant role in carrying metal ions in the human body and in animals. Calcium, magnesium, and potassium salts of picolinic acid are used as food and beverage supplements to improve the nutritive capacity of food stuffs and beverages [24]. 5-Alkylpicolinic acids **11-14**, which are known as hypotensive agents, are reported to have strong inhibitory effects on dopamine β -hydroxylase. Phenopicolinic acid **15**, originally isolated from cultures of a *Paecilomyces* sp., is a dopamine β -hydroxylase inhibitor and shows antihypertensive activity. Halogen-containing picolinic acids **16, 17** have been widely used as herbicides in agriculture and are potential contaminants of ground water [25]. The need for new sources of environmentally friendly pesticides and fungi displaying a 'broad spectrum' of parasitic abilities has been increasing. Isolated 5 new fungal metabolites were vertilecanins **19-22**, from solid-substrate fermentation cultures of *Verticillium lecanii*. While **19-22** did not have insecticidal or antifungal activity, the most abundant component, vertilecanin A (**10**), displayed insecticidal activity against *Helicoverpa zea* and showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis* [23,26].



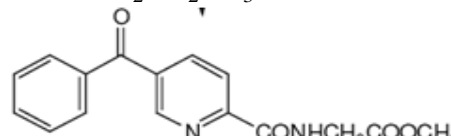
10 R=H, Picolinic acid; **11** R=CH₃; **12** R=C₂H₅; **13** R= iso-Propyl; **14** R= nButyl, fusaric acid; **15** R= p-Hydroxybenzyl, phenopicolinic acid



9 R=OH, Vertilecanin A; **10** R=OCH₃; **11** R=NHCH₂CO₂H, Vertilecanin B; **12** R=NHCH₂CO₂CH₃

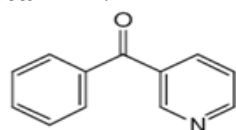


7 X=Y=H, Clopyralid; **8** X=NH₂, Y=Cl, Picloram

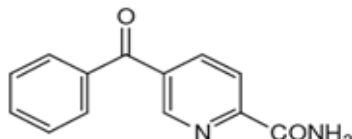


Vertilecanin C (**13**)

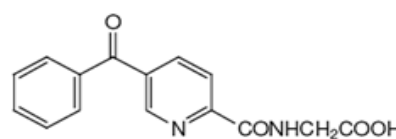
The preparation of vertilecanin A starting from nicotinic acid in 4 steps (Tumer, et al., 2005). The first synthetic preparation of vertilecanin C and 2 phenyl-substituted derivatives of vertilecanin A.



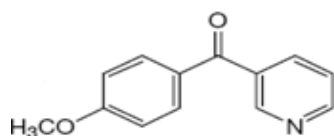
3-benzoylpyridine (**15**)



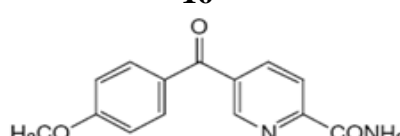
16



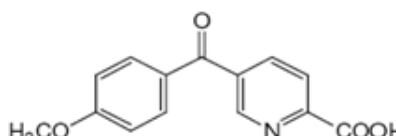
17



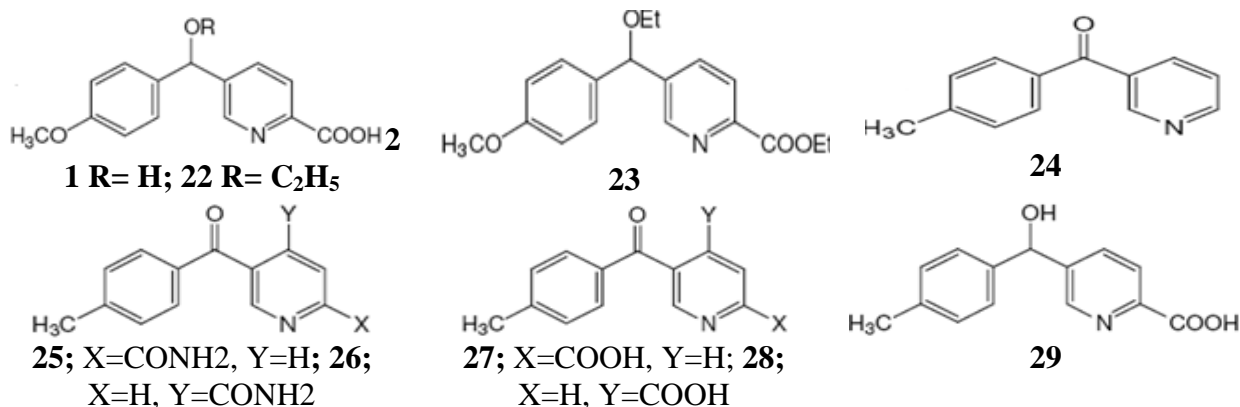
18



19

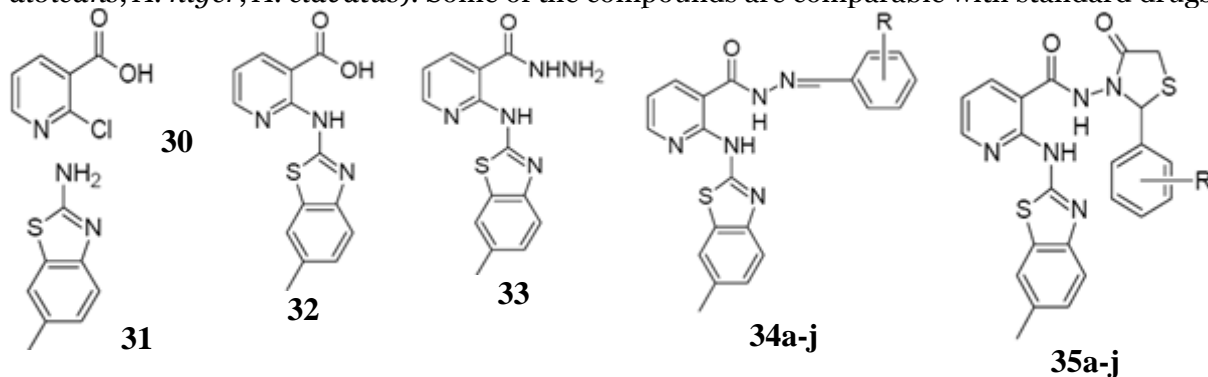


20



The synthesis of 2 new phenyl substituted analogues of vertilecanin A, which can be used for further chemical and biological purposes.

The compounds **35a–j**, 2-[(6-methyl-1,3-benzothiazol-2-yl)amino]-N-[2-(substituted phenyl/ furan-2-yl)-4-oxo-1,3-thiazolidin-3-yl]nicotinamides, were prepared from 2-chloropyridine-3-carboxylic acid **30** and 2-amino-6-methylbenzothiazole **31**. The *in vitro* antimicrobial screening of the compounds were carried out against two Gram positive (*S. aureus*, *S. pyogenes*), two Gram negative (*E. coli*, *P. aeruginosa*) bacteria and three fungal species (*C. albicans*, *A. niger*, *A. clavatus*). Some of the compounds are comparable with standard drugs [27].



a: R=H; b: R=2-Cl; c: R=4-Cl; d: R=2-NO₂; e: R=3-NO₂; f: R= 4-OH; g: R=4-OMe; h: R=3-OMe-4-OH; i: R=3-OMe-4-OH-5-NO₂; j: R=2-furyl

The 4-thiazolidinones incorporated nicotinic acid with 2-amino-6-methylbenzothiazole and examined their antimicrobial activities.

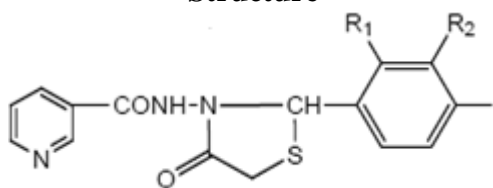
The *in vitro* antibacterial and antifungal activities of the compounds are shown in Table 3. The MICs (µg/ml) were carried out by broth microdilution method. **Antibacterial Activity:** It is evident that compound **30** displayed good to moderate activity against all bacteria (150–250 µg/ml). 2-Amino-6-methylbenzothiazole (**31**), compound **32** and hydrazide **33** exhibited moderate to poor activity against all bacteria. The result shows that compounds **34a**, **34e**, **34j**, **35d**, **35g** and **35j** exhibited good activity (25-100 µg/ml) against *E. coli*; **34d**, **34j**, **35d**, **35i** and **35j** exhibited good activity (50-100 µg/ml) against *P. aeruginosa*; **34a**, **35e**, **34f**, **34h**, **34j**, **35d**, **35b** and **35j** showed good to very good activity (25-150 µg/ml) against *S. aureus*; whereas **34b**, **34h**, **34j**, **35c**, **35i** and **35j** showed good activity (62.5-100 µg/ml) against *S. pyogenes* compared with ampicillin. All other compounds showed moderate activity. **Antifungal Activity:** From the results of the antifungal activity (Table 3), it is evident that compounds **30**, **31**, **32** and **33** showed good to moderate activity against *C. albicans*. Results also show that Schiff bases and 4-thiazolidinones possessed good activity against *C. albicans* while moderate activity against *A. niger* and *A. clavatus*. Compounds **34a**, **34d**, **34g**, **34j**, **35b**, **35e**, **35f** and **35j** showed better activity (100-500 µg/ml) against *C. albicans* when compared with griseofulvin, while all compounds showed poor to moderate activity against *A. niger* and *A. clavatus* [27].

Table 3: Antibacterial and antifungal activities of **34a–j** and **35a–j**

Compound	Minimal bactericidal concentration $\mu\text{g/ml}$				Minimal fungicidal concentration $\mu\text{g/ml}$		
	Gram negative		Gram positive		<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. clavatus</i>
	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenus</i>			
30	150	150	200	250	250	500	500
31	250	125	500	1000	1000	1000	1000
32	500	1000	500	1000	500	250	250
33	500	500	150	200	250	1000	1000
34a	100	500	150	200	100	500	500
34b	500	500	500	100	1000	1000	>1000
34c	500	500	1000	1000	1000	>1000	>1000
34d	250	62.5	500	500	250	1000	1000
34e	62.5	150	100	200	1000	500	500
34f	200	250	150	250	1000	1000	1000
34g	250	500	500	1000	150	500	500
34h	200	200	62.5	62.5	>1000	>1000	>1000
34i	500	500	500	500	>1000	500	>1000
34j	25	50	50	62.5	100	500	500
35a	250	250	500	500	1000	1000	1000
35b	500	500	150	500	150	1000	1000
35c	500	1000	1000	100	>1000	>1000	>1000
35d	50	100	100	150	>1000	1000	500
35e	250	250	500	500	500	>1000	>1000
35f	250	250	500	500	250	500	>1000
35g	62.5	200	500	500	1000	>1000	500
35h	200	500	500	500	1000	1000	1000
35i	500	100	1000	100	>1000	500	>1000
35j	100	62.5	25	100	500	1000	1000
Ampicillin	100	100	250	100	–	–	–
Griseofulvin	–	–	–	–	500	100	100

Most of the compounds are comparable with ampicillin. Compounds bearing $-\text{Cl}$, $-\text{NO}_2$ groups and furan nucleus are more active than the remaining compounds. Compounds **34a**, **34d**, **34g**, **34j**, **35b**, **35e**, **35f** and **35j** were found to be active against *C. albicans* but they found poor with other fungal species. All the compounds were tested for their antibacterial and antifungal activity (MIC) *in vitro* against two Gram positive *S. aureus*, *S. pyogenes* and two Gram negative *E. coli*, *P. aeruginosa* bacteria and three fungal species *C. albicans*, *A. niger* and *A. clavatus*. Ampicillin was used for antibacterial activity while griseofulvin for antifungal activity were used as a standard drug [28-29].

Six compounds of thiazolidinone derivatives of nicotinic acid were evaluated *in vitro* antibacterial and antifungal activities (Table 4). The MIC of the compounds was also determined. Significant antimicrobial activities were observed for some compounds of the series. Some of them showed comparable activity as that of the standard drug used [30].

Compounds**Structure****R₁** **R₂** **R₃****36a****36b****36c****36d****36e****36f**

H	H	H
OH	H	H
H	H	Cl
H	H	OCH ₃
H	OCH ₃	OH
H	OH	H

The *in vitro* antibacterial and antifungal activities of the compounds were evaluated at 25µg/ml, 50µg/ml and 75µg/ml concentration. Ciprofloxacin 50µg/ml and Ketaconazole 50µg/ml were used as standard. DMSO was used as solvent control. The MIC of the compounds were also determined. The antibacterial activity of the synthesized compounds was tested against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* using nutrient agar medium. The antifungal activity of the compounds was tested against *Candida albicans* and *Aspergillus niger* using sabouraud dextrose agar medium.

Table 4: Antimicrobial activity of compounds **36a-36f**

Compound	Zone of inhibition (mm)						MIC (µg/disc)					
	Antibacterial activity [†]				Antifungal activity [†]		Antibacterial activity [†]				Antifungal activity [†]	
	S.A.	S.E.	K.P.	E.C.	A.N.	C.A.	S.A.	S.E.	K.P.	E.C.	A.N.	C.A.
36a	+	+	++	++	+++	++	+	++	+	+	+	+
36b	++	++	+++	++	+++	++	+	+	+	+	+	+
36c	++	++	++	++	+++	++	+	++	+	+	+	+
36d	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
36e	+	++	++	+	+++	++	+	+	+	++	+	+
36f	++	++	++	+	++	++	+	+	++	+	+	+
C.P.	+++	+++	++++	++++	-	-						
K.C.	-	-	-	-	++++	+++						
C.	-	-	-	-	-	-						

S.A.-*Staphylococcus aureus*; S.E.-*Staphylococcus epidermidis*; K.P. -*Klebsiella pneumonia*; E.C.-*Escherichia coli*; A.N. -*Aspergillus niger*; C.A.-*Candida albicans*; C.P.- Ciprofloxacin (50 µg/ml); K.C.-Ketaconazole (50 µg/ml); C- Control; Concentration of the compounds: 50 µg/ml; Zone of inhibition: 10-15 mm = +; 16-20 mm = ++; 21-25 mm = +++ and 25 < = ++++.

All these compounds were evaluated for *in vitro* antibacterial and significant antifungal activities. Among the compounds, compounds **36b** and **36d** possess significant activity against bacterial organisms whereas **36c** showed very less activity. Other compounds showed moderate antibacterial activity. Compounds **36c** and **36e**, showed Zone of inhibition (for 50µg/ml) and MIC of the synthesized compounds have been summarized in Table 4 [30]).

Discussion

Nicotinic acid derivatives are reported to show variety of biological activities. Nicotinic acid which belongs to water soluble vitamin B complex is also indicated is hyperlipidemia to lower triglycerides and cholesterol [31]. Keeping in view the importance of the above heteryl nuclei and considering the scope to introduce nicotinoyl moiety into heterocyclic compounds it was thought worthwhile to undertake the synthesis of the titled compounds. Nicotinic acid compounds exhibited a significant activity when compared with reference drugs. It suggests that they may be selectively targeted to *Mtb* growth, also considering that they were not cytotoxic to host cells at the same concentration and could be a good start point to find new lead compounds. More information about structure-activity relationship and their antibacterial activity test are in progress. A series of compound were synthesized with the presumption of estimating its anti-microbial property. The title compounds possess moderate to good anti-microbial potency, However auxiliary studies is desired to wrap up anything distinct about the therapeutic potential of these compounds. The nicotinic acid derivatives and its metal complexes were showed interesting results comparable to ampicillin. The uncomplexed compounds showed higher antimicrobial activity against *E. coli* compared to their respective complexes. While the complexes showed higher antimicrobial activity against *S. aureus* compared to their respective ligands. A large number of drugs and biologically relevant molecules contain heterocyclic systems. Often the presence of hetero atoms or groupings imparts preferential specificities in their biological responses. The chemistry and biological study of heterocyclic compounds has been interesting field for a long time due to medicinal and agricultural reasons. The number of heterocyclic derivatives containing nitrogen and sulfur atom

possess broad spectrum of biological activities. One of the most important heterocycle in medicinal chemistry is pyridine with wide application including antimicrobial, anti-inflammatory, anti-HIV, antiparasitic, anti-tubercular, antibacterial and anticonvulsant [32-36] activities, and has much other important biological significance. Importance of heterocyclic compounds has long been recognized in the field of synthetic organic chemistry. It is well known that heterocyclic compounds containing nitrogen and sulphur exhibit a wide variety of biological activity. A series of pyridine derivatives were evaluated for antitumor activities [37]. Nicotinamide has been shown to be beneficial in the treatment of papular and pustular acne, as well as improvement of skin cancer [38]. Nicotinamide or nicotinic acid has been used to treat diseases such as hypercholesterolemia and schizophrenia [39]. Nicotinamide and its derivatives are also used to prevent type-1 diabetes in animal model and humans showed cytotoxic properties [40,41]. On the other hand 6-chloro-3-substituted pyridine are very important class of heterocycles and are widely used in pharmaceutical and agrochemical industry [42,44]. The increasing interest in the chemistry of nicotinamide and its substituted derivatives result from the wide possibilities and their practical application for obtaining biologically active agents. Derivatives of S-protected triazole and diazole exhibit high anti-inflammatory activity [45]. Interest is to search antibacterial activity of S-protected derivatives of nicotinamide. An attempt has been made to understand the antibacterial behavior of these compounds *in vitro* [46] (Cutshall, et al., 2001).

Conclusion

In general, nicotinic acid derivatives are showed different types of biological properties. These compounds showed extensive variety of biological special property. In present study, some nicotinic acid derivatives are evaluated as anti-microbial properties. The result of the anti-bacterial activity evaluation proved to be significant with respect to the reference drugs. Some compounds exhibited potent anti-microbial activity. Nicotinic acid derivatives were synthesized with the belief of estimating its anti-microbial possessions. These compounds possess reasonable to fine anti-microbial effectiveness. It suggests that this class of compounds may be selectively targeted to *Mtb* growth, also considering that they were not cytotoxic to host cells at the same concentration and could be a good starting point to find new lead compounds.

References:

1. Asif, M.; Singh, A.; Ratnakar, L. *J Pharm Res*, 2011, 4(3), 664-667.
2. Coker, R. J. *Public Health*. 2003, 117, 281.
3. Neves, I. Jr.; Lourenço, M.C.S.; de Miranda, G.B.P.; Vasconcelos, T.R.A.; Pais, K.C.; de, A.J.P. Jr.; Wardell, S.M.V.S.; Wardell, J.L.; de Souza, M.V.N. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2006, 3, 424-428.
4. Frieden, T. R.; Driver, C. R. *Tuberculosis*, 2003, 83, 82.
5. Souza, M.V.N.; Vasconcelos, T. R. A.; Cardoso, S. H.; Almeida, M. V.; *Curr. Med. Chem.* 2006, 13(4), 455.
6. Maccari, R.; Ottanà, R.; Vigorita, M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 2509.
7. Maccari, R.; Ottanà, R.; Bottari, B.; Rotondo, E.; Vigorita, M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 5731.
8. Neves, Jr., I.; Lourenço, M. C. S.; Henriques, M. G. M. O.; Ferreira, Bárbara.; Vasconcelos, T. R. A.; Peralta, M. A.; de Oliveira, P. S. M.; Wardell, S. M. S. V.; de Souza, M. V. N. *Lett. Drug Des. Discov.* 2005, 2, 563.
9. Vinsova, J.; Imramovsky, A.; Jampilek, J.; Monreal, J.F.; Dolezal, M. *Anti-Infective Agents in Med Chem*, 2008, 7, 12-31.
10. Uğur, A.; Mercimek, B.; Özler, M. A.; Şahin, N. *Trans. Met. Chem.* 2000, 25, 421-25.
11. Chohan, Z. H.; Farooq, M. A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 2002, 17, 1-7.
12. Wu, G.; Wang, G.; Fu, X.; Zhu, L. *Molecules*, 2003, 8, 287-296.

13. Elguero, J. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1996; Vol.3, 70.
14. De Souza, M. V. N. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2006, 1, 33.
15. De Clercq, E. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Disease* 2002, 258, 1587.
16. Lourenço, M.C.S.; de Souza, M.V.N.; Pinheiro, A.C.; Ferreira, M.D.L.; Goncalves, R.S.B.; Nogueira, T.C.M.; Peralta, M.A. *Arquivoc.* 2007, 15, 181–191.
17. Natarajan, R.; Subramani, A.; Karthick, Kesavan, S.K.; Selvaraj, D. *Inter J Pharm and Pharm Sci*, 2013, 5(Suppl 4), 725-727.
18. De Souza, M. V. N. Vasconcelos, T. R. A.; Wardell, S. M. S. V.; Wardell. J. L.; Low, J. N.; Glidewell, C. *Acta Cryst.* 2005, C61, 204.
19. Cuffini, S.; Glidewell, C.; Low, J. N.; De Oliveira A. G.; De Souza, M. V. N.; Vasconcelos, T. R. A. Wardell, S. M. S. V. Wardell, J. L. *Acta Cryst.* 2006, B62, 651.
20. Wardell, S. M. S. V.; De Souza, M. V. N.; Wardell, J. L.; Low, J. N.; Glidewell, C. *Acta Cryst.* 2007; B63; 101.
21. Khattnab SN. *Molecules* 2005, 10, 1218-1228.
22. Maske, P.V.; Makhija, S.J. *Der Pharmacia Lettre*, 2011, 3(5), 110-114.
23. Demirci, S.; Goksu, S.; Boztas, M.; Tumer, F.; Secen, H. *Turk J Chem.* 2008, 32, 287-295.
24. Clark, G.H.; Clark, M.A. US Pat. 2003, 6, 582,722; Chem Abstr. 2003, 139, 52063.
25. Pavlovic, C.; Barrigao, M.C.; Cornejo H.J.; Ulibarri, M.A. *Appl. Clay Sci.* 2005, 30, 125-133.
26. Soman, A.G.; Gloer, J.B.; Angawi, R.F.; Wicklow, D.T.; Dowd, P.F. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 189-192.
27. Patel, N.B.; Shaikh, F.M. *Sci Pharm.* 2010, 78, 753–765.
28. Patel, N.B.; Khan, I.H.; Rajani, S.D. *Eur J Med Chem.* 2010, 45, 4293–4299.
29. Patel, N.B.; Patel, J.C. *Sci Pharm.* 2010, 78, 171–193.
30. Ramalakshmi, N.; Aruloly, L.; Arunkumar, S.; Ilango, K.; Puratchikody, A. *Malaysian J Sci*, 2009, 28(2): 197– 203.
31. Povl, K.; Tommy, L.; Madsen, U. *Textbook of Drug Design and Discovery* (3rd Edition), 2004, 212-215.
32. Hosni, H.M.; Abdulla, M.M. *Acta Pharm.* 2008, 58, 175–186.
33. Kumar, S.; Das, S.K.; Dey, S.; Maity, P.; Guha, M.; Choubey, V.; Panda, G.; Bandyopadhyay, U. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, 52, 705–715.
34. Ali, M.A.; Yar, M.S.; Siddiqui, A.A.; Sriram, D.; Yogeewari, P.; De Clercq, E. *Acta Pol Pharm.* 2007, 63, 423–428.
35. Sharma, P.C.; Jain, S. *Acta Pol Pharm.* 2008, 65, 551–556.
36. Shafiee, A.; Rastkari, N.; Sharifzadeh, M. *Daru.* 2004, 12, 81–86.
37. Abdel-Galli, E.M.; Ashraf, A.M.R.; Salwa, F.M.; Nagla, A.A.; Abu-El-fotooti G.H. *Bioorg Med Chem.* 2006, 14, 4466.
38. Alan, R.; Shalita, M.D.; Graham, J.S.; Lawrence, M.D.; Charlesparish, M.D.; Michael, S. *Int. J. Dermatol.* 1995, 34, 597.
39. Choudhary, B.P.; Malad, S.V. *Indian J. Chem.* 2005, 44, 1074.
40. Eduarod, C.R.; Gisela, M.; Celeste, A.; Manuel, V.; Pedro, G. *Autoimmunity*, 2006, 39, 333.
41. Franchetti, P.; Pasquellini, R.; Petrelli, R.; Ricciutelli, M.; Vita, P.; Cappellacci, L. *Biorg. Med. Chem.* 2004, 14, 4655.
42. Shi W, X. Qian, R.S. Zhang, G. Song, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2001.

43. Spande, T.F.; Garraffo, H.M.; Edwards, M.W.; Yeh, H.J.C.; Pannell, L.; Daly, J.W. *J. American Chem. Soc.* 1992, *114*, 3475.
44. Elbert A, H. Overbeck, K. Iwaya, S. Tsuboi, *Proc. Br. Crop. Conf. Pests Dis.* 1990, *1*, 21.
45. Labanauskas L, E. Udrenait, P. Gaidelis, A.A. Brukstus, *Farmaco*, 2004, *59*, 255.
46. Cutshall, N.S.; Ursino, R.; Kucera, K.A.; Latham, J.; Ihle, N.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, *11*, 1951.
47. Marsham, P.R.; Wardleworth, J.M.; Boyle, F.T., Hennequin, L.F.; Kimbell, R.; Brown, M.; Jackman, A. L. *Med. Chem.*, 1999, *42*, 3809-20.
48. Tumer, F.; Goksu, S.; Secen, H.S. *Chem. Bull.* 2005, *54*, 2466-2467.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 1, No. 1, pp. 22-26, 2014

DOI: 10.13187/ejchr.2014.1.22
www.ejournal14.com



UDC 54

Heterofunctional Condensation of α, ω - Bis (Aminodimethylsilil) Tetramethyl - Cyclodisilazanes With Dichloranhydride Tereftalic Acids and α, ω - Bis (β - Carboxyethyl) Dimethylsiloxanes

¹ Lili Janiashvili
² Giuli Andronikashvili
³ Archil Varadashvili
⁴ Mzia Gagolishvili

^{1, 3} I. Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia
^{2, 4} Telavi State University, Georgia

Abstract

With a view to synthesizing heat-resistant polymers, we performed the heterofunctional condensation (HFC) of α, ω -bis (aminodimethylsilil) tetramethyl- cyclodisilazanes with terephthaloyl chloride.

The synthesized polymers are elastic products in light color. Their elasticity increases with an increase in cyclodisilazane fragments in the polymer chain. At temperatures of 360 to 380°C, there starts slow polymer degradation, while fast degradation occurs at a temperature of 400 to 450°C.

We also performed the HFC of α, ω -bis (aminodimethylsilil) tetramethyl- cyclodisilazanes with α, ω -bis (β -carboxyethyl) dimethylhexanes.

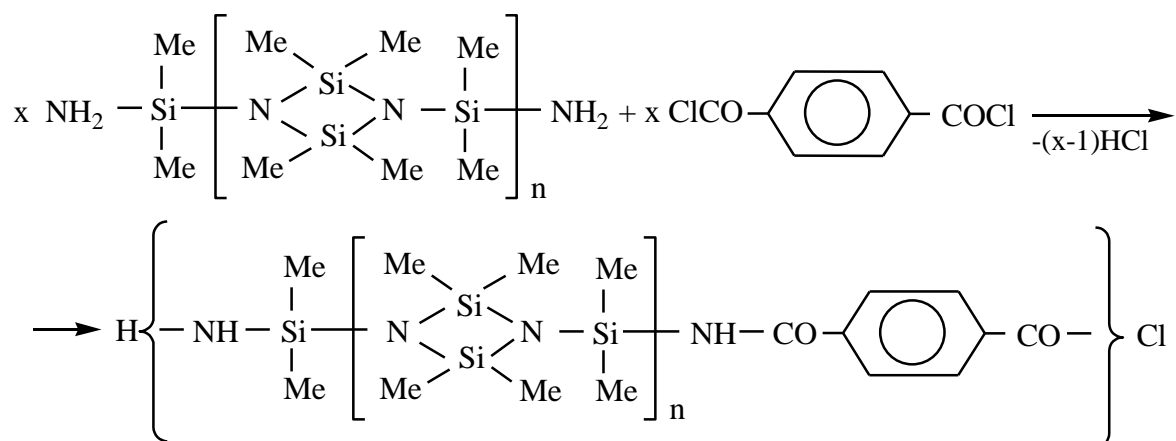
The synthesized products are caoutchouc-like products, as they contain pliant siloxane and cyclodisiloxane fragments. They have quite high thermal stability. The stability is impacted on by an increase in the dimethylsiloxane block in the copolymer chain. Polymers are resistant at temperatures of 510 to 550°C. At these temperatures, there starts their slow degradation. The thermal stability of polymers is not impacted on by an increase in the share of silazane cycles in the chain.

Keywords: heterofunctional condensation; cyclodisilazane; tetramethyl- cyclodisilazane; dichloride; dimethylformamide; N-methylpyrrolidone.

Введение

В полимерной химии важной задачей является синтез перерабатываемых полимеров с высокой тепло- и термостойкостью. С этой точки зрения, несомненный интерес представляют сополимеры с органоциклодисилазановыми фрагментами в макромолекулярной цепи. Циклодисилазановые полимеры обладают высокой упругостью, хорошими антиадгезионными свойствами.

С целью синтеза термостойких полимеров нами осуществлена гетерофункциональная конденсация α, ω -бис (админодиметилсиллил) тетраметилциклодисилазанов с дихлорангидридом терефталевой кислоты по следующей схеме:



где

$n=1$ (1); $n=2$ (2).

Гетерофункциональную конденсацию (ГФК) проводили в кипящем диметилформамиде (ДМФА), в атмосфере азота при эквимольном соотношении исходных компонентов в течение 5-6 часов.

За ходом реакции следили по выделению хлористого водорода (рис. 1). Наблюдение за ходом реакции ГФК по изменению удельной вязкости 1%-ного раствора в бензоле и выделением хлористого водорода во времени показало, что вязкость продукта поликонденсации возрастает в соответствии с увеличением количества выделившегося хлористого водорода.

Синтезированные сополимеры эластичные продукты светлого цвета, хорошо растворяющийся в органических растворителях. Температуры размягчения для полимеров с чётным числом циклодисилазановых звеньев (при $n=2$, $T_{\text{разм}}=99^\circ\text{C}$) ниже, чем для полимеров с нечётным числом циклодисилазановых звеньев цепи (при $n=1$, $T_{\text{разм}}=127^\circ\text{C}$). Эластичность, а также растворимость в ароматических растворителях увеличиваются с ростом n .

Газожидкостный хроматографический анализ продуктов реакции показал, что исходные соединения в конечных продуктах реакции отсутствуют.

Состав и строение синтезированных полимеров охарактеризовано элементным анализом (табл. 1) и ИК спектрами. В ИК спектрах найдены полосы поглощения при $870\text{--}890\text{ см}^{-1}$ и $1010\text{--}1040\text{ см}^{-1}$, характерные для валентных колебаний циклодисилазанного фрагмента (для $\nu(\text{Si}_2\text{N})$ и (Si_4N_2) , соответственно), В спектрах также имеются полосы с волновыми числами 930 , 1180 , 3380 см^{-1} , соответствующие частотам валентных и деформационных колебаний связей Si-NH групп, полосы поглощения в области 1260 см^{-1} (Si-Me), 1660 см^{-1} ($\nu\text{ CO}$), 1600 см^{-1} ($\text{C}_{\text{ар}} - \text{C}_{\text{ар}}$ Бензольного ядра).

Изучена термическая стабильность синтезированных сополимеров. Данные термогравиметрического анализа (ТГА) показывают, что при температурах $360\text{--}380^\circ\text{C}$ начинается медленное разложение полимеров (потери массы при 360°C не выше 3%), быстрое разложение происходит при температурах $400\text{--}450^\circ\text{C}$.

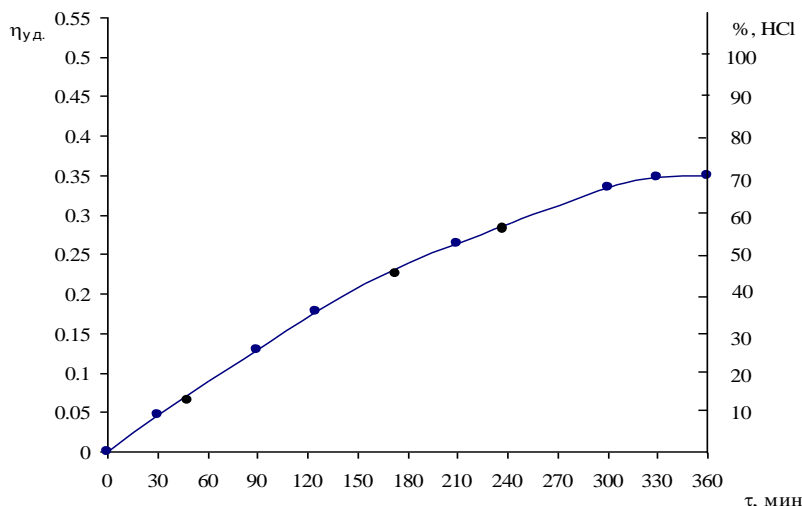
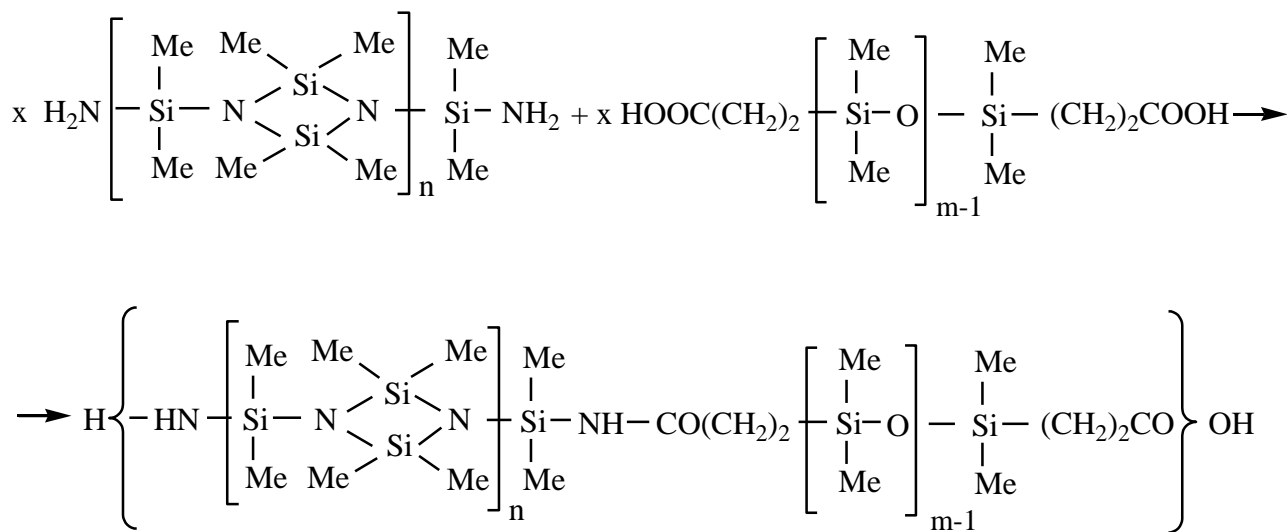


Рис. 1. Изменение удельной вязкости 1%-ного раствора сополимера 1 и количество выделившегося HCl в процессе ГФК α, ω - бис (аминодиметилсилил) тетраметилциклодисилазана с дихлорангидридом терефталевой кислоты

Нами была проведена ГФК α, ω -бис (аминодиметилсилил) тетраметилциклодисилазана с α, ω -бис (β -карбоксиэтил) диметилсилоксанами в кипящей ДМФА, в атмосфере азота при эквимолярном соотношении исходных компонентов в течение 10 часов. Реакция протекает по схеме:



где $n=1, m=10$ (3); $n=2, v=10$ (4); $n=1, m=28$ (5); $n=2, m=28$ (6).

Полученные сополимеры являются каучукоподобными продуктами светлого цвета. Они хорошо растворяются в ДМФА и N-метилпирролидоне (N-МП). Синтезированные сополимеры обладают волокно – и пленкообразующими свойствами. Состав и строение синтезированных сополимеров подтверждено ИК – спектрами и данными элементного анализа.

В ИК – спектрах сополимеров 3 ÷ 6 найдены полосы поглощения при $870\text{--}890 \text{ см}^{-1}$ и $1020\text{--}1040 \text{ см}^{-1}$, характерные для валентных колебаний циклодисилазанового фрагмента для $\nu(\text{Si}_2\text{N})$ и $\nu(\text{Si}_4\text{N}_2)$, также интенсивные полосы поглощения в области 1660 см^{-1} (νCO) и $1100\text{--}1200 \text{ см}^{-1}$ (Si-O-Si). Синтезированные полимеры 3÷6 содержат в основной цепи гибкие силоксановые и циклодисилазановые фрагменты. Сочетание различных структурных

фрагментов в сополимерах отражается на физико-химических показателях этих сополимеров и прежде всего на их термомеханических свойствах. Сополимеры 5 и 6 имеют температуру стеклования в области отрицательных температур. На термомеханические свойства этих полимеров сказывается величина диметилсилоксанового блока и у сополимера 6 проявляется высокоэластичная область.

Синтезированные сополимеры обладают достаточно высокой термической стабильностью. Полимеры 3 и 4 устойчивы при температурах 430–440 °С в среде азота, а полимеры 5 и 6 устойчивы при температурах 510–560 °С. При этих температурах начинается медленное разложение сополимеров (потеря массы не превышает 3–5 %). На стабильность полимеров не влияет повышение доли силановых циклов в полимерах путем встройки олигомерных циклодисилазанов. Некоторые свойства и элементный анализ синтезированных сополимеров приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Физико-химические данные и элементный анализ синтезированных сополимеров

N	$\eta_{уд}$ 1%- ый р-р в Бензоле при 25 °С	T _{разм.} °С	Найдено/ вычислено %				Структурная единица
			C	H	N	Si	
1	0,33	127	45,67/45,50	7,49/7,11	13,51/13,27	26,17/26,54	C ₁₆ H ₁₀ N ₄ O ₂ Si ₄
2	0,35	99	42,45/42,31	8,00/7,69	13,09/13,46	31,63/31,41	C ₂₂ H ₁₈ N ₆ O ₂ Si ₇
3	0,3	255	36,51/36,23	8,17/8,35	5,21/4,91	35,14/34,81	C ₃₄ H ₉₄ N ₄ O ₁₁ Si ₁₄
4	0,34	157	36,45/36,04	8,79/8,43	6,21/6,68	36,27/35,84	C ₄₀ H ₁₁₂ N ₆ O ₁₁ Si ₁₇
5	0,39	298	34,47/34,96	8,14/8,22	2,53/2,28	36,77/36,45	C ₇₀ H ₂₀₂ N ₄ O ₂₉ Si ₃₂
6	0,42	236	34,42/34,25	7,97/8,27	3,47/3,16	36,25/36,84	C ₇₆ H ₂₂₀ N ₆ O ₂₉ Si ₃₅

Экспериментальная часть

В трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, обратным холодильником и газопроводной трубкой, помещали 2,92 г. (0.01 м) α, ω - бис (аминодиметилсилил) тетраметилциклодисилазана (n =1) и 2.03 г. (0.01 м) дихлорангидрида терефталевой кислоты, добавляли 20 мл ДМФА. Реакционную смесь нагревали при температуре 150 °С при постоянном перемешивании в токе азота в течение 5-6 часов. Затем реакционную колбу соединяли с вакуумом. Твердую массу растворяли в смеси N- МП и 3% LiCl, переосаждали ацетоном, промывали водой, сушили в вакуум-сушильном шкафу при температуре 50 °С в течение 15 часов. Получали 4. 32 г. (94%) эластичный сополимер 1 с $\eta_{уд}$ = 0.33.

Аналогично получали и другие сополимеры.

References:

1. Peterman K.E., Shreeve J.M. Inorganic Chemistry, 1976, 15, 743.
2. Khananashvili L.M., Akhobadze D. Sh., Seckuria J.M. Eight International Symposium of Organosilicon Chemistry; 31 th JUPAK Macromolecular Symposium, DDR, 1987, 1, 87.
3. Джаниашвили Л.К., Андроникашвили Г.Г., Отиашвили Д.Г. Химический журнал Грузии, 2009, 9, 452-454.
4. Sidamonidze N.N., Vardiashvili R.O., Isakadze M.O., Janiashvili L.K. and Lomtadidze Z.Sh. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2007, 41, 131-132.

References:

1. Peterman K.E., Shreeve J.M. Inorganic Chemistry, 1976, 15, 743.
2. Khananashvili L.M., Akhobadze D. Sh., Seckuria J.M. Eight International Symposium of Organosilicon Chemistry; 31 th JUPAK Macromolecular Symposium, DDR, 1987, 1, 87.

3. Dzhaniashvili L.K., Andronikashvili G.G., Otiashvili D.G. Chemical Journal of Georgia, 2009, 9, 452-454. (In Russian)

4. Sidamonidze N.N., Vardiashvili R.O., Isakadze M.O., Janiashvili L.K. and Lomtadze Z.Sh. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2007, 41, 131-132.

УДК 54

Гетерофункциональная конденсация α, ω - бис (аминодиметилсилил) - тетраметилциклодисилазанов с дихлорангидридом терефталевой кислоты и α, ω - бис (β -карбок시에тил) диметилсилоксанами

¹ Лили Карумовна Джаниашвили

² Гиули Гиоргиевна Андроникашвили

³ Арчил Шалвович Варадашвили

⁴ Мзиа Шамиловна Гаголишвили

^{1, 3} Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили, Грузия

^{2, 4} Телавский государственный университет им. Я. Гогешашвили, Грузия

Аннотация. С целью синтеза термостойких полимеров нами проведена гетерофункциональная конденсация (ГФК) α, ω -бис (аминодиметилсилил) тетраметилциклодисилазанов с дихлорангидридом терефталевой кислоты.

Синтезированные полимеры являются эластичными продуктами светлого цвета. Эластичность увеличивается с ростом циклодисилазановых фрагментов в полимерной цепи. При температурах 360-380°C начинается медленное разложение полимеров, а быстрое разложение происходит при температуре 400-450°C.

Нами также была проведена ГФК α, ω -бис (аминодиметилсилил) тетраметилциклодисилазанов с α, ω -бис (β -карбоксиетил) диметилсилоксанами.

Синтезированные продукты являются каучукоподобными продуктами, поскольку содержат в основной цепи гибкие силоксановые и циклодисилоксановые фрагменты. Они обладают достаточно высокой термической стабильностью. На стабильность оказывает влияние увеличение диметилсилоксанового блока в цепи сополимера. Полимеры устойчивы при температурах 510-550°C. При этих температурах начинается их медленное разложение. На термостабильность полимеров не влияет повышение доли силазановых циклов в цепи.

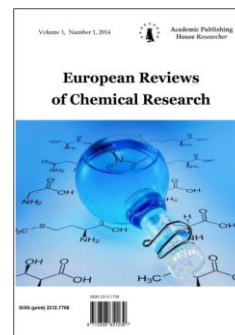
Ключевые слова: гетерофункциональная конденсация; циклодисилазан; Тетраметилциклодисилазан; дихлорангидрид; диметилформамид; N-метилпирролидон.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 1, No. 1, pp. 27-35, 2014

DOI: 10.13187/ejchr.2014.1.27
www.ejournal14.com



UDC 54

Repellency and Antifeedant of Ticks Through Ethno Plant Extracts and Ivermectin on Buffalo Calves

¹Mehmood A. Kalwar
^{*2}Hakim A. Sahito
¹Barkat A. Kalwar
¹Madan Lal
¹Shahnawaz Fazlani

¹Sindh Agriculture University, Pakistan
Department of Animal Product Technology, Faculty of AHV, Science (Researchers)

^{2*} Shah Abdul Latif University, Pakistan
Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences (Assistant Professor)
Corresponding author: Dr. Sahito^{1*} HA: hakimsahito@gmail.com

Abstract

The study was performed to determine the performance of ginger, garlic, neem and ivermectin on the ticks. For that purpose, 12 male buffalo calves were selected, which were divided in four groups in A, B, C and D, each group contained 3 animals. The data was collected on 3rd, 8th, 15th and 21st day, respectively. The effectiveness of ivermectin on 3rd day found (25.92%), 8th (37.03%), 15th (92.6%) and 21st day found (100%) whereas, neem seed extract was observed on 3rd day found (55.81%), 8th (48.83%), 15th (41.86%) and on 21st day (46.51%) thus, ginger extract 3rd day found (63.46%), 8th (51.92%), 15th (51.92) and 21st day (61.54%), and garlic extract on 3rd day found (32.61%), 8th (39.13%), 15th (36.96%) and 21st day (30.43%), respectively. It was concluded from the comparative effect of the ethno plant extracts and ivermectin on ticks' interaction that in total extract the ginger found more potent followed by neemseed extract and garlic but their effect was prolonged effect and 100% result was achieved through the ivermectin hence, it is recommended for the tick infestation and treatment.

Keywords: Medicinal plants; Ivermectin; Repellents; Animals; Ticks.

Introduction

The naturally occurring plants as ethno-veterinary medicine those refer to people's beliefs, knowledge, skills and practices relating to care of their animals (Choudhury, 2003). The use of these plants are limited by the seasonal availability of certain plants, the scarcity of treatment against infectious disease, the ineffectiveness of some treatments, the existing harmful practices and the often inadequate ethno-diagnosis (Choudhury, 2001;FAO, 1985). The five plants such as; *Dryopterisinaequalis*, *Albiziaanthelmintica*, *A. gummifera*, *Olea Africana* and *Myrsineaficana* were reportedly used in Kenya (Golob and Webley, 1980). The Kikuyu of Central Kenya allegedly use *Cissampelospaireira* roots, *Vernonialasiopus* roots and leaves, *Myrsine Africana* fruits, *Rapaneamelanophloeos* fruits, *Ficusthonningi* sap, *Albiziaanthelmintica* roots and *Ficussycomorus* sap for treatment, they also some time use the bark of *Acacia mellifera* against

parasites of animals (Grainge and Ahmed, 1988; Saxena, 1993). Schmutterer, (1990) reported eleven plants used for the same purpose. From Nigeria, 92 species of plants were identified to be used in traditional veterinary practice, with 15 reported to be used against general worm infestation in cattle (Anonymous, (1992). In the Somalia, six plants were reported to be used for treatment in livestock (Schmutterer and Ascher, 1984). Schmutterer and Ascher, (1987) listed 39 plants used against cestodes, 16 against trematodes and 45 against nematodes in humans worldwide. The ethno-veterinary made medicine in which most livestock keepers treat animal health problems due to easily available, inexpensive and effective, mostly in rural areas where, veterinary services are irregular or costly and used for emergency purpose (John *et al.*, 2005). Many countries have already come to realize the medicinal plants as a potential means of therapeutic agent and also their availability and cost effectiveness ardently throughout the world wide, various kinds of herbal extract showed the Larvicidal and Acaricidal effects as reported by (Chungsamarnyart and Jansawan, 1991).

Neem, *Azadirachta indica* A. Juss., (Meliaceae) widely distributed throughout tropical in both dry and humid areas (FAO, 1988). The most promising example of plants currently used for pest control (NRC, 1992), grown in many countries of worldwide with an immense work over the neem tree as the pesticidal properties which is used as a powder from crushed seeds, mixed with the grain at various concentrations levels, provided the protection of many insect pests included weevils, *Sitophilus* spp., khapra beetles, *Trogoderma granarium* and lesser grain borer, *Rhizoperthadominica* (Golob and Webley, 1980; Saxena *et al.*, 1989) due to bitter smell, can reduce its attractiveness as a protecting in food grains mostly in stored grains with its *azadirachtin* content in seed kernels (Ermel *et al.*, 1987). *Azadirachtin* content has also been analysed due to as important tree (Gruber, 1991) because, the extracts from different ecotypes effloresces variation in the antifeedant activity (Singh, 1987). Further, Pathaket *et al.*, (2004) studied plant extracts of neem, *Azadirachta indica* leaves and bark; nochi, *Vitexnugundo* leaves; vashambu, *Acorus calamus* rhizome and pungu, *Pongamiapinnata* leaves against ixodid ticks of small ruminants. Garlic, *Allium sativum*, L. (Amaryllidaceae) is also grown at worldwide, but the country China is the most producer yearly, near about 10.5 million tons (23 billion pounds) as 77% of worldwide output and the second is India about (4.1%) followed by South Korea (2%), Egypt and Russia (1.6%) and America (1.4%) Aeschlimann and Freyvogel, (1995). Ginger, *Zingiber officinale* L. (Roscoe) (Zingiberaceae) is also an indigenous to Southern China and other parts of Asia to West Africa and to the Caribbean. The herbal preparation consisting of garlic, onion, lemon extract, turmeric powder and camphor in karanj oil when applied once daily for consecutive days eliminated *sarcoptes scabiei* infestation in piglets within 5 days application (Dewivedi and Sharma, 1986). Shannon *et al.*, (1995) described that the ivermectin was safest and more effective for the treatment of endo and ectoparasites.

The ticks are small arachnids in the order Parasitiformes, Family, Ixodidae more than 700 species which are totally distinguished to others due to hard shell. An engorged tick, filled with blood, can easily be killed by stepping. In ixodidae nymphs and adults, a prominent head /*capitulum* forwarded from the body. Ixodid tick undergoes to three primary stages: egg, nymph, and adult Dennis *et al.*, (2005). This kind of specie requires three hosts, and their life cycle, takes at least one year to complete, which produce upto 3,000 eggs on the ground by the adult female. After emerging the second stage the larvae, which feed on small mammals and birds than molt on the ground, then feed on larger hosts and molt in an adult stage which attach to the larger hosts, feed, and lay eggs, while males feed very little and occupy larger hosts primarily for mating Aeschlimann and Freyvogel, (1995). Infestation rates of important genera of ticks infesting cattle in Pakistan were as follows: *Boophilus*, 43.40, *Hyalomma*, 36.65, *Rhipicephalus*, 16.88 and *Amblyomma*, (3.05%. Infestation rates by ticks of these genera in buffaloes were 53.12, 31.25, 15.62 and 3.05%, respectively (Mannan *et al.*, 1997; Hannan *et al.*, 2001).

A preliminary study was conducted by the Abdullah *et al.*, (2009a) established ginger as a higher tick repellent and they rubbed garlic, onion, ginger and neem leaves on five pieces of cotton cloth put ten ticks collected from cattle and buffalo in the centre of the cloth. Abdullah *et al.*, (2009b) proved ginger to be highly tick repellent as all ticks left the cloth in 25.3 seconds whereas, they took 30.6 seconds, 37.3 seconds and 40 seconds to leave the pieces of cloth rubbed with garlic, onion and neem leaves. Lal *et al.*, (2009) confound that the SAU students found ginger as best tick repellent and ticks spent 76.6 seconds on the piece of cloth that was rubbed with animal body.

Further, this study revealed that ticks were permanent eco-parasites that caused direct damage to cattle by sucking huge quantity of blood and bringing down milk and meat production besides acting as vector for viral, bacteria, protozoan and helminth pathogens and parasites that caused ailment and high mortality in cattle, buffalo, sheep and goat. As we know, the chemicals used against ectoparasites are harmful for man and animals, and the poor growers are illiterate they don't have knowledge how to apply insecticides on the animal body so far. The patent drug ivermectin and locally available medicinal plants are selected with the aim for comparative investigation. Therefore, the few objects were carried out under study to compare the effect of ivermectin and ethno plant extracts on ticks to increase the value of herbal products as compare to other acaricides or organophosphate pesticides.

Materials and Methods

The experiment was carried-out for a period of 6 months from June to November, 2013 in the Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Sindh Agriculture University Tandojam – Sindh, Pakistan. Twelve buffalo calves of male at aged between 9 to 12 months at weight of approximately 45-52kg per calf were also kept under experimental conditions. All under kept observed calves were examined for the presence of ticks attacked which known as ectoparasites and then the effectiveness of ivermectin and different ethno plant extracts. These were known as locally indigenous medicinal plant such as; Neem, *Azadirachta indica* A. Juss., (Meliaceae), Garlic, *Allium sativum*, L. (Amaryllidaceae), and Ginger, *Zingiber officinale* L. (Zingiberaceae). The dose of ivermectin was kept under observation for the attacked ticks on the body of buffalo calves. These calves were divided into four groups as, A, B, C and D, respectively. In which, all the groups kept under observed for the knowing about the less expensive, highly economic and high effective against this pest. All four groups were treated equally with the different doses of ethno plant extracts expect ivermectin which was used sub cut route (SC) injection method. Finally, the dose and recommendations were suggested to the growers of animal farms.

The ticks were observed by visually on the effected buffalo calves with their numbers and the numbers of tick were also recorded as pre-treatment and the post-treatment at 3rd, 8th, 15th and 21st day of the treatment period. The severity of infestation of ectoparasites (ticks) was observed by counting the numbers in a selected area of the individual calf. The ticks within this area were counted at pre-treatment of day 0 and post treatment as; 3rd, 8th, 15st, 21th days, respectively. Thus, if there was any adverse effect found on the treated animal was also kept under observation before and after the treatment on respective days as mentioned above given schedule. It was also focused on the hairs fall, rough condition skin of the animal, feeding efficacy and weakness of the treated animals with their physically appearance and by the visually examination at pre and post treatment on respective days. The under given doses of the ethno plants and Ivermectin on different groups were applied as per prescribed schedule.

1. Group – A was treated with Ivermectin (G-Tek) subcutaneously at dose rate of 1cc/ 50kg body weight.
2. Group- B was treated with neem seed extract (applied on skin) at the rate of 75gm/ 50kg body weight.
3. Group-C was treated with ginger extract (applied on skin) at the rate of 75gm/ 50kg body weight.
4. Group-D was treated with garlic extract (applied on skin) at the rate of 75gm/ 50kg body weight.

Effect of ivermectin (G-Tek) on male buffalo calf

Ivermectin is known as a parasite control drug which resulted in paralysis and the death of the tick parasites. The injection of ivermectin was injected on three male buffalo calves with the dose of 1cc/ 50kg body weight. The animal then observed on 3rd, 8th, 15th and 21st days of post injection of ivermectin. The effectiveness of ivermectin was kept under observation as respective of the extracts. Therefore, the repellency effect of different ethno plants extract was kept under observation.

Neem seed kernals, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) extract

Neem, *A.indica* is known with the many names throughout the world wide such as; *Antelaeazadirachta* (L.) Adelb., *Azedarachfraxinifolia* (Moench), *Meliaazadirachta* (L.), *M.*

fraxinifolia (Salisb.), *M. indica* (A. Juss.) Brandis, *M. pinnata* (Stokes) and here in Sindh-Pakistan as a Nim tree with its local name. In our neighbor country (India) this plant is also commonly referred as neem-tree, Indian lilac, or white cedar. This tree is with a hardy tree growing to an approximately with the height of 15-20 m long, with a dense leafy, oval-shaped in canopy with the bark is rough, pale grey-brown in colour. The seed kernals were collected from the branches dried for a week before grinding. The grinding process was done through the electric grinder or juicer machine kept at laboratory of AHVS, SAU- Tandojam. Finally, the paste was made and rubbed on the affected animals to check the efficacy, repellency and the antifeedant of ticks.

Garlic, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae) extract

Garlic, *A. sativum* commonly known as garlic globally, this is a kind of onion species with genus, *Allium* which is used throughout the world wide since 7,000 years and known with its native from central Asia, and has long been a staple as a frequent seasoning in Asia, Africa, and Europe. This was also known to and ancient Egyptians which was been used for both cooking and medicinal purposes so far. Keeping in view, the importance of this seed, the garlic seed was purchased locally from near city market Hyderabad – Sindh about one kilo gram and cleaned with the help of hand and knife finally minced purely, made a paste and was rubbed on the affected parts of animals kept at experimental field situated at SAU, Tandojam.

Ginger, *Zingiber officinale* L. (Roscoe) (Zingiberaceae) extract

Ginger, *Z. officinale* roots of the plant are consumed as a delicacy, medicinal and for the purpose of species in food stuffs throughout the world wide with the mixtures of this plant other families are; turmeric, cardamom, and the galangal, have them common names to enhance the taste of the food stuffs. The ginger is an indigenous plant of southern China, from whence it was spread to the other countries of Asia, West Africa and the Caribbean, respectively. But in Pakistan and India, it is known as adrak, used in different commonly and particularly dining table dishes of homes and hotels in all seasons as well. But here we used it as an ethno extract, purchased from same market of Hyderabad. The fresh garlic was also minced in same pattern as neem and garlic, applied on the vicinity of severely affected animals and thus data was taken on respective days. An integrated control strategy based on the following results was taken and the recommended for the control of ticks in buffalo calves and all kind of animals, respectively.

Income from different IPM modules

In the tick management, it was determined the economical difference between ethno-veterinary plants and ivermectin. The prices were compared through these pest management modules which were also tested about expenses and income of the experiment. Behalf of expense and income, the final suggestions would be appreciated for animal farmers. The modules were: tick control through ethno plants module and tick control through chemical (Ivermectin) module. The input and output record was kept. Finally, the economic analysis was made to determine cost: benefit analysis of different IPM modules.

Data Analysis

The data were collected on the 3rd day, 8th day, 15th day and 21st day from each group of animal and thus calculated in simple percentage an under given formula; whereas, analysis of variance was done though Statistix (8.1) students software USA.

$$\text{Effectiveness (\%)} = \frac{\text{No. of ticks after treatment}}{\text{Total number of ticks before treatment}} \times 100$$

Results

The study was performed to accesses the performance of ginger, garlic, neem and ivermectin on the ticks. The purpose of research was to find out the effectiveness of some ethno-veterinary plants extracts and very popular drug ivermectin. The collected information from these agents was interpreted under the following headings.

Effect of ivermectin (G-Tek) on male buffalo calf

The injection of ivermectin was injected on three male buffalo calves with the dose of 1cc/50kg body weight. The animal then observed on 3rd, 8th, 15th and 21st days of post injection of ivermectin. The effectiveness of ivermectin on 3rd day found 25.92%, 8th day 37.03%, 15th day 92.6% and on 21st day 100%, respectively. The data regarding result of the effect of ivermectin on ticks is shown in Table 1.

Table 1: Effect of ivermectin (G-Tek) on tick on male buffalo calf

Animals	No. of ticks before treatment	No. of ticks after treatment			
		3 rd day	8 th day	15 th day	21 st day
1	08	06	04	00	00
2	10	08	08	01	00
3	09	06	05	01	00
Total	27	20	17	02	00
Results (%)		25.92%	37.03%	92.6%	100%

Effect of neem seed extract on tick on male buffalo calf

The extracts of neem seed was applied on the skin of three male buffalo calves, 75gm/50kg body weight each animal. The animal then observed on 3rd day found 55.81%, 8th day 48.83%, 15th day 41.86% and on 21st day 46.51%, respectively. The data regarding result of effect of neem seed extract on ticks is shown in Table 2.

Table 2: Effect of neem seed extract on tick on male buffalo calf

Animals	No. of ticks before treatment	No. of ticks after treatment			
		3 rd day	8 th day	15 th day	21 st day
1	15	06	07	08	08
2	16	07	08	10	10
3	12	06	07	07	05
Total	43	19	22	25	23
Results (%)		55.81%	48.83%	41.86%	46.51%

Effect of ginger extract on tick on male buffalo calf

The extracts of ginger extract was applied on the skin of three male buffalo calves, 75gm/50kg body weight each animal. The animals then observed on 3rd, 8th, 15th and 21st days of post application of ginger extract. The effectiveness of ginger extract was observed on 3rd day 63.46%, 8th day 51.92%, 15th day 51.92% and on 21st day 61.54%, respectively. The data was regarding results of the effect of ginger on ticks are shown in Table 3.

Table 3: Effect of ginger extract on tick on male buffalo calf

Animals	No. of ticks before treatment	No. of ticks after treatment			
		3 rd day	8 th day	15 th day	21 st day
1	12	05	07	07	06
2	15	06	07	07	04
3	25	08	11	11	10
Total	52	19	25	25	20
Results (%)		63.46%	51.92%	51.92%	61.54%

Effect of garlic extract on tick on male buffalo calf

The garlic extract was applied on the skin of three male buffalo calves at 75gm/ 50kg body weight each animal then observed on 3rd, 8th, 15th and 21st days of post application of garlic extract. The effectiveness of garlic extract was observed on 3rd day 32.61%, 8th day 39.13%, 15th day 36.96% and on 21st day 30.43%, respectively. The data was regarding results of the effect of the garlic on ticks are shown in Table 4.

Table 4: Effect of garlic extract on tick on male buffalo calf

Animals	No. of ticks before treatment	No. of ticks after treatment			
		3 rd day	8 th day	15 th day	21 st day
1	24	19	15	15	17
2	7	05	04	05	06
3	15	07	09	09	09
Total	46	31	28	29	32
Results (%)		32.61%	39.13%	36.96%	30.43%

Effect of different agents on ticks on male buffalo calf

The extracts of different ethno-veterinary plants (neem, ginger, garlic), and the ivermectin was applied on the male buffalo calves, 75gm/ 50kg body weight of each plant and 1cc/ 50kg body weight on each animal. The animal then observed on 3rd, 8th, 15th and 21st days of post application. On 3rd day the effectiveness of Ivermectin found 25.92%, Neem seed extract 55.81%, Ginger extract 63.43% and Garlic extract 32.61%. On day 8th it was observed, Ivermectin 37.03%, Neem seed extract 48.83%, Ginger extract 51.92% and Garlic 39.13%. On 15th day the results were as, Ivermectin 92.60%, Neem seed extract 41.86%, Ginger extract 51.92% and Garlic 36.96%. Whereas, on 21st day the Ivermectin 100%, Neem seed extract 46.51%, Ginger extracts 61.54% and Garlic 30.43%, respectively. The analysis of variance (ANOVA) showed that there was non-significant difference in the effect of drugs and in the period of attacked tick repellency ($P > 0.05$) further, the data regarding results Ivermectin and the extracts of Neem seed, Ginger and Garlic are shown in Table- 5.

Table 5: Effect of different agents on ticks on male buffalo calf

S. No.	Agents	Effect on Ticks in Percent			
		3 rd day	8 th day	15 th day	21 st day
1	Ivermectin	25.92	37.03	92.60	100
2	Neem seed Extract	55.81	48.83	41.86	46.51
3	Ginger Extract	63.46	51.92	51.92	61.54
4	Garlic extract	32.61	39.13	36.96	30.43

Economical difference between ethno-veterinary plants and Ivermectin

In order to determine the economical difference between ethno plants and ivermectin, the prices were compared in the Table 6. The economical agent was found neem seed extract which is free of cost in our circumstances and have highest tick repellent activity. Ginger was also an economical ethno plant, which provided satisfactory results on low prices followed garlic. The ivermectin is the drug of choice for the treatment of ecto-parasites, it is somewhat costly than the ethno-veterinary plants but provided more satisfactory results than those plants.

Table 6: Economical difference between ethno-veterinary plants and Ivermectin

S. No.	Agents	Quantity/ Animal	Price/Animal	Results
1	Ivermectin	1cc/ 50kg bw	15	100%
2	Ginger extract	75gm/ 50kg bw	10	61.54%
3	Garlic extract	75gm/ 50kg bw	07	30.43%
4	Neem seed extract	75gm/ 50kg bw	05	46.51%

Discussion

Ethno-veterinary medicine is the given name to the way in which most livestock keepers in most of the countries treat animal health problems. Ethno plant extracts are integral part of traditional medical practices in many countries of the developing world. A large proportion of the population uses this form of ailments in their livestock because of their easily available, inexpensive and effective, especially in rural areas where veterinary services are absent or irregular and expensive. Khan *et al.*, (1993) investigated the prevalence of ticks on different livestock species also in Pakistan and the infestation rates in cattle and buffaloes were 28.2 and 14.7%, respectively. Soulsby, (1982) reported that the ticks may transmit the disease *Babesiabigemina* that rise in temperature, red urine, anaemia, inappetence, jaundice, emaciation to the death. This study is an agreement with the (Schmuttereret *al.*, 1981; Choudhury, 2009) who reported that the neem tree is an evergreen except in the driest areas found throughout the tropics and subtropics of the world that flourishes in arid and semi-arid areas. *Azadirachtaindica* is used against various ailments including helminth parasites. Ginger, *Z. officinale* (L.) Rosc) has been used as spice for over 2000 years (Bartley and Jacobs, 2000).

Ivermectin is a drug which is the tick parasites control that effects to a neurologic damage to the parasite which resulted in paralysis and the death of the parasites. Ticks are economically the most important pest of cattle, buffalo and other domestic animals in tropical and subtropical countries. They act as vectors of a number of pathogenic micro organisms and protozoans. The ivermectin is more potent drug against tick infestation and gives 100% results. Helen and Chesterman, (2005) described that the tick (adult male and female) and nymphs were markedly susceptible on ivermectin. The results of present study was also similar to the findings of Helen and Chesterman (2005), that the effect of ivermectin is found more potent drug against tick infestation and provide 100% results within limited time against parasites. John, (2002) reported in natural history of ticks with the investigation ethno-veterinary method practiced by the owners for the treatment of common disorders of digestive tract (indigestion, colic and diarrhea), respiratory tract (cold/rhinitis, pneumonia) as well as against ectoparasites (mange, ticks, lice and flies). The present findings supports the earlier observation of Ninkov and Savin, (1986), Nettleton and Beckett, (1976) and Shannon *et al.*, (1995) who reported 90% to 100% efficacy of ivermectin against tick infestation in calves. It was seen that no ectoparasites were present on body of animal after 7th day to the end the experiment.

The neem seed extract found with both activities like repellent and killing behavior further, results are in agreement with (Ndumu *et al.*, 1999) who reported the undiluted neem extract with 100% concentration established 100% mortality and the larvae stages, after 48h of application and their smell repelled the adult stages of ticks. Similarly, reported by (Zuber *et al.*, (2003) in tick removal; densities on animal treated with neem seed extract were lower than on untreated animals, they also further, suggested the neem seed extract is effective in controlling ecto-parasites of live stock. *In vitro* toxicity of neem seed oil was tested against the larvae of tick, *Boophilus decoloratus* (*Ixodidae* or hard tick) parasitic mainly to cattle. The 20, 40, 60, 80 and 100% concentrations of neem seed oil were found to kill all 100% mortality (Chaudhery, 2009). The garlic also acts as good repellent (USDA, 1975) with its insecticidal plants. During research, it was found that garlic repelled the ticks, which was also reported by (USDA, 1975) further they suggested that garlic may be considered as tick repellent for individuals and populations at high risk for tick bites, rather than other agents that might have more adverse effects. The ginger was found good repellent in present study. Similar, findings found by (Watt and Breyer-Brandwijk, 1962) who reported some medicinal and poisonous plants and some of the ginger used to control external parasites as ticks. Similar findings were also reported by (Kapushi, 1992; Moyol and Mastika, 2009) who naturally made products controlled the ticks through integrated tick management in Africa, the farmers use plants (6.8%) mainly the neem, ginger and garlic against ecto-parasites of livestock with good results. In conclusion, as we observed that the tick infestation was played a significant cause of economic losses to the livestock and dairy industry throughout the world so, the use of vaccines for tick control is on the possibility basis with the different many side effects. If we manage it with IPM tool as biological control rather be better.

References

1. Abdullah, G. A., A. Raza, F. Illahi, M. A. Kalwar M. Lal, and S. Fazlani, 2009a. Study establishes Ginger as a high tick repellent. *Agri. Vet. News*. Pp. 8
2. Abdullah, G. A., A. Raza, F. Illahi, M. A. Kalwar M. Lal, and S. Fazlani, 2009b. Study establishes Ginger is highly tick repellent. Study Bureau report. Dwannews paper. 10th May.
3. Aeschlimann, A., and T. A. Freyvogel, 1995. "Biology and distribution of ticks of medical importance". In Jürg Meier & Julian White. *Handbook of Clinical toxicology of Animal Venoms and Poisons* 236. CRC Press. pp. 177–189.
4. Anonymous, 1992. *Neem, A tree for solving global problems*. Washington DC: National Academy Press; 1992. National Research Council; pp. 60–1.
5. Bartley, J., and A. Jacobs, 2000. Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). *J. Sci. Food and Agri.*, 80, 209–215.
6. Choudhury, M. K., 2009. Toxicity of neem seed oil against the larvae of *Boophilus decoloratus*, a one-host tick in cattle. *Indian J. Pharm. Sci.*, 71(5): 562–563.
7. Choudhury, M. K., 2001. Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Rhipicephalus sanguineus* a three-host tick in dog. *J Parasitic Dis.*, 25:46–7.
8. Choudhury, M. K., 2003. Efficacy of neem leaf (*Azadirachta indica*, family: Meliaceae) in the control of larvae of *Boophilus decoloratus* a one-host tick in cattle. *J. Nepal Pharm. Assn.*, 21: 41–3.
9. Chungsamarnyart, N., and W. Jansawan, 1991. Effect of *Tamarindus indicus* L. against the *Boophilus microplus*. *Kasetsart J. Nat. Sci.*, 35: 34-39.
10. Dennis, D. T., and J. F. Piesman, 2005. "Overview of tick-borne infections of humans". In Jesse L. Goodman et al. *Tick-borne Diseases of Humans*. ASM Press. pp. 3–11. ISBN 978-1-55581-238-6.
11. Dewivedi, S. K., and M. C. Sharma, 1986. Studies on a herbal preparation against scabies in indigenous pigs. *Indian J. Vet. Med.* 6: 51-53.
12. Ermel, K., Pahlich, E. and H. Schmutterer, 1987. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. In Schmutterer and Ascher (eds.) *Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*, pp. 171-184. GTZ, Eschborn, Germany.
13. FAO., 1985. *Handling and storage of food grains*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
14. FAO., 1988. *Traditional food plants*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
15. Golob, P. and D. J. Webley, 1980. The use of plants and minerals as traditional protectants of stored products. *Tropical Products Institute G 138*. Now Post harvest pest and quality section, Natural Resources Institute, Chatham, United Kingdom.
16. Grainge, M., and S. Ahmed, 1988. *Hand book of plants with pest-control properties*. Resource systems institute, East-West center, Honolulu, Hawaii. John Wiley & Sons, New York.
17. Gruber, A. K., 1991. *Wachstum, Fruchtertrag und Azadirachtin gehalt der Samen von Azadirachta indica A. Juss aufverschiedenen Standorten in Nicaragua*. PhD-thesis, Technische Universität, Berlin, Germany.
18. Hannan, A. S., M.A., Mostofa, M., Haque, M.A. and M.A. Alim, 2001. Efficacy of Ivomec® pour on against gastrointestinal nematodes, lice and ticks in goats. *Bangl. Vet. J.*, 18: 95-98.
19. Helen, C. J., and M. P. Chesterman. 2005. In-vivo effect of Ivermectin on *Rhipicephalus appeniculates*: the influence of tick feeding pattern and drug pharmacokinetics. *Experimental and applied Acarology* Springer Netherlands. 7(2): 109-119.
20. John, F. A., 2002. The natural history of ticks, *Medical Clinics of North America*. 86(2): 205-218.
21. John, B. G., H. John and J. W. Peter, 2005. Ethno-veterinary plant preparations as livestock dewormers practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. *Animal Health Res. Reviews*. 6: 91-103.
22. Kapushi, C. K. M., 1992. The role of natural products in integrated tick management in Africa. *Insect Sci. Applic.*, 13: 595-598.
23. Khan, M. N., C. S. Hayat, Z. Iqbal, B. Hayat and A. Naseem, 1993. Prevalence of ticks on livestock in Faisalabad (Pakistan). *Pakistan Vet. J.*, 13(4): 182- 184.

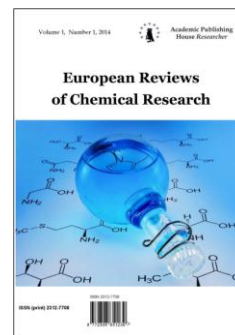
24. Lal, M., S. Fazlani, F. Memon, M. A. Kalwar and A. R. Mastoi, 2009. SAU students find ginger as best tick repellent. SAUNI news letter. Pp. 11-13.
25. Mannan, M. A., Rafiq, K., Mostofa, M. and Q. Hasan, 1997. Comparative efficacy of Ivermectin Neguvon and Neem-tobacco Herbal preparations 106 against naturally occurring humpsores lesions in cattle. *Bangl. Vet. J.*, 31: 119-122.
26. Moyol, B., and P. J. Mastika, 2009. Tick control methods used by resource limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the eastern cape province, South Africa.
27. National Research Council. 1992. *Neem – a tree for solving global problems*. National Academy Press, Washington.
28. Ndumu, P.A., J. B. George, M, K. Choudhury, 1999. Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. *Phytother Res.*, 13: 532-4.
29. Nettleton, P., and P. Beckett, 1976. Haematology of indigenous goat in Swaziland. *Bulletin of Tropical Animal Health and Production Africa*, 8: 60-61.
30. Ninkov, D.H., and W. Savin, 1986. The comparative field efficacy of two anthelmintic topical pour on formulation in cattle. *Agri-Practice*, 17:28-31.
31. Pathak, D., V. C. Mathur, B. R. Latha and L. John, 2004. In vitro effect of indigenous plant extracts on ixodid ticks of small ruminants. *Ind. J. Animal Sci.*, 74(6): 616-617.
32. Shannon, R.P., Sangwan, W. K. Langholef, L. G. Cramer, and J. S. Eagleson, 1995. An ivermectin tablet for sheep; efficacy against gastrointestinal nematodes and a bioavailability comparison with a liquid ivermectin formulation. *Veterinary Parasitology*. 60: 297-302.
33. Saxena, R. C., 1993. Neem as a source of natural insecticides - an update. In *Botanical pesticides in integrated pest management*. Indian Society of Tobacco Science, 1-24, Rajahmundry, India. IRRI, Manila, Philippines.
34. Saxena, R. C., G. Jilani, and A. A. Kareem, 1989. Effects of neem on stored grain insects. In Jacobson (ed.) *Focus on phytochemical pesticides*. Volume I. The neem tree. CRC Press, Boca Raton, Florida.
35. Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.*, 35: 271-97.
36. Schmutterer, H., and K. R. S. Ascher, (eds.). 1984. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proceedings of the second international neem conference, Rauischholzhausen, Germany, 25- 28 May, 1983. GTZ, Eschborn, Germany.
37. Schmutterer, H., and K. R. S. Ascher, (eds.). 1987. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Proceedings from the third international neem conference, Nairobi, Kenya, 10-15 July 1986. GTZ, Eschborn, Germany.
38. Schmutterer, H., K. R. S. Ascher, and H. Rembold, (eds.). 1981. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica*) Rottach-EgernNeem Conference, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn, Germany.
39. Singh, R. P., 1987. Comparison of antifeedant efficacy and extract yields from different parts and ecotypes of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) trees. In Schmutterer and Ascher (eds.) *Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*, pp. 185-194. GTZ, Eschborn, Germany.
40. Soulsby E. J., 1982. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 7th ed. London: English Language Book Society/Bailliere Tindall; p. 462.
41. USDA, *Agricultural Handbook no. 154*. - 1975. *Insecticides from plants: a review of the literature, 1953-1971*. USDA *Agricultural Handbook no. 461-1989* (ed). The neem tree. Focus on phytochemical pesticides vol.1. CRS Press, Boca Raton, Florida.
42. Watt, J. M., and M. G. Breyer-Brandwijk, 1962. *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*. Livingstone, London.
43. Zuber, T. J. and E. J. Mayeaux, 2003. "Tick removal". *Atlas of Primary Care Procedures*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 63-67.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



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

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



UDC 579.871.08:577.112.385.4.08

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

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

¹Moscow 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

²The 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

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

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

Abstract

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

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

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

Введение

Обогащение молекул стабильными изотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) является важным методом в разнопрофильных биохимических и метаболических исследованиях с использованием аминокислот и других биологически активных соединений (БАС) [1]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения, включая ЯМР [2], ИК- и лазерную спектроскопию [3] и масс-спектрометрию [4]. Развитие этих методов детекции стабильных изотопов за последние годы позволило повысить эффективность биологических исследований, а также изучать структуру и механизм действия клеточных БАС на молекулярном уровне. В частности, ^2H - и ^{13}C -меченные аминокислоты применяются для изучения пространственной структуры и конформационных изменений белков, взаимодействия белковых молекул, а также в химических синтезах некоторых изотопно-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. ^2H - и ^{13}C -меченные аминокислоты могут быть получены с использованием химических, ферментативных и микробиологических методов. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и меченых субстратов и приводят к продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*-энантиомеров, для разделения которых требуются специальные методы [7]. Тонкие химические технологии синтеза ^2H - и ^{13}C -меченых аминокислот связаны с использованием комбинации химических и ферментативных подходов [8].

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Секретируемый *L*-фенилаланин и *L*-лейцин определяли на спектрофотометре Beckman DU- 6 (США) при $\lambda = 540$ нм, в образцах культуральной жидкости, объёмом 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 ^2H в молекулы аминокислоты за счёт ассимиляции [^2H]метанола незначителен.

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

Метод адаптации штамма *B. methylicum* к росту на $^2\text{H}_2\text{O}$ при сохранении способности к биосинтезу *L*-фенилаланина описан в работе [20]. В данной работе были исследованы образцы культуральной жидкости *B. methylicum* и гидролизаты биомассы, полученные в ходе многоступенчатой адаптации бактерий к тяжёлой воде на минимальных минеральных средах 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}C]аминокислот за счет ассимиляции $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ данный этап не является обязательным, поскольку этот изотопный субстрат не оказывает негативного биостатического эффекта на ростовые характеристики метилотрофов (см. табл. 1). Поэтому в случае *M. flagellatum* включение ^{13}C в молекулы аминокислот осуществляли в одну стадию за счет выращивания бактерий на водных средах М9, содержащих в качестве источника углерода-13 1 % [^{13}C]метанол.

Таблица 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ароматических [^2H]аминокислот в белке. Были рассмотрены два альтернативных варианта проведения гидролиза – кислотный и щелочной. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 M HCl, 24 ч, 110 °C), как известно, приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот [23]. Другим значительным недостатком при проведении гидролиза в HCl является изотопный (^1H - ^2H) обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтеронов) при атоме C3 аспарагиновой и C4 глутаминовой кислот [24]. Поэтому, чтобы получить реальные данные о биосинтетическом включении дейтерия в молекулы аминокислот необходимо проводить гидролиз белка с использованием дейтерированных реагентов (6 M ^2HCl с 3 % фенолом (в $^2\text{H}_2\text{O}$)).

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

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

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

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

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

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

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

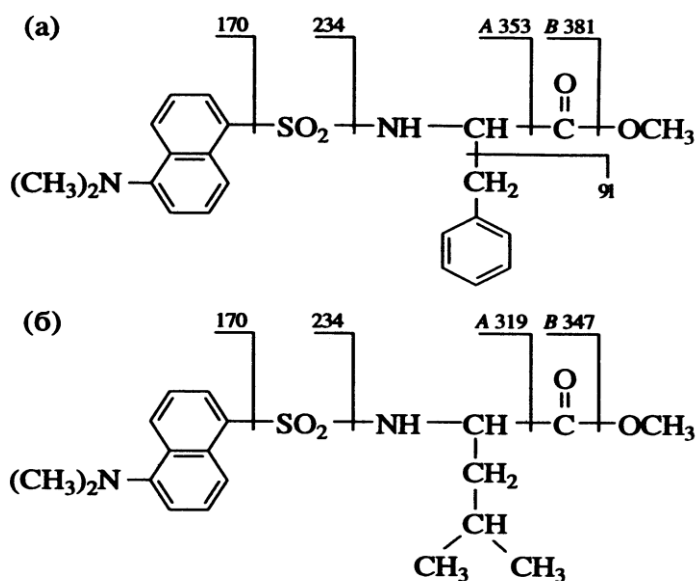
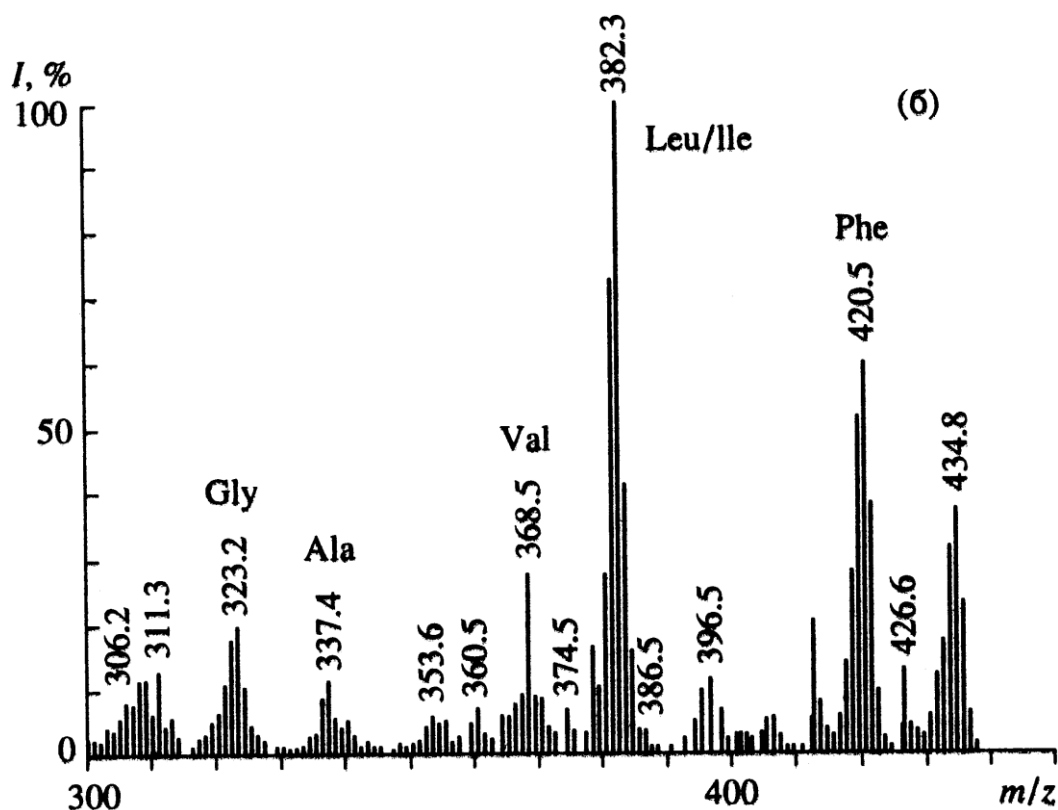


Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с $M_r = 412$ (а) и N-Dns-лейцина с $M_r = 378$ (б) при масс-спектрометрии электронного удара

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



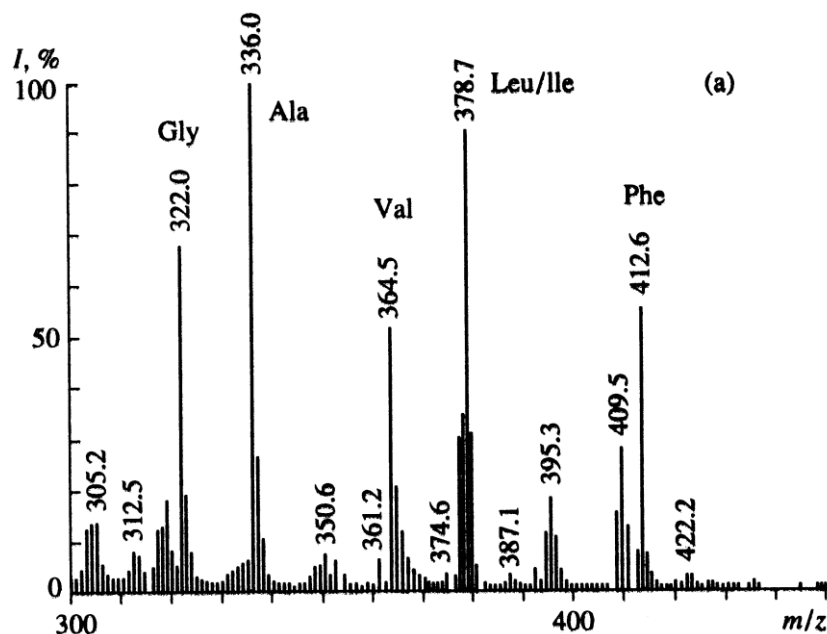


Рис. 2. Масс-спектры ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C аминокислот из КЖ *M. flagellatum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 1 % метанол и H_2O (контрольные условия); б) – 1 % ^{13}C метанол и H_2O . Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов $[\text{M}]^+$ метиловых эфиров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

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

Таблица 2

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

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

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

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

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

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

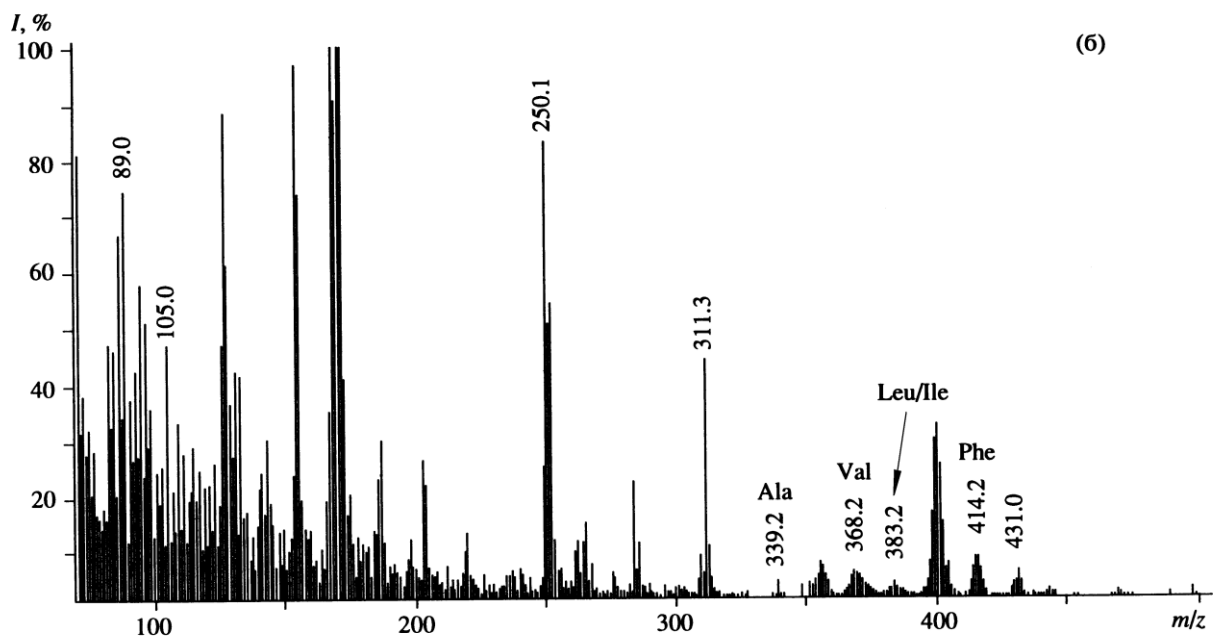
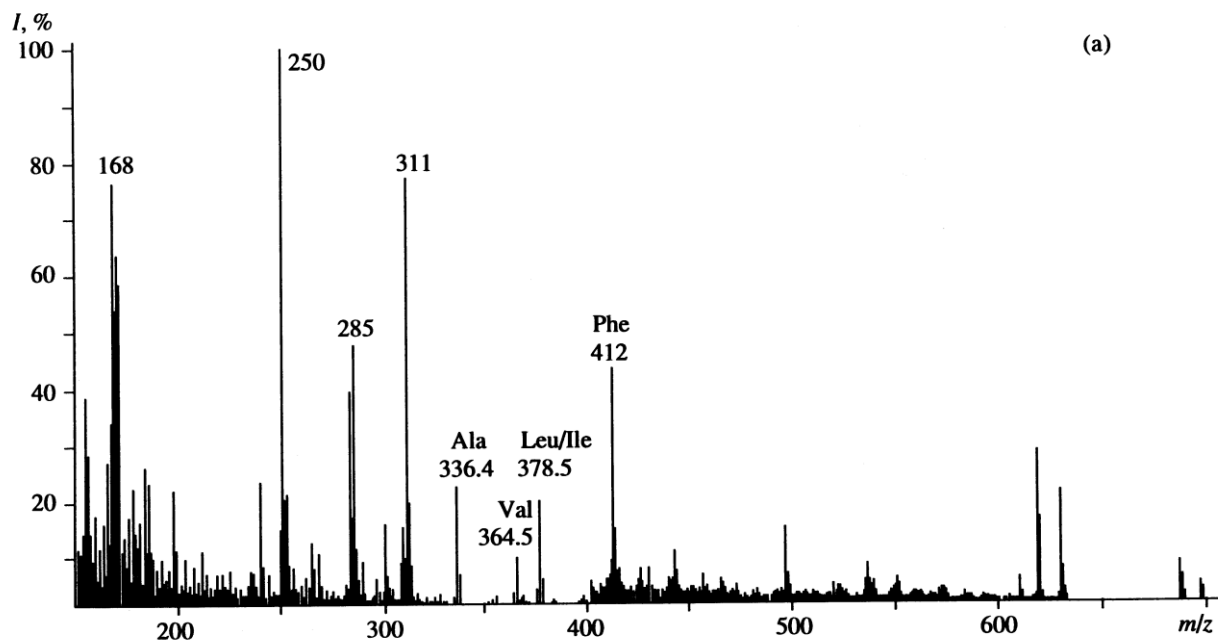


Рис. 3. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 2 % метанол и 98,0 % H_2O (контрольные условия); б) – 2 % [^2H]метанол и 49,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$

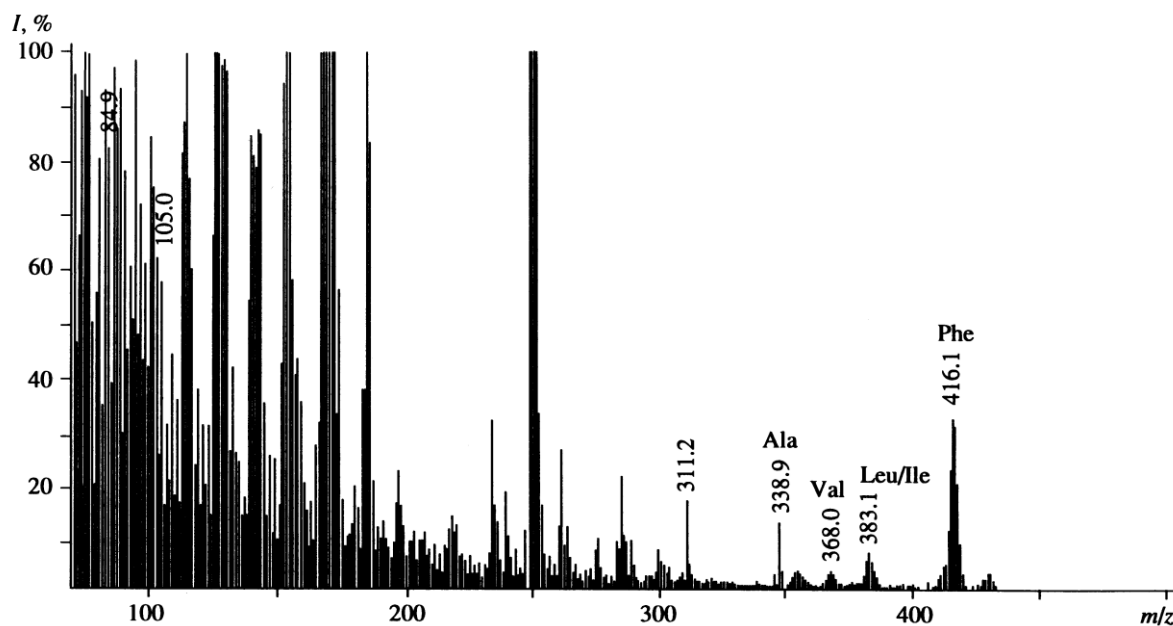


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$

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

Из таблицы 2 видно, что условиях ауксотрофности по *L*-лейцину уровни включения ^2H в молекулы [^2H]лейцина/[^2H]изолейцина ниже, чем для фенилаланина. Отмеченная особенность отчётливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$. Ещё раз этот результат подтвердили рисунок 5, где показан масс-спектр метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот культуральной жидкости после выращивания бактерий *B. methylicum* в указанных условиях. Видно, что величина пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-[^2H]фенилаланина (M^+) с $m/z = 418,0$ увеличивается по сравнению с контрольными условиями на 6 единиц, что соответствует замещению 75,0 ат.% от общего количества атомов водорода в молекуле. В отличие от [^2H]фенилаланина уровень включения дейтерия в [^2H]лейцин/[^2H]изолейцин составил 50,0 ат.%, а в [^2H]валин – 58,8 ат.%. Пик с m/z 432, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот КЖ на рис. 5 соответствует продукту дополнительного метилирования [^2H]фенилаланина по α - NH_2 - группе. Кроме этого, в масс-спектре фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [^2H]фенилаланина с m/z 97 (вместо m/z с 91 в контроле), что указывает на то, что местами локализации 6 атомов дейтерия в молекуле [^2H]фенилаланина являются положения $\text{C}1$ – $\text{C}6$ 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 [^2H]фенилаланина, так как метаболизм адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений в $^2\text{H}_2\text{O}$ [26].

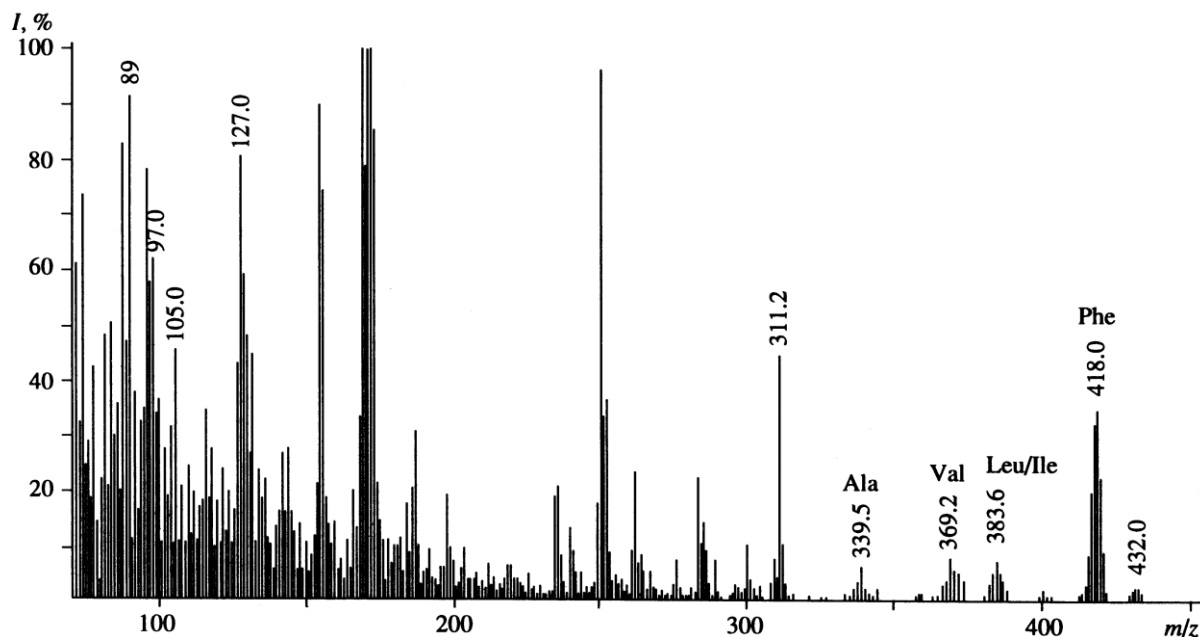


Рис 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^2H аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % ^2H метанол и 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (максимально дейтерированная среда)

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

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

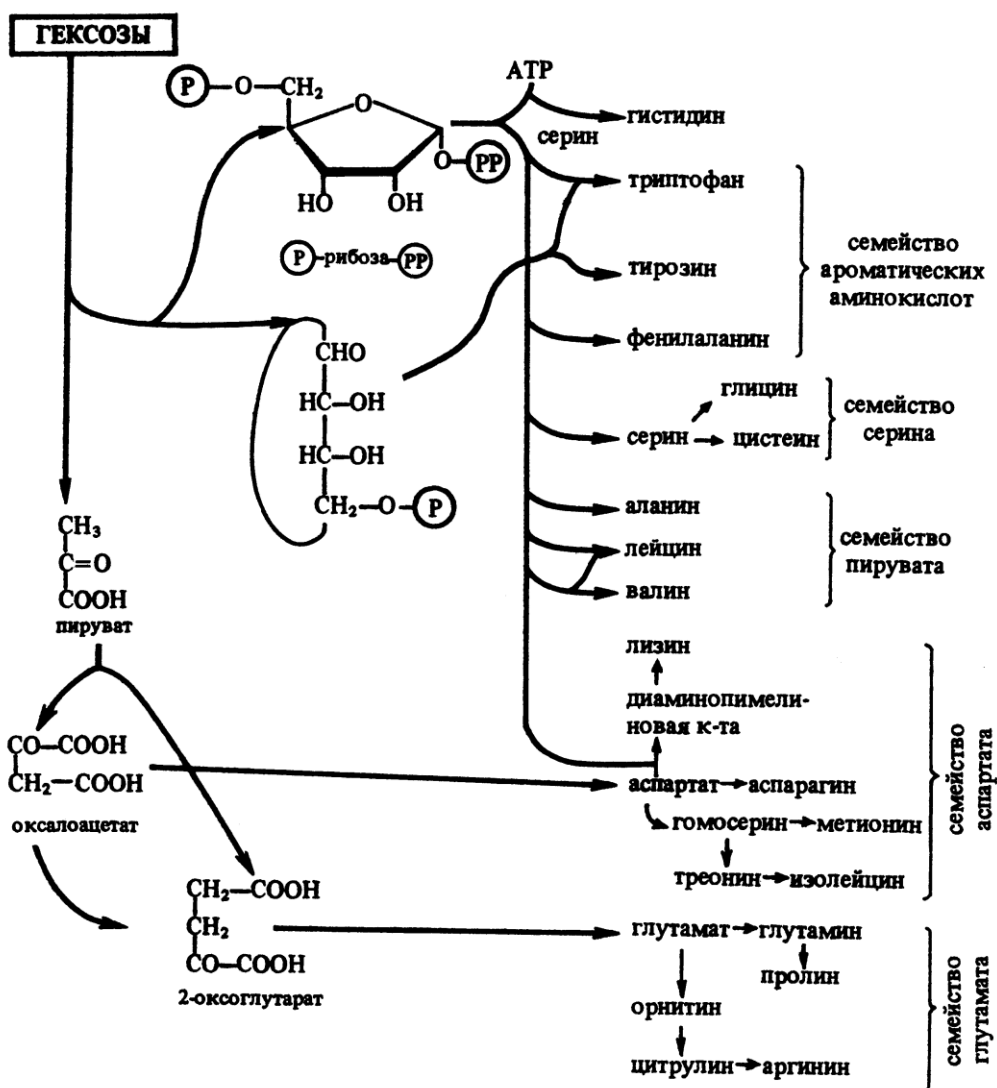


Рис. 6. Аминокислоты, необходимые для синтеза белков, образующиеся в клетке из предшественников (по Г. Шлегелю [27])

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

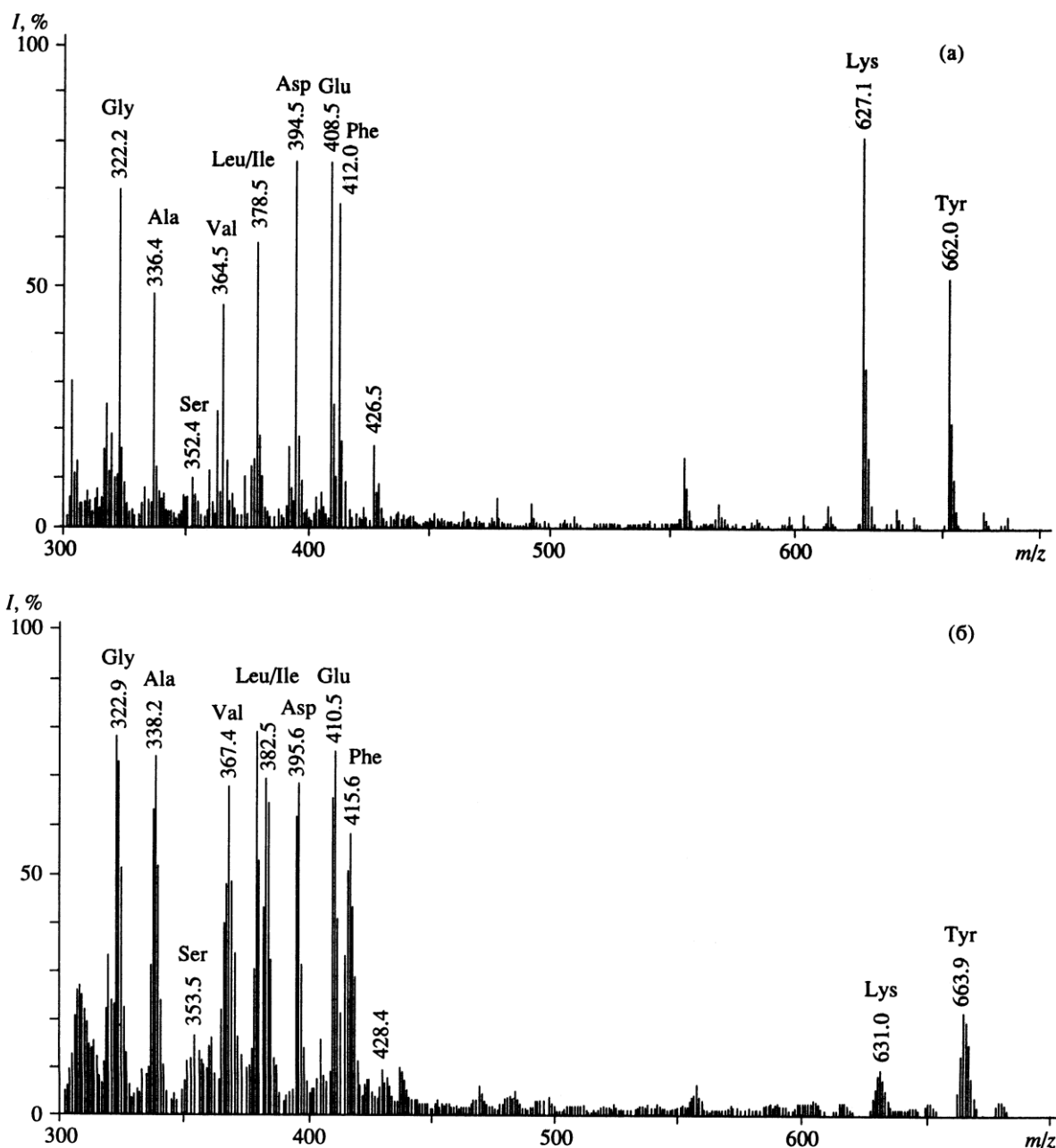


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из гидролизатов суммарных белков биомассы *B. methylicum* при выращивании в среде M9, содержащей 2 % метанол и H_2O (а) и 2 % [^2H]метанол и 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (б)

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

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

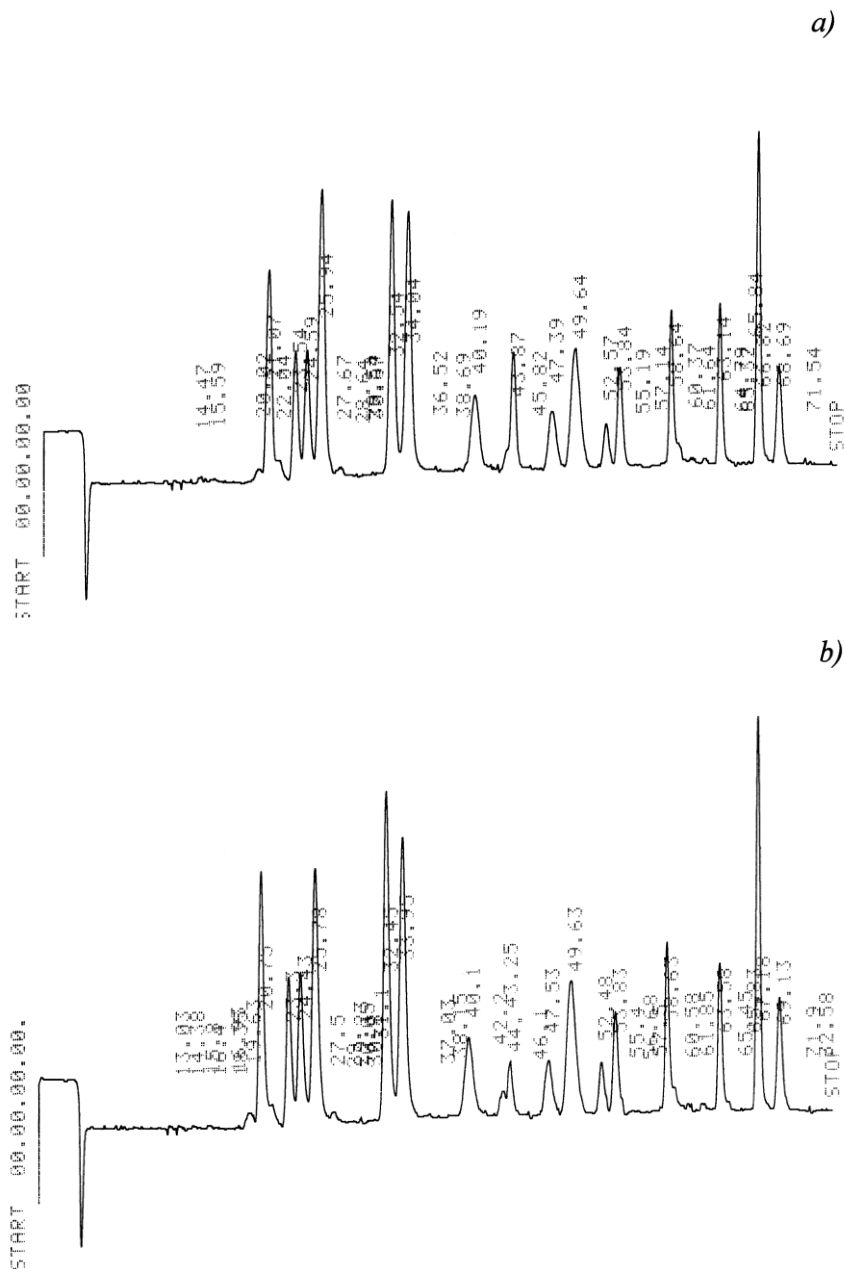


Рис. 8. Ионнообменная хроматография аминокислот, выделенных из гидролизатов протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток *B. methylicum* на максимально дейтерированной среде: Biotronic LC-5001 (230×3,2 mm) (“Eppendorf–Nethleler–Hinz”, Germany); подвижная фаза: UR-30 сульфонирующая стирольная смола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

Таблица 3

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

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы		Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода***
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в 98,0% ² H ₂ 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 % ²H₂O и 2 % [²H]метанолом.

** При подсчёте уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH₂ группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации и изотопного обмена в H₂O/²H₂O

*** Прочерк означает отсутствие данных.

Полученные данные свидетельствуют о возможности достижения максимальных уровней включения стабильных изотопов ²H и ¹³C 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 % ²H₂O (табл. 3). Как видно из табл. 3, при выращивании *V. methylicum* на среде с 98,0 % ²H₂O, уровни включения ²H в остатки глицина, аланина, фенилаланина и тирозина составляют 90,0; 97,5; 95,0 и 92,8 %. В экспериментах по включению изотопа ¹³C в суммарные белки биомассы за счёт ассимиляции [¹³C]метанола метилотрофными бактериями *M. flagellatum* также наблюдались высокие уровни изотопного включения в [¹³C]глицине (90,0 %), [¹³C]аланине (95,0 %) и [¹³C]фенилаланине (80,5 %) (табл. 2). Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, сниженные уровни включения стабильных изотопов в [¹³C]лейцине/изолейцине (49,0 %), а также в метаболически связанных с ним [¹³C]аминокислотах в этих условиях могут быть объяснены эффектом ауксотрофности штамма по *L*-изолейцину, который добавляли в ростовую среду в протонированном виде.

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

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

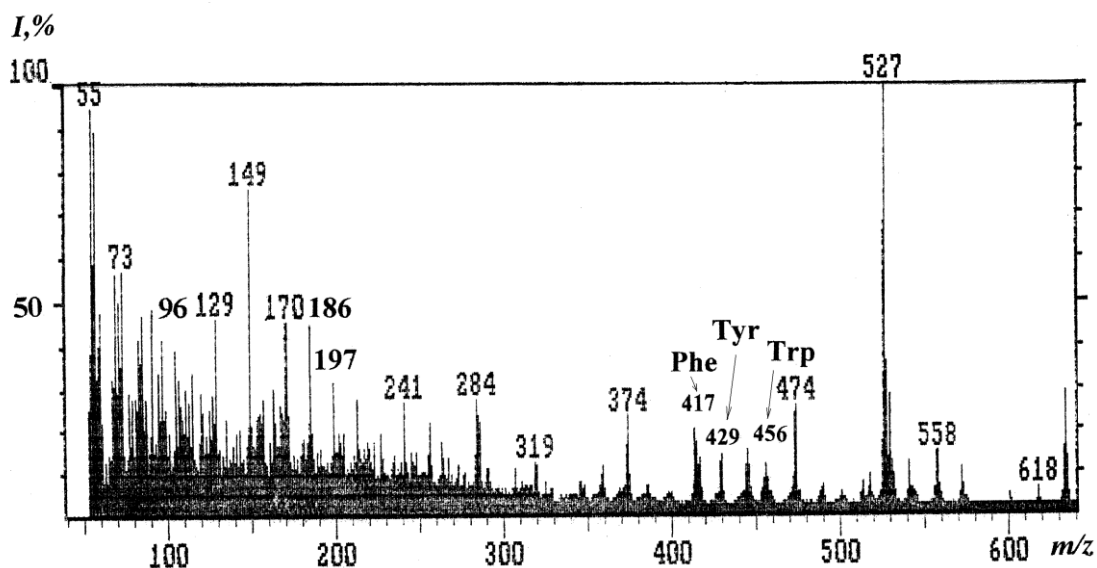


Рис. 8. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата бактериородопсина на синтетической среде с [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe (0,26 г/л), [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr (0,2 г/л) и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp (0,5 г/л)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

Таблица 4

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

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

* Прочерк означает отсутствие включения дейтерия

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

Выводы

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

Примечания:

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 579.871.08:577.112.385.4.08

Микробиологический синтез ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот и белков различного уровня изотопного обогащения

¹Олег Викторович Мосин

²Игнат Игнатов

³Дмитрий Анатольевич Складнев

⁴Виталий Иванович Швец

¹Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская федерация

Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук

103316, Москва, ул. Талалихина, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

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

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

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

³Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции

промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация

Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1.

E-mail: genetika@genetika.ru

⁴Московский государственный университет тонких химических технологий им.

М.В. Ломоносова, Российская Федерация

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

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

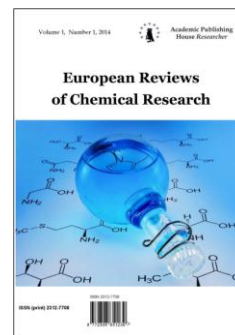
Аннотация. Методом микробиологического синтеза получены и исследованы масс-спектрометрией электронного удара уровни включения стабильных изотопов дейтерия (^2H) и углерода-13 (^{13}C) в молекулы секретлируемых аминокислот *L*-фенилаланин-продуцирующего штамма *Brevibacterium methylicum* и *L*-лейцин-продуцирующего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

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

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 1, No. 1, pp. 60-72, 2014

DOI: 10.13187/ejchr.2014.1.60
www.ejournal14.com



UDC 577.37 + 537.86

Biosynthesis of ^2H -labeled Photochrome Trans-membrane Protein Bacteriorhodopsin by Halobacterium *Halobacterium Halobium*

¹Oleg Mosin
²Ignat Ignatov

¹Moscow 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

²The 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

Abstract

The semi-preparative biosynthesis of photochrome trans-membrane protein bacteriorhodopsin (output 8–10 mg), labeled with deuterium on functionally important amino acid residues – [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 was carried out with using a photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium*. The protein was isolated from purple membranes by cellular autolysis by distilled water, processing of bacterial biomass by ultrasound at 22 KHz, alcohol extraction of low and high-weight molecular impurities, cellular RNA, carotenoids and lipids, with the subsequent solubilization of final product with 0,5 % (w/v) SDS-Na and fractionation by methanol. The homogeneity of the synthesized bacteriorhodopsin and the selectivity of deuterium incorporation into the molecule was proved by combination of preparative and analytical protein methods including electrophoresis in 12,5 % (w/v) PAAG with 0,1 % (w/v) SDS-Na, gel filtration chromatography on Sephadex G-200, reverse-phase HPLC and electron impact mass-spectrometry of methyl esters of N-Dns-[^2H]derivatives of amino acids.

Keywords: *Halobacterium halobium*; bacteriorhodopsin; [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe; [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr; [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp; biosynthesis; electron impact mass-spectrometry RP HPLC.

Introduction

Bacteriorhodopsin (BR), named by analogy to the visual apparatus of mammalian protein rhodopsin, was isolated from the cell membrane of extreme photo-organotrophic halobacteria *Halobacterium halobium* in 1971 by W. Stohenius and D. Osterhelt [1]. This photo-transforming trans-membrane protein with the molecular weight ~26,5 kDa represents chromoprotein determining the purple-red colour of halophilic bacteria, which contains as chromophore group an equimolar mixture of 13-*cis*-and 13-*trans*-retinol C20 carotenoid, bound by Schiff base (as in the visual animal pigments) with Lys-216 residue of the protein [2]. Along with the BR the cell

membrane of halobacteria contains a small amount of other related carotenoid pigments, the primary of which bacterioruberin determining the stability of halobacteria to solar radiation.

In its structure and location in the cell membrane BR refers to integral transmembrane proteins, penetrating the cell membrane, which is divided into three fractions: yellow, red and purple. Purple membrane (PM) fraction comprising on 75 % (w/w) of cell membrane consists from carotenoids, phospholipids (mostly phosphoglycerol diesters with a small amount of nonpolar lipids and isoprenoids) forms a natural two-dimensional crystals which can be investigated using X-ray scattering. BR molecule has seven α -helical protein segments with with symmetrically located retinal residue in the middle. These α -helical segments, arranged in PM in an orderly manner forming trimers with an average diameter $\sim 0,5 \mu\text{m}$ and a thickness 5–6 nm; each trimmer is surrounded by six others so that to form a regular hexagonal lattice. The BR molecule is arranged in a direction perpendicular to the plane of the membrane, hydrophobic domains represent transmembrane segments and hydrophilic domains protruding from the membrane, connect the individual α -helical intramembranous segments of the BR molecules.

Owing to its structure, BR acts as a light-dependent proton pump, pumping protons across the cell membrane and generates an electrochemical gradient of H^+ on the surface of the cell membrane, which energy is used by the cell for the synthesis of ATP in the anaerobic photosynthetic phosphorylation. This mechanism is called “non-chlorophyll photosynthesis”, in contrast to the plant photosynthesis implemented with the participation of chlorophyll. In this mechanism, at absorption of a light photon BR molecule became decolorized by entering into the cycle of photochemical reactions, resulting in the release of a proton to the outside of the membrane, and the absorption of proton from intracellular space [3]. By the absorption of a light photon is occurred reversible isomerization of 13-*trans*-BR ($\lambda_{\text{max}} = 548 \text{ nm}$) (the quantum yield 0,03 at $t = 22 \text{ }^\circ\text{C}$) into the 13-*cis*-BR ($\lambda_{\text{max}} = 568 \text{ nm}$), initiating a cascade of photochemical reactions lasting from 3 ms to 1 ps with the formation of transitional intermediates J, K, L, M, N, and O, followed by separation of H^+ from the retinal residue of BR and its connection from the side of cytoplasm (Fig. 1). As a result, between the internal and external surface of the membrane forms a concentration gradient of H^+ , which leads that illuminated halobacteria cells begin to synthesize ATP, i.e. convert light energy into energy of chemical bonds. This process is reversible and in the dark flows in the opposite direction, allowing halobacteria develop in the dark by means of switching the heterotrophic photosynthetic metabolism. Thus, the BR molecule behaves as a photochromic carrier with a short relaxation time – the transition from the excited state to the ground state. Optical characteristics for BR are dynamic and vary depending on the method for preparation of purple membranes (PM), the polymer matrix and its composition.

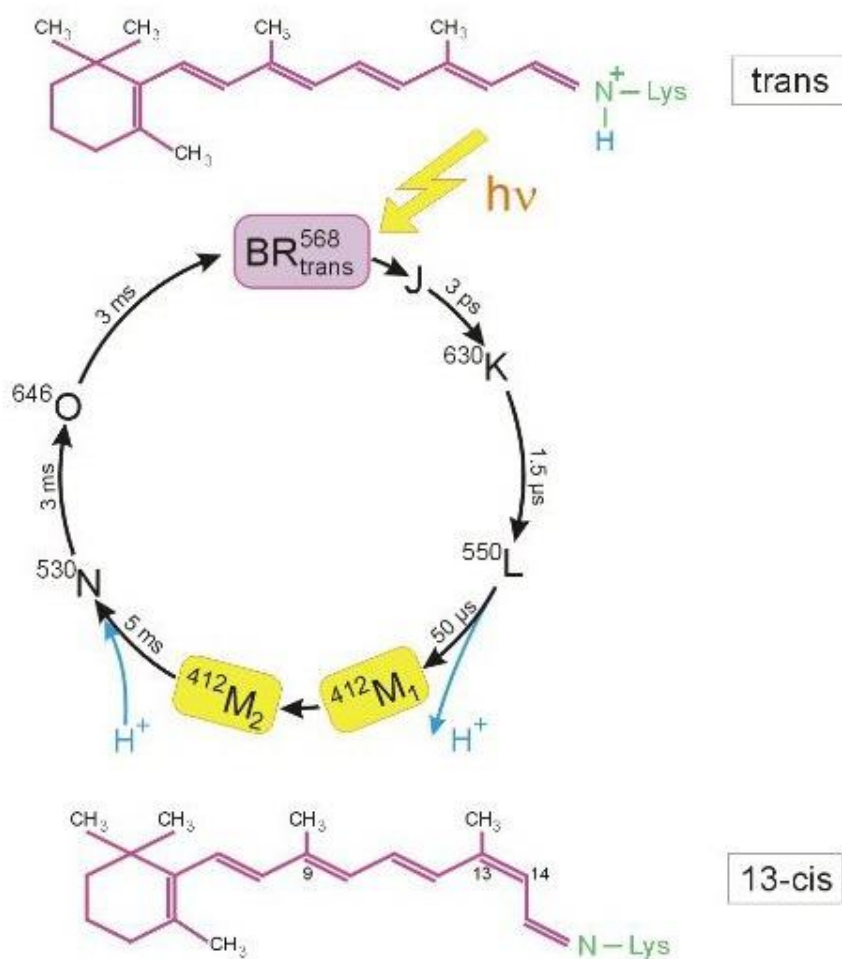


Figure 1. Photocycle scheme of BR (aqueous solution, pH = 7,2, t = 22 °C). Latin numbers J, K, L, M, N, O denote the spectral intermediants of BR. M₁ and M₂ represent spectral intermediants of *meta*- bacteriorhodopsin with the protonated and deprotonated aldimine bond. The superscripts correspond to the position of the absorption maximum intermediatorov photocycle (nm).

BR is the focus of bio-and nanotechnology mainly because of its high sensitivity and resolution, and is used in molecular bioelectronics as natural photochromic material for light-controlled electrical regulated computer modules and optical systems [4–6]. Additionally, BR is very attractive as a model for studies of functional activity and structural properties of photo-transforming membrane proteins in the native and photo-converting membranes. For these studies it is useful to enter into the protein molecule a deuterium label (²H), which allows to apply for evaluating of the structure by NMR-method [7]. In this aspect great scientific and practical interest has BR labeled with deuterium on the residues of functionally important aromatic amino acids – phenylalanine, tyrosine and tryptophan involved in the hydrophobic interaction of the polypeptide chain of the protein with the lipid bilayer of the cell membrane. ²H-labeled aromatic amino acids can be synthesized in gram scale quantities by isotopic exchange (H-²H) in molecules of the protonated amino acids; for analyzing deuterium enrichment levels the EI mass-spectrometry of N-5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl) amino acid derivatives may be used [8–10].

The purpose of this research was to study the micro preparative biosynthesis of BR labeled with deuterium on the residues of functionally important aromatic amino acids – [2,3,4,5,6-²H₅]phenylalanine, [3,5-²H₂]tyrosine and [2,4,5,6,7-²H₅]tryptophan, for the reconstruction of

artificial membranes, as well as to study of the levels of deuterium enrichment of the BR molecule by EI mass spectrometry in combination with RP HPLC.

Material and methods

As a BR producer was used a carotenoid strain of extreme photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium* ET 1001, obtained from Moscow State University (Russia). The strain was modified by selection of individual colonies on solid agarose media with 2 % (w/v) peptone and 4,3 M NaCl.

For the synthesis of aromatic [²H]amino acids were used the protonated *D,L*-amino acids ("Reanal", Hungary), ²H₂O (99,9 atom.% ²H), ²HCl (95,5 atom.% ²H), and ²H₂SO₄ (97,5 atom.% ²H), purchased from the Russian Research Center "Isotope" (St. Petersburg, Russia). For the synthesis of methyl esters of DNS-amino acids used 5-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride (Dns-chloride) ("Sigma", USA) and diazomethane, prepared from *N*-nitrosourea ("Merck", Germany). The inorganic salts were crystallized in 99,9 atom.% ²H₂O, ²H₂O was distilled over KMnO₄ with subsequent control of the isotope purity by ¹H-NMR spectroscopy on a Bruker WM-250 ("Bruker Daltonics" Germany) with a working frequency 70 MHz (internal standard Me₄Si).

Chemical synthesis of *L*-[2,3,4,5,6-²H₅]phenylalanine (95 atom.% ²H), *L*-[3,5-²H₂]tyrosine (96 atom.% ²H) and *L*-[2,4,5,6,7-²H₅]tryptophan (98 atom.% ²H) was performed according to the method of isotopic exchange (¹H-²H) in molecules of protonated aromatic amino acids, reported yealier [11].

Synthesis of methyl esters of *N*-Dns-[²H]amino acids was performed as discribed in the article [12].

Biosynthetic BR (yield 8–10 mg from 1 g biomass) was obtained in synthetic (SM) medium in which the protonated phenylalanine, tyrosine and tryptophan were replaced by their deuterated analogs – [2,3,4,5,6-²H₅]phenylalanine, [3,5-²H₂]tyrosine, and [2,4,5,6,7-²H]tryptophan (g/l): *D,L*-alanine – 0,43; *L*-arginine – 0,4; *D,L*-aspartic acid – 0,45; *L*-cysteine – 0,05; *L*-glutamic acid – 1,3; *L*-lycine – 0,06; *D,L*-histidine – 0,3; *D,L*-isoleucine – 0,44; *L*-leucine – 0,8; *L*-lysine – 0,85; *D,L*-methionine – 0,37; *D,L*-phenylalanine – 0,26; *L*-proline – 0,05; *D,L*-serine – 0,61; *D,L*-threonine – 0,5; *L*-tyrosine – 0,2; *D,L*-tryptophan – 0,5; *D,L*-valine – 1,0; AMP – 0,1; UMP – 0,1; NaCl – 250; MgSO₄·7H₂O – 20; KCl – 2; NH₄Cl – 0,5; KNO₃ – 0,1; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; Na⁺-citrate – 0,5; MnSO₄·2H₂O – 3·10⁻⁴; CaCl₂·6H₂O – 0,065; ZnSO₄·7H₂O – 4·10⁻⁵; FeSO₄·7H₂O – 5·10⁻⁴; CuSO₄·5H₂O – 5·10⁻⁵; glycerol – 1,0; biotin – 1·10⁻⁴; folic acid – 1,5·10⁻⁴; vitamin B₁₂ – 2·10⁻⁵. The growth medium was autoclaved for 30 min at 0,5 atm, the pH value was adjusted to 6,5–6,7 with 0,5 M KOH. Bacterial growth was performed in 500 ml Erlenmeyer flasks (volume of the reaction mixture 100 ml) for 4–5 days at 35 °C on a shaker ("Birad Labs", Hungary) under intense aeration and monochromatic illumination (3 lamps × 1,5 lx). All further manipulations with BR isolation were carried out with the use of a photomask lamp equipped with an orange light filter.

Biomass (1 g) was washed with distilled water and pelleted by centrifugation on T-24 centrifuge ("Carl Zeiss", Germany) (1500 g, 20 min). The precipitate was suspended in 100 ml of dist. H₂O and kept for 3 h at 4 °C. The reaction mixture was centrifuged (1500 g, 15 min), the pellet was resuspended in 20 ml dist. H₂O and disintegrated by infrasound sonication (22 kHz, 3 times × 5 min) in an ice bath (0 °C). The cell homogenate after washing with dist. H₂O was resuspended in 10 ml of buffer containing 125 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, and 4 mM Tris-HCl (pH = 8,0), then 5 mg of RNA-ase (2–3 units of activity) was added. The mixture was incubated for 2 h at 37 °C. Then 10 ml of the same buffer was added and kept for 10–12 h at 4 °C. The aqueous fraction was separated by centrifugation (1500 g, 20 min), the precipitate of cell debris containing purple membranes (PM) was treated with 50 % (v/v) ethanol (5 times × 7 ml) at 4 °C followed by separation of the solvent. This procedure was repeated 6 times to give a colorless washings. The protein content in the samples was determined spectrophotometrically on DU-6 spectrophotometer ("Beckman Coulter", USA) by the ratio D₂₈₀/D₅₆₈ (ε₂₈₀ = 1,1·10⁵; ε₅₆₈ = 6,3·10⁴ M⁻¹·cm⁻¹) [13]. PM regeneration is performed as described in [14]. Yield of PM fraction 120 mg (80–85 %).

For isolation of BR the fraction of PM (in H₂O) (1 mg/ml) was dissolved in 1 ml of 0,5 % (w/v) SDS-Na, and incubated for 5–7 h at 37 °C followed by centrifugation (1200 g, 15 min). The

precipitate was separated, then methanol was added to the supernatant in divided portions (3 times \times 100 ml) at 0 °C. The reaction mixture was kept for 14–15 h in ice bath at 4 °C and then centrifuged (1200 g, 15 min). Fractionation procedure was performed three times, reducing the concentration of 0,5 % SDS-Na to 0,2 and 0,1 % (w/v). Crystal protein (output 8–10 mg) was washed with cold distilled. $^2\text{H}_2\text{O}$ (2 times \times 1 ml) and centrifuged (1200 g, 15 min). Protein sample (5 mg) was dissolved in 100 ml of buffer solution and placed on a column (150 \times 10 mm), stationary phase – Sephadex G-200 (“Pharmasia”, USA) (specific volume packed beads – 30–40 units per 1 g dry Sephadex) equilibrated with buffer containing 0,1 % (w/v) SDS-Na and 2,5 mM EDTA. Elution proceeded by 0,09 M Tris-borate buffer containing 0,5 M NaCl, pH = 8,35 at a flow rate 10 ml/cm²h. Combined protein fraction was subjected to freeze-drying, in sealed glass ampoules (10 \times 50 mm) and stored in frost camera at -10 °C.

Electrophoresis of BR was performed in 12,5 % (w/v) polyacrylamide gel (PAAG) containing 0,1 % (w/v) SDS. The samples were prepared for electrophoresis by standard procedures (LKB protocol, Sweden). Electrophoretic gel stained with Coomassie blue R-250 was scanned on a CDS-200 laser densitometer (“Beckman”, USA) for quantitative analysis of the protein level.

For hydrolysis of BR 4 g of dry protein was placed into glass ampoules (10 \times 50 mm), and 5 ml 4 N Ba(OH)₂ was added. The mixture was kept at 110 °C for 24 h. The reaction mixture was suspended with 5 ml of hot distilled water and neutralized with 2 N H₂SO₄ to pH = 7,0. The precipitate of BaSO₄ was removed by centrifugation at 200 g for 10 min, and the supernatant was evaporated in a rotor evaporator at 40 °C.

RP-HPLC was carried out on a liquid chromatograph Knauer Smartline (“Knauer”, Germany) equipped with a pump Gilson (“Gilson Inc.”, USA), UF-2563 detector and integrator CR-3A (“Shimadzy”, Japan) using a column (250 \times 10 mm) with a stationary reverse phase Separon C18 (“Kova”, Slovakia), eluent: (A) – acetonitrile-trifluoroacetic acid 100:0,1–0,5 % (v/v) and (B) – acetonitrile – 100 % (v/v); elution rate – 1,5 ml/min; gradient: from 0 to 20 % B – 5 min, 20 to 100 % B – 30 min, 100 % B – 5 minutes, 100 % B to 0 – 2 min 0 % B – 10 min.

EI mass spectra of methyl esters of N-Dns-amino acid derivatives were obtained by electron impact on MB-80A device (“Hitachi”, Japan) at energy of ionizing electrons 70 eV, accelerating voltage of 8 kV and the cathode temperature 180–200 °C. Scanning was carried out at a resolution of 7500 relative units using 10 % sharpness.

Results and discussion

The strategy for biosynthesis of ^2H -labeled BR using a strain of extreme photo-organotrophic halobacterium *Halobacterium halobium* was determined by the study of the principal possibility for obtaining ^2H -labeled photochrome transmembrane proteins in semi-micropreparative quantities for reconstruction of artificial membranes in $^2\text{H}_2\text{O}$ and BR-containing nanofilms. [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 play important role in hydrophobic interacting of BR molecule with the lipid bilayer of the cell membrane. They are resistant to the isotopic exchange (H- ^2H) reactions in aqueous solutions under growth conditions and may be easily detected by IE spectrometry after the derivatization to the methyl esters of N-Dns-amino acids. ^2H -labeled BR obtained by growth of halobacterium *H. halobium* on synthetic medium (4,3 M NaCl) with [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. Under optimal growing conditions (incubation period 4–5 days, temperature 35 °C, illumination with monochromatic light at $\lambda = 560$ nm) in cells were synthesized the purple carotenoid pigment, the spectral ratio of protein and chromophore molecule fragments $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1,0$ in which was identical to the natural BR. The growth of the halobacterium on a synthetic medium (Fig. 2, b) was practically as the same as in the control (Fig. 2, a) on the protonated growth medium, that significantly simplifies the optimization of conditions for the biosynthesis of ^2H -labeled BR, which consists in the equivalent replacing of protonated aromatic amino by their deuterated analogues – [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]phenylalanine (0,26 g/l), [3,5- $^2\text{H}_2$]tyrosine (0,2 g/l) and [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]tryptophan (0,5 g/l).

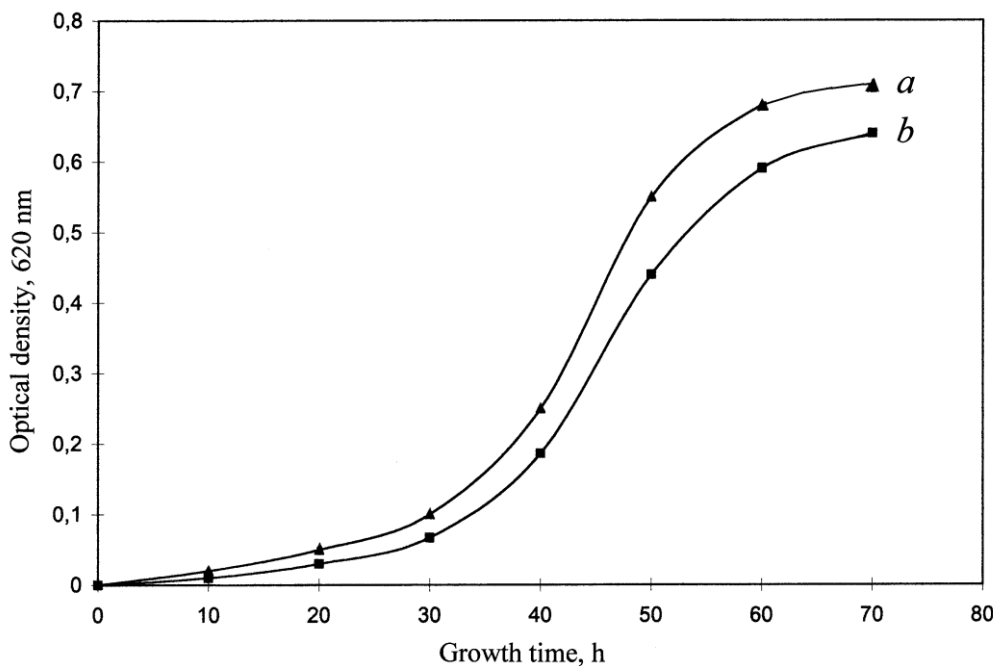


Figure 2. Growth dynamics of *H. halobium* under various experimental conditions: (a) – protonated synthetic medium; (b) – synthetic medium with [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe (0,26 g/l), [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr (0,2 g/l) and [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp (0,5 g/l). The incubation period: 4–5 days, temperature: 35 °C, illumination under monochrome light at $\lambda = 560$ nm.

The main stages of the experiment were: growing of a strain-producer *H. halobium* on synthetic medium with [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$] phenylalanine (0,26 g/l), [3,5- $^2\text{H}_2$] tyrosine (0,2 g/l) and [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$] tryptophan (0,5 g/l), the separation of cell content, isolation of purple membrane fraction (PM), the separation of low-and high-molecular impurities, cellular RNA, pigments (preferably carotenoids) and lipids, fractionation of solubilized in 0,5 % (w/v) SDS-Na protein by methanol, purification on Sephadex G-200, electrophoresis 12,5 % (w/v) PAAG with 0,1 % (w/v) SDS-Na. Because protein is localized in the PM, the release of low molecular weight impurities and intracellular contents was reached by osmotic shock of cells with distilled water in the cold after the removal of 4,3 M NaCl and the subsequent destruction of the cell membrane by ultrasound at 22 kHz. For the destruction of cellular RNA the cellular homogenate was treated with Rnase I. Fraction PM along with the desired protein in a complex with lipids and polysaccharides also contained impurity of related carotenoids and proteins. Therefore, it was necessary to use special methods of fractionation of the protein without damaging its native structure and dissociation. That required applying the special methods of purification of carotenoids and lipids, and the subsequent gel permeation column chromatography on Sephadex G-200. Removing of carotenoids, consisting in repeated treatment of PM with 50 % (v/v) EtOH ethanol at 4 °C, was a routine but necessary step, in spite of the significant loss of chromoprotein. It was used five treatments by 50 % (v/v) EtOH ethanol to obtain the absorption spectrum of purified from carotenoids PM suspension (4) and (5) (degree of chromatographic purity of 80–85 %), as shown in Figure 3 at various processing stages (b) and (c) relative to the native BR (a). Formation of retinal-protein complex in the BR molecule leads to a bathochromic shift in the absorption spectrum of PM (Fig. 3, c) – the main bandwidth (1) with the absorption maximum at $\lambda = 568$ nm caused by the light isomerization of the chromophore by the C13=C14 bond is determined by the presence of 13-*trans*-retinal residue in BR₅₆₈; additional low-intensity bandwidth (2) at $\lambda = 412$ nm characterizes a minor impurity of a spectral form of *meta*-bacteriorhodopsin M₄₁₂ (formed in the light) with deprotonated aldimine bond between 13-*trans*-retinal residue and protein; the total bandwidth (3) with $\lambda = 280$ nm is determined by the absorption of aromatic amino acids in the polypeptide chain of the protein (for native BR $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1,0$).

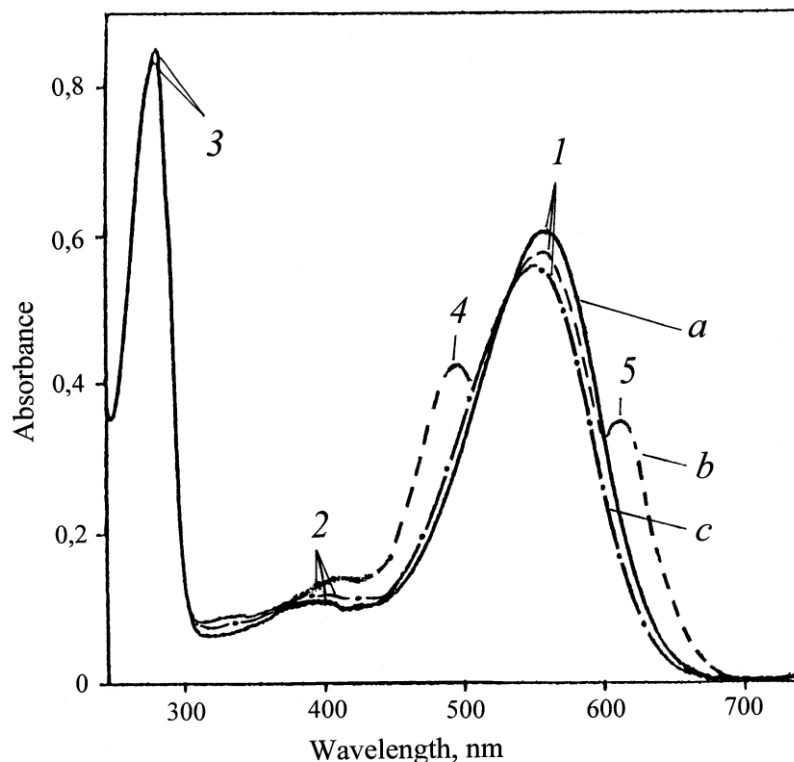


Figure 3. The absorption spectra of the PM (50 % (v/v) ethanol) at various stages of processing: (a) – natural BR; (b) – PM after intermediate treatment; (c) – PM purified from carotenoids. (b) The bandwith (1) is the spectral form of BR₅₆₈, (2) – impurity of spectral form of *meta*-bacteriorhodopsin M₄₁₂, (3) – the total absorption bandwith of aromatic amino acids, (4) and (5) – extraneous carotenoids. As a control used the native BR

The next necessary step of the research was fractionation and chromatographic purification of the protein. As BR, being a transmembrane protein intricately penetrates bilipid layer in form of seven α -helices, the use of ammonium sulfate and other conventional agents to salting out did not give a positive result for isolation of the protein. The resolving was in the translation of the protein to a soluble form by the colloidal dissolution (solubilization) in an ionic detergent. Using SDS-Na as the ionic detergent was dictated by the need of solubilization of the protein in a native, biologically active form in complex with 13-*trans*-retinal, because BR solubilized in 0,5 % (v/v) SDS-Na retains a native α -helical configuration [15]. Therefore, there is no need the use organic solvents as acetone, methanol and chloroform for purification of lipids and protein, and precipitation and delipidization is combined in a single step, which significantly simplifies the further fractionation. A significant advantage of this method is that the isolated protein in complex with lipids and detergent molecules was distributed in the supernatant, and other high molecular weight impurities – in unreacted precipitate, easily separated by centrifugation. Fractionation of solubilized in a 0,5 % (w/v) SDS-Na protein and its subsequent isolation in crystalline form was achieved at 4 °C in three steps precipitating procedure with methanol, reducing the concentration of detergent from 0,5, 0,25 and 0,1 % (w/v) respectively. The final stage of BR purification involved the separation of the protein from low-molecular-weight impurities by gel-permeation chromatography. The fractions containing BR were passed twice through a column with dextran Sephadex G-200 balanced with 0,09 M Tris-borate buffer (pH = 8,35) containing 0,1 % (w/v) SDS and 2,5 mM EDTA. The method for protein fractionation made it possible to obtain 8–10 mg of ²H-labeled BR from 1 g of bacterial biomass. The homogeneity of BR satisfy the requirements for reconstruction of native membranes, and was confirmed by electrophoresis in 12,5 % (w/v) PAAG with 0,1 % (w/v) SDS-Na, regeneration of apomembranes with 13-*trans*-retinal, and RP-HPLC of methyl esters of N-DNS-[²H]amino aids. Micropreparative output of BR was no barrier to further

mass spectrometric analysis. However, it must be emphasized that to ensure high yields of protein it needs to accumulate more raw biomass feedstock.

Conditions of hydrolysis of ^2H -labeled protein were determined to prevent the isotopic ($\text{H}-^2\text{H}$) exchange of hydrogen by deuterium in the molecules of aromatic amino acids, as well as to retain tryptophan in the protein hydrolysate. We considered two alternative variants - acid and alkaline hydrolysis. Acid hydrolysis of the protein in standard conditions (6 N HCl or 8 N H_2SO_4 , 110 °C, 24 h) is known to induce complete degradation of tryptophan and partial degradation of serine, threonine, and several other amino acids in the protein [16], which do not play a significant role for this study. Modification of this method consists in adding to the reaction mixture of phenol, thioglycolic acid, β -mercaptoethanol, can save up to 80–85 % tryptophan [17]. Using of *p*-toluenesulfonic acid with 0,2 % (v/v) 3-(2-aminoethyl) indole or 3 M mercapto sulfoacid is also effective to maintain a tryptophan (up to 93 %) [18]. However, these methods are possess an essential disadvantage, because during acid hydrolysis at high speed occurs isotopic ($\text{H}-^2\text{H}$) exchange of aromatic protons(deuterons) in molecules of tryptophan, tyrosine and histidine as well as protons at C3 position of aspartic and C4 glutamic acid [19]. Therefore, even carrying out of hydrolysis in deuterated reagents (6N ^2HCl , 4N $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ in $^2\text{H}_2\text{O}$) does not derive the real data about the inclusion of the deuterium into the protein.

In conditions of alkaline hydrolysis (4N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ or 4N NaOH, 110 °C, 24 h) the reactions of isotopic ($\text{H}-^2\text{H}$) exchange were almost not occurred (except for a proton (deuteron) at C2 atom of histidine, and tryptophan not destroyed. These factors determined the choice of this method of hydrolysis in our research. Simplification of the procedures for the allocation of amino acid mixture from protein hydrolyzate due to the neutralization of H_2SO_4 (in $^2\text{H}_2\text{O}$) was the reason for choosing as hydrolysing agent 4N $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Possible D,L-amino acid racemization by alkaline hydrolysis did not affect the result of the subsequent mass spectrometric study of the level of deuteration of amino acid molecules.

To study the deuterium labelling of BR molecule EI mass spectrometry was used after modification of amino acid mixture of the hydrolyzate into methyl esters of N-Dns- ^2H amino acids. To obtain reproducible results on the deuteration of ^2H -labeled protein first recorded a total scan EI mass spectrum of the mixture of methyl esters of N-Dns- ^2H amino acids derived from the hydrolyzate BR. The level of deuteration was calculated from the peak of the molecular ion $[\text{M}]^+$ of amino acid derivatives relative to the control. Then, the separation of methyl esters of N-Dns- ^2H aromatic amino acids was performed by RP HPLC to record EI mass spectra for each individual amino acid derivate.

EI mass spectrum of the mixture of methyl esters of N-DN-amino acids as shown in Figure 4 (scanning at m/z 50–640, base peak at m/z 527, 100 %), is characterized by continuity: the peaks in the range at m/z 50–400 on the scale of the mass numbers are fragments of metastable ions, low molecular weight impurities, as well as products of chemically modified amino acids. Analyzed ^2H -labeled aromatic amino acids occupying scale mass numbers at m/z 415–456, are mixtures of molecules containing various numbers of deuterium atoms. Therefore, the molecular ions $[\text{M}]^+$ were polymorphously split into individual clusters displaying a statistical set of m/z values depending on a number of hydrogen atoms in the molecule. Taking into account the effect of isotopic polymorphism the level of deuterium enrichment in ^2H amino acid molecules was determined using the most commonly encountered peak of the molecular ion $[\text{M}]^+$ in each cluster with mathematically averaged value of $[\text{M}]^+$ (Fig. 4). As is shown in Figure 4 molecular ion peak of phenylalanine was determined by $[\text{M}]^+$ at m/z 417, 14 % (instead of the $[\text{M}]^+$ at m/z 412, 20 % for non-labeled derivative (unlabeled peaks of amino acid derivatives are not shown)), tyrosine – $[\text{M}]^+$ at m/z 429, 15 % (instead of $[\text{M}]^+$ at m/z 428, 13 %), tryptophan – $[\text{M}]^+$ at m/z 456, 11 % (instead of $[\text{M}]^+$ at m/z 451, 17 %). The level of deuterium enrichment corresponding to the increase of molecular weight was for ^2H tyrosine 1 (90 atom.% ^2H), ^2H phenylalanine – 5 (95 atom.% ^2H) and ^2H tryptophan – 5 (98 atom.% ^2H) deuterium atoms. This result coincides with the data on the initial level of deuterium enrichment of aromatic amino acids – $[\text{3,5-}^2\text{H}_2]\text{Tyr}$, $[\text{2,3,4,5,6-}^2\text{H}_5]\text{Phe}$ and $[\text{2,4,5,6,7-}^2\text{H}_5]\text{Trp}$, added to the growth medium and indicates a high selectivity of inclusion of aromatic ^2H amino acids into the BR molecule. Deuterium was detected in all residues of aromatic amino acids (Table). However, the presence in the EI mass spectrum peaks $[\text{M}]^+$ of protonated and semi-deuterated phenylalanine analogues with $[\text{M}]^+$ at m/z 413–418, tyrosine – with $[\text{M}]^+$ at m/z 428–430 and tryptophan – with $[\text{M}]^+$ at m/z 453–457 with different levels of contributions to the deuterium enrichment of molecules testifies about conservation of the minor

pathways of biosynthesis of aromatic amino acids de novo, resulting in the dilution of the deuterium label, that evidently is determined by the conditions of biosynthesis of ^2H -labeled BR (Table).

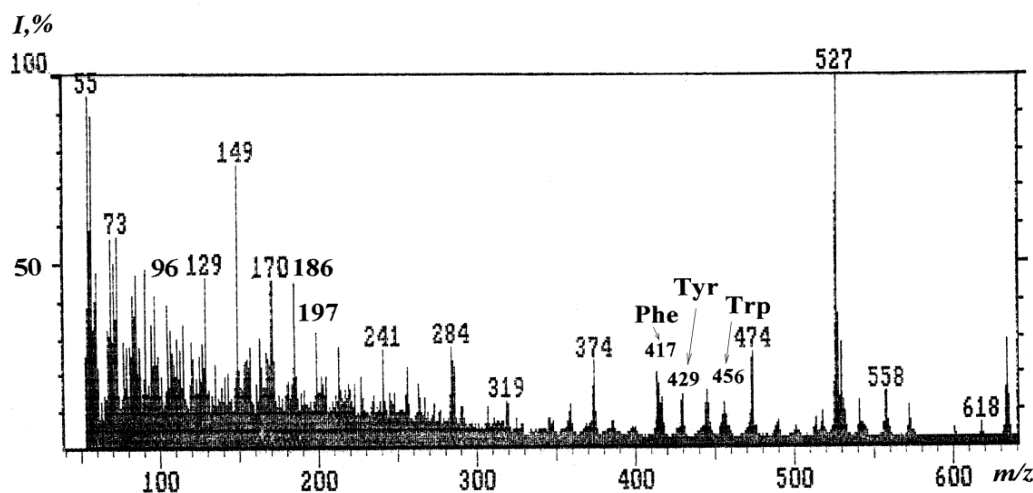


Figure 4. Full scan EI mass spectrum of methyl ester of N-Dns- ^2H derivatives of aromatic amino acids isolated from the BR hydrolyzate, obtained on synthetic medium with $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]\text{Phe}$ (0,26 g/l), $[3,5-^2\text{H}_2]\text{Tyr}$ (0,2 g/l) and $[2,4,5,6,7-^2\text{H}_5]\text{Trp}$ (0,5 g/l). (energy: 70 eV, accelerating voltage: 8 kV, temperature: 180–200 °C). Hydrolysis conditions: 4 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (in $^2\text{H}_2\text{O}$), 110 °C, 24 h. Molecular ion peaks represented by the symbols of amino acids correspond to their derivatives; I – relative intensity (%).

Table

The values of the molecular ion peaks $[\text{M}]^+$ in the EI mass spectrum of methyl esters of N-Dns- $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]\text{Phe}$, N-Dns- $[3,5-^2\text{H}_2]\text{Tyr}$ and N-Dns- $[2,4,5,6,7-^2\text{H}_5]\text{Trp}$ and levels of their deuterium enrichment

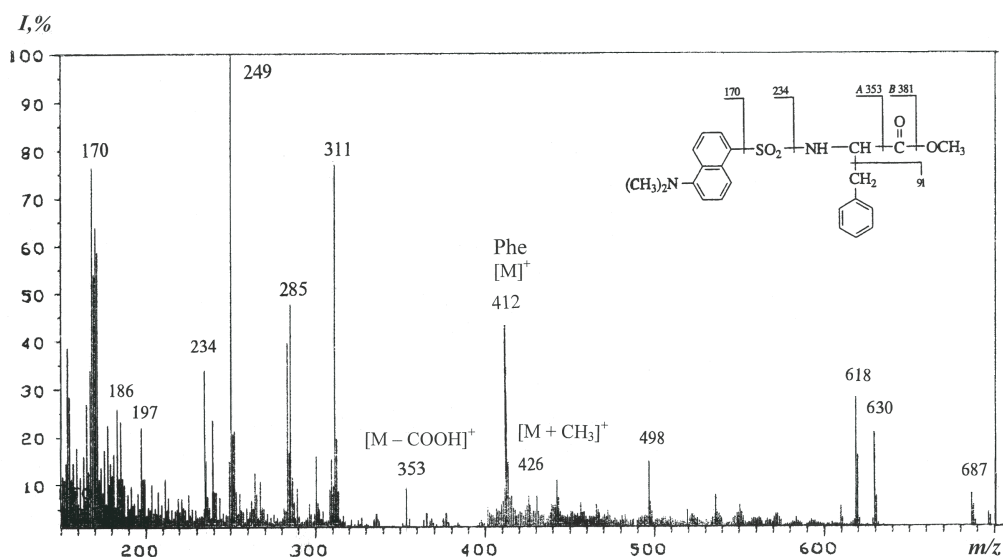
Compound	Value of $[\text{M}]^+$	Intensity, %	The total number of hydrogen atoms*	Level of deuterium enrichment, % of the total number of hydrogen atoms**
N-Dns- $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]\text{Phe-Ome}$	413	7	1	13
	414	18	2	25
	415	15	3	38
	416	11	4	50
	417	14	5	63
	418	6	6	75
N-Dns- $[3,5-^2\text{H}_2]\text{Tyr-Ome}$	428	12	–	–
	429	15	1	14
	430	5	2	29
N-Dns- $[2,4,5,6,7-^2\text{H}_5]\text{Trp-Ome}$	453	5	2	26
	454	6	3	38
	455	9	4	50
	456	11	5	64
	457	5	6	77

Notes:

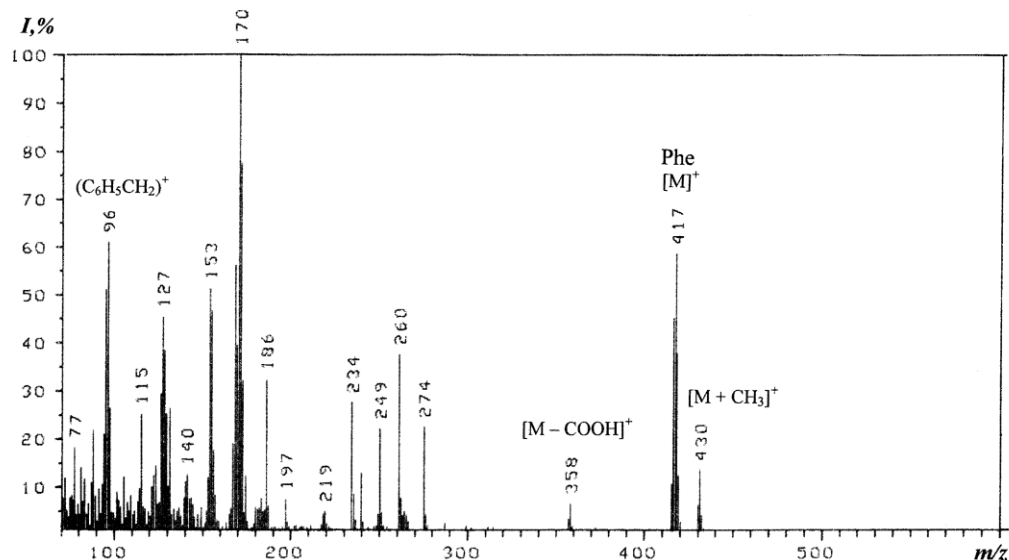
* A dash means no incorporation of deuterium.

** In calculating the level of deuterium enrichment protons(deuterons) at carboxyl and NH_2 -amino groups of amino acids were not considered due to the easily isotopic ($\text{H}-^2\text{H}$) exchange.

According to the mass spectrometric analysis the molecular ion peaks $[M]^+$ of methyl esters of N-Dns- ^{2}H derivatives of aromatic amino acids have a low intensity in EI mass spectra and were polymorphously split, so the areas of of the molecular enrichment were strongly broadened. Moreover, mass spectra of the mixture components are additive, so the mixture can be analyzed only if the spectra of the various components are recorded in the same conditions. These calculations provide for the solution of the system of n equations in n unknowns for a mixture of n components. For components, the concentration of which exceeds 10 mol.%, the accuracy and reproducibility of the analysis makes up $\pm 0,5$ mol.% (at 90% confidence probability). Therefore, to obtain reproducible results it was necessary to chromatographically isolate individual derivatives of ^{2}H amino acids from the protein hydrolyzate. For this aim was used RP-HPLC on on octadecylsilane silica gel Silasorb C18, the effectiveness of which was confirmed earlier by separation of a mixture of methyl esters of N-Dns-derivatives ^{2}H amino acids from other microbial objects as methylotrophic bacteria and microalgae [20].



a)



b)

Figure 5. EI mass spectra of methyl N-Dns- $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]$ Phe under various experimental conditions: (a) – the unlabeled methyl ester of N-Dns-Phe; (b) – methyl ester of N-Dns- $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]$ Phe, isolated from the BR hydrolyzate by RP HPLC. Separation conditions: 250×10 mm Column C18 (“Kova”, Slovakia), eluents: (A) – $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CF}_3\text{COOH}$ (100: 0,1–0,5 % (v/v)) and (B) – CH_3CN (100 % (v/v)).

The method was adapted to the conditions of chromatographic separation of a mixture of methyl esters of N-Dns-[^2H]amino derivatives of BR hydrolyzate comprising in optimization of eluent ratios, the gradient type, and the rate of gradient elution from the column. The best separation was achieved by gradient elution with a solvent mixture $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CF}_3\text{COOH}$ (100: 0,1–0,5 % (v/v)). It was possible to isolate the tryptophan and inseparable pair phenylalanine/tyrosine. The levels of chromatographic purity of methyl esters of N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]phenylalanine, N-Dns-[3,5- $^2\text{H}_2$]tyrosine and N-Dns-[2, 4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]tryptophan isolated from protein hydrolysate were 89, 91 and 90 %, respectively with the output 97–85 %. The result confirmed Figure 5, *b* which shows the EI mass spectrum of methyl N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]phenylalanine isolated by RP-HPLC (scanning at m/z 70–600, base peak at m/z 170, 100 %) (EI mass spectrum is shown relative to the unlabeled methyl ester of N-Dns-phenylalanine (Fig.5, *a*), scanning at m/z 150–700, base peak at m/z 250, 100 %). Proof for the inclusion of 5 deuterium atoms into the phenylalanine molecule is the presence of “heavy” molecular ion peak of methyl ester of N-Dns-[^2H]phenylalanine ($[\text{M}]^+$ at m/z 417, 59 %, instead of $[\text{M}]^+$ at m/z 412, 44 % for non-labeled derivative of phenylalanine), and the deuterium-enriched additional peaks of benzyl $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ fragments of [^2H]phenylalanine molecule at m/z 96, 61 % (instead of m/z 91, 55 % in the control (not shown)) (Fig. 5, *b*). Peaks of secondary fragments of varying intensity values at m/z 249, 234 and 170 are the secondary decomposition products of the dansyl residue to the 5-(dimethylamino)naphthalene, low intensity peak $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$ at m/z 358, 7 % (instead at m/z 353, 10 % in the control) is a product of cleavage of a carboxymethyl (COOCH_3) group of the methyl ester of N-Dns-[^2H]phenylalanine, and a peak $[\text{M} + \text{CH}_3]^+$ at m/z 430, 15 % (instead of m/z 426, 8 % in the control) – the product of further methylation by α -amino group of the [^2H]phenylalanine (Fig. 5, *b*). According to the EI mass spectrometry data, the difference between the molecular weight of the protonated and deuterated species of peaks $[\text{M}]^+$ of methyl ester of N-Dns-phenylalanine makes up 5 units that corresponds with the primary data on the deuterium enrichment level of [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]phenylalanine added to the growth medium. Mass spectrometric data on deuterium enrichment levels of [3,5- $^2\text{H}_2$]tyrosine and [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]tryptophan are also in good correlation and confirmed by ^1H NMR.

Conclusions

The experimental data indicate the high efficiency of the of incorporation of H-labeled aromatic amino acids into the BR molecule with output of BR 8–10 mg per 1 g of biomass. The main advantage of this method is that the isolated BR keeps its native configuration in combination with 13-*trans*-retinal, and the ability to photochemical reactions *in vitro*, as demonstrated by electrophoresis in 12,5 % (w/v) PAAG with 0,1 % (w/v) SDS-Na. The method is also applicable for the preparation of other similar to BR transmembrane proteins of halophilic bacteria – sensory rhodopsin and halorhodopsin. The unique properties of natural bacteriorhodopsins provide a wide range of bio- and nano-technological applications in which may find their application ^2H -labeled analogues. In the future we plan obtaining fully deuterated analogs of BR for the reconstruction of functionally active systems of transmembrane proteins in heavy water with purified ^2H -labeled fatty acids and other biologically active compounds. These studies will provide an answer to the question of how function BR in the native membranes in condition of the complete replacement of protons by deuterium.

References:

1. Oesterhelt D. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // Nature. 1971. Vol. 233, No 89. P. 149–160.
2. Oesterhelt D. The Structure and Mechanism of the Family of Retinal Proteins from Halophilic Archaea / D. Oesterhelt // Struct. Biol. 1988. Vol. 8. P. 489–500.
3. Haupts U. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer Model / U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, D. Oesterhelt // Biochemistry. 1997. Vol. 36, No 2–7. P. 78–85.
4. Hamp N. Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications, in: Nanobiotechnology / Ed. Ch. Niemeyer, C. Mirkin. Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 2004. P. 130–136.

5. Vought B.W. Molecular electronics and hybrid computers, in: Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering / Ed. B.W. Vought, R.R. Birge. New York: Wiley-Interscience. 1999. P. 224–240.
6. Gui-Ying Ch. All-optical logic-gates based on bacteriorhodopsin film / Ch. Gui-Ying, Zh. Chun-Ping, G. Zong-Xia, T. Jian-Guo, Zh. Guang-Yin, S. Qi-Wang // Advanced Studies in Biology. 2012. Vol. 4, № 5. P. 207–216.
7. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / D.M. LeMaster // Ann. Rev. Biophys. Chem. 1990. Vol. 19. P. 243–266.
8. Mosin O.V. Inclusion of deuterated aromatic amino acids in the molecule of bacteriorhodopsin *Halobacterium halobium* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Applied Biochemistry and Microbiology. 1999. Vol. 35, № 1. P. 34–42.
9. Mosin O.V. Mass spectrometric evaluation of the level switch in ^2H and ^{13}C amino acid molecules of bacterial objects / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, V.I. Shvets // Bioorganic Chemistry. 1996. Vol. 22, № 10–11. P. 856–869.
10. Mosin O.V. Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin, in 6th Intern. Conf. on Retinal proteins / O.V. Mosin, E.N. Karnaukhova, A.B. Pshenichnikova, O.S. Reshetova. Leiden: Elsevier. 1994. P. 115–116.
11. Mosin O.V. Synthesis of [^2H]bacteriorhodopsin labeled by deuterium on residues of aromatic amino acids / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // Khimicheskaya Tekhnologiya (Chemical Engineering), Publishing House “Nauka & Technology” Moscow. 2012. № 9. P. 553–564.
12. Mosin O.V. Biosynthesis of trans-membrain photo-transforming protein [^2H]bacteriorhodopsin, labeled with deuterium on residues of aromatic amino acids [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe, [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr and [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry. 2013. № 8. P. 29–39.
13. Neugebauer D.Ch. Recrystallization of the Purple Membrane *in vivo* and *in vitro* / D.Ch. Neugebauer, H.P. Zingsheim, D. Oesterhelt // Journal Molecular Biology. 1978. Vol. 123. P. 247–257.
14. Rudiger M. Reconstitution of Bacteriorhodopsin from the Apoprotein and Retinal Studied by Fourier-transformed Infrared Spectroscopy / M. Rudiger, J. Tittor, K. Gerwert, D. Oesterhelt // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 4867–4874.
15. Nonella M. Structure of bacteriorhodopsin and *in situ* isomerization of retinal: a molecular dynamics study / M. Nonella, A. Windemuth, K. Schulten // Journal Photochem. Photobiol. 1991. Vol. 54, № 6. P. 937–948.
16. Zvonkova E.N. Chemistry of biologically active natural compounds / E.N. Zvonkova, N.V. Zotchik, E.I. Philippovich, T.K. Mitrofanov, G.I. Myagkova, G.A. Serebrennikova. Moscow: Chemistry, 1970. P. 68–80 [in Russian].
17. Penke B. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins / B. Penke, R. Ferenczi, K. Kovács // Analytical Biochemistry. 1974. Vol. 60, № 1. P. 45–50.
18. Liu T.Y. Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan / T.Y. Liu, Y.H. Chang // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246, № 9. P. 2842–2848.
19. Pshenichnikova A.B. Methods for preparation of deuterated amino acids / A.B. Pshenichnikova, E.N. Karnaukhova, E.N. Zvonkova, V.I. Shvets // Bioorganic Chemistry. 1995. Vol. 21, № 3. P. 163–178.
20. Mosin O.V. Isotope effects of deuterium in bacterial and microalgae cells at growth on heavy water (D_2O) / O.V. Mosin, I. Ignatov // Voda: Ximia i Ecologija. 2012. № 3. P. 83–94 [in Russian].

УДК 577.37 + 537.86

**Биосинтез ^2H -меченного фотохромного трансмембранного белка
бактериородопсина галобактерией *Halobacterium halobium***

¹Олег Викторович Мосин

²Игнат Игнатов

¹ 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

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

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

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

Аннотация. Разработан микропрепаративный биосинтез природного фотопреобразующего белка бактериородопсина (выход 8–10 мг), меченного дейтерием по функционально важным остаткам аминокислот – [2,3,4,5,6-²H₅]фенилаланина, [3,5-²H₂]тирозина и [2,4,5,6,7-²H₅]триптофана, с помощью фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium*. Белок был из пурпурных мембран лизисом клеток дистиллированной водой, обработкой клеточной биомассы ультразвуком при 22 кГц, спиртовой экстракцией низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов, с последующей солюбилизацией конечного продукта в 0,5 % ДДС-На и низкотемпературным фракционированием метанолом. Гомогенность синтезируемого бактериородопсина и селективность включения дейтерия в молекулу доказаны комбинацией методов выделения и белкового анализа, включая электрофорез в 12,5 % ПААГ с 0,1 % ДДС-На, гель-проникающей хроматографией на сефадексе G-200, обращённо-фазовой ВЭЖХ и масс-спектрометрией электронного удара метиловых эфиров N-Dns-[²H] производных аминокислот.

Keywords: *Halobacterium halobium*, бактериородопсин, [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr, [2,4,5,6,7-²H₅]Trp, биосинтез; масс-спектрометрия электронного удара, ОФ ВЭЖХ.