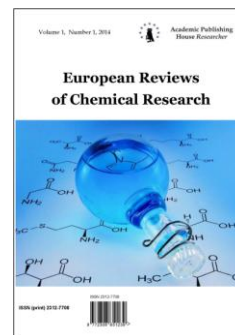


Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Reviews of Chemical Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2312-7708
Vol. 2, No. 2, pp. 109-132, 2014

DOI: 10.13187/erchr.2014.2.109
www.ejournal14.com



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, Talalihin ulitsa, 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 Dorozhniy 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)
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- $^2\text{H}_5$]фенилаланин (90 ат.% ^2H), *L*-[3,5- $^2\text{H}_2$]тирозин (96 ат.% ^2H) и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]триптофан (98 ат.% ^2H) (способы получения указаны в работе [12]). Для синтеза производных аминокислот использовали *N*-5-(диметиламино)нафталин-1-сульфохлорид (дансилхлорид) (Sigma, США), бензилоксикарбонилхлорид (Войковский химзавод, РФ) и диазометан, получаемый из *N*-нитрозометилмочевины (Merck, Германия).

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

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

Выращивание метилотрофных бактерий *B. methylicum* и *M. flagellatum* осуществляли на минеральной среде М9 в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл с наполнением средой 50 мл по методике [13], используя в качестве источников стабильных изотопов [^2H]метанол, [^{13}C]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$ в присутствии *L*-лейцина для *B. methylicum* и *L*-изолейцина для *M. flagellatum* в концентрациях 10 мг/л. Клетки отделяли центрифугированием на центрифуге Т-24 ("Heraeus Sepatech", Германия) (10000 г, 20 мин). В культуральной жидкости анализировали секретируемые аминокислоты.

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

Для биосинтеза дейтериймеченого бактериородопсина использовали синтетическую среду, содержащую 18 аминокислот, в которой немеченые *L*-аминокислоты фенилаланин, тирозин и триптофан были заменены их дейтерированными аналогами – *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]фенилаланином, *L*-[3,5- $^2\text{H}_2$]тирозином, и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]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; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 20; KCl – 2; NH_4Cl – 0,5; KNO_3 – 0,1; KH_2PO_4 – 0,05; K_2HPO_4 – 0,05; цитрат натрия – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $3 \cdot 10^{-4}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,065; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $4 \cdot 10^{-5}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $5 \cdot 10^{-4}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – $5 \cdot 10^{-5}$); глицерин – 1,0; ростовые факторы (биотин – $0,1 \cdot 10^{-3}$; фолиевая кислота – $10 \cdot 10^{-3}$; витамин B_{12} – $2 \cdot 10^{-4}$).

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 (рН = 7,6), добавляли 1 мг дезоксирибонуклеазы I и инкубировали в течении 5–6 ч при 37 °С, затем разбавляли дистиллированной водой до 200 мл и инкубировали 15 ч при 4 °С. Осадок промывали дистиллированной водой с последующим отделением водной фракции до получения бесцветных промывных вод. Чистоту полученной суспензии пурпурных мембран (в H_2O) контролировали на спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) по соотношению полос поглощения при $\lambda = 280/568$ нм (молярные коэффициенты светопоглощения: $\varepsilon_{280} = 1,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [14] и $\varepsilon_{568} = 6,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [15]).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Масс-спектры электронного удара производных аминокислот регистрировали на приборе MB-80 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 М9, содержащих 2 % метанол и указанное количество (об.%) ²H₂O. Данные опыта 6–7 приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде М9, 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 секретирываемые аминокислоты от микробной биомассы, очистки от липидов, разрушении клеток, выделении фракции суммарных белков биомассы и бактериородопсина с последующим их гидролизом, дериватизации смесей аминокислот дансилхлоридом, бензилоксикарбонилхлоридом и диазометаном, разделении метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот и *N*-Cbz-производных аминокислот методом обращённо-фазовой ВЭЖХ и масс-спектрометрии электронного удара полученных производных аминокислот.

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

Другой вариант гидролиза белка заключался в использовании 2 М Ва(ОН) $_2$ (110 °С, 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 Ва(ОН) $_2$, 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-derivatизации [^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 derivatизацию [^2H , ^{13}C]аминокислот в составе лиофилизированных культуральных жидкостей и гидролизатов суммарных белков биомассы пятикратным избытком дансилхлорида (в ацетоне) или бензилоксикарбонилхлорида.

В условиях реакции derivatизации 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-меченых аминокислот, в данной работе отдали предпочтение использованию diazometана для этих целей. Свежеприготовленным раствором diazometана в диэтиловом эфире обрабатывали сухие остатки смесей аминокислот. При derivatизации аминокислот diazometаном происходило дополнительное N-метилирование по α -NH-(Dns)-группе [^2H]аминокислот, что приводило к появлению в масс-спектрах метиловых эфиров N-Dns-аминокислот дополнительных пиков, соответствующих соединениям с молекулярной массой на 14 массовых единиц больше исходных.

Уровни включения изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот мультикомпонентных смесей в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов определяли аналитически методом масс-спектрометрии электронного удара. Метилловые эфиры N-Dns- $[\text{}^2\text{H}$, $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот или N-Cbz- $[\text{}^2\text{H}$, $^{13}\text{C}]$ производные аминокислот препаративного разделяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на октадецилсилановом силикагеле Separon SGX C18, 7 мкм. Наилучшее разделение достигалось при градиентном элюировании метиловых эфиров N-Dns- $[\text{}^2\text{H}$, $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот смесью растворителей (А) – вода–трифторуксусная кислота (100:0,1–0,5, %) и (Б) – ацетонитрил–трифторуксусная кислота (100:0,1–0,5, %) за счет постепенного увеличения концентрации компонента Б в смеси от 0 до 100 %. При этом удалось разделить триптофан и трудно разрешимую пару фенилаланин/тирозин. Степени хроматографической чистоты ^2H - и ^{13}C -меченных аминокислот, выделенных из культуральных жидкостей *B. methylicum* и *M. flagellatum* и гидролизатов белков в виде их N-Cbz- $[\text{}^2\text{H}$, $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот составили 96–98 %, при выходах – 67–89 %. Для отдельных $[\text{}^2\text{H}$, $^{13}\text{C}]$ аминокислот оказалось более удобным разделение в виде метиловых эфиров N-Dns- $[\text{}^2\text{H}$, $^{13}\text{C}]$ производных аминокислот. При этом степень хроматографической чистоты полученных из гидролизатов бактериородопсина метиловых эфиров N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ фенилаланина, N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ тирозина и N-Dns- $[\text{}^2\text{H}]$ триптофана составили 96, 97 и 98 % соответственно. Данный результат важен потому, что именно метилловые 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-диметиламинафталина, 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.

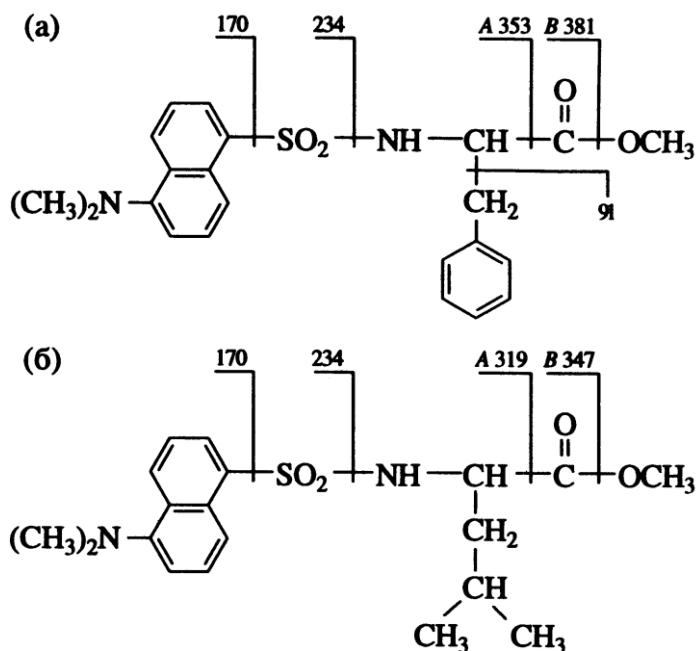


Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с $M_r = 412$ (а) и N-Dns-лейцина с $M_r = 378$ (б) при масс-спектрометрии электронного удара

При использовании в качестве источников стабильных изотопов [¹³C]метанола и ²H₂O, в клетке синтезируются изотопно-замещённые аминокислоты, различающиеся количеством атомов, замещённых на ¹³C 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 [¹³C]аминокислот дериватизованной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной среды с 1 % [¹³C]метанолом (рис. 2 б), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns-[¹³C]глицина, N-Dns-[¹³C]аланина, N-Dns-[¹³C]валина, N-Dns-[¹³C]лейцина/[¹³C]изолейцина и N-Dns-[¹³C]фенилаланина. Следует подчеркнуть, что величина m/z для молекулярного иона (M⁺) метиловых эфиров N-Dns-[¹³C]лейцина и [¹³C]изолейцина в масс-спектрах электронного удара одинакова, поэтому данным методом нельзя точно идентифицировать эти аминокислоты. Максимальные уровни включения ¹³C 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 [¹³C]аланина до 95 % для [¹³C]фенилаланина (рис. 2). Учитывая ауксотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснён вкладом экзогенного изолейцина в уровень изотопного включения [¹³C]лейцина, а также других метаболически связанных с ним аминокислот – [¹³C]аланина и [¹³C]валина.

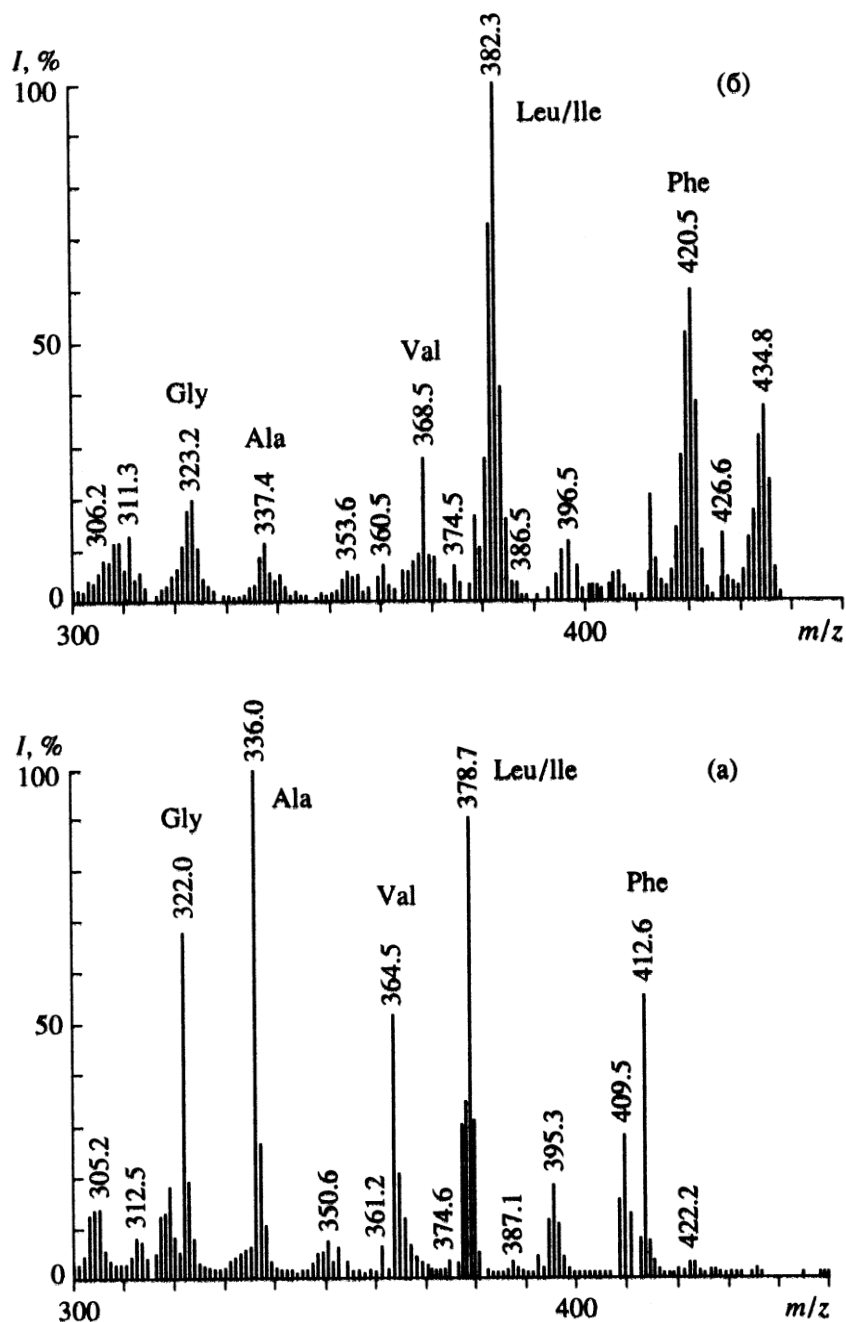


Рис. 2. Масс-спектры ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[¹³C]аминокислот из КЖ *M. flagellatum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 1 % метанол и H₂O (контрольные условия); б) – 1 % [¹³C]метанол и H₂O. Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов [M]⁺ метиловых эфиров N-Dns-[¹³C]аминокислот. Интенсивность пиков приведена в %

Для штамма факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* наблюдалось специфическое возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулы индивидуальных [²H]аминокислот культуральных жидкостей (табл. 2) при ступенчатом увеличении концентраций ²H₂O в ростовой среде. Уровни включения дейтерия в молекулы разных [²H]аминокислот при одинаковых условиях культивирования различаются. При этом во всех опытах наблюдалось пропорциональное возрастание уровней изотопного включения ²H в молекулы метаболически родственных [²H]аминокислот при ступенчатом увеличении концентраций тяжелой воды в ростовых средах (табл. 2). Такой результат зафиксирован во всех экспериментах, где источником стабильных изотопов служила ²H₂O.

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.

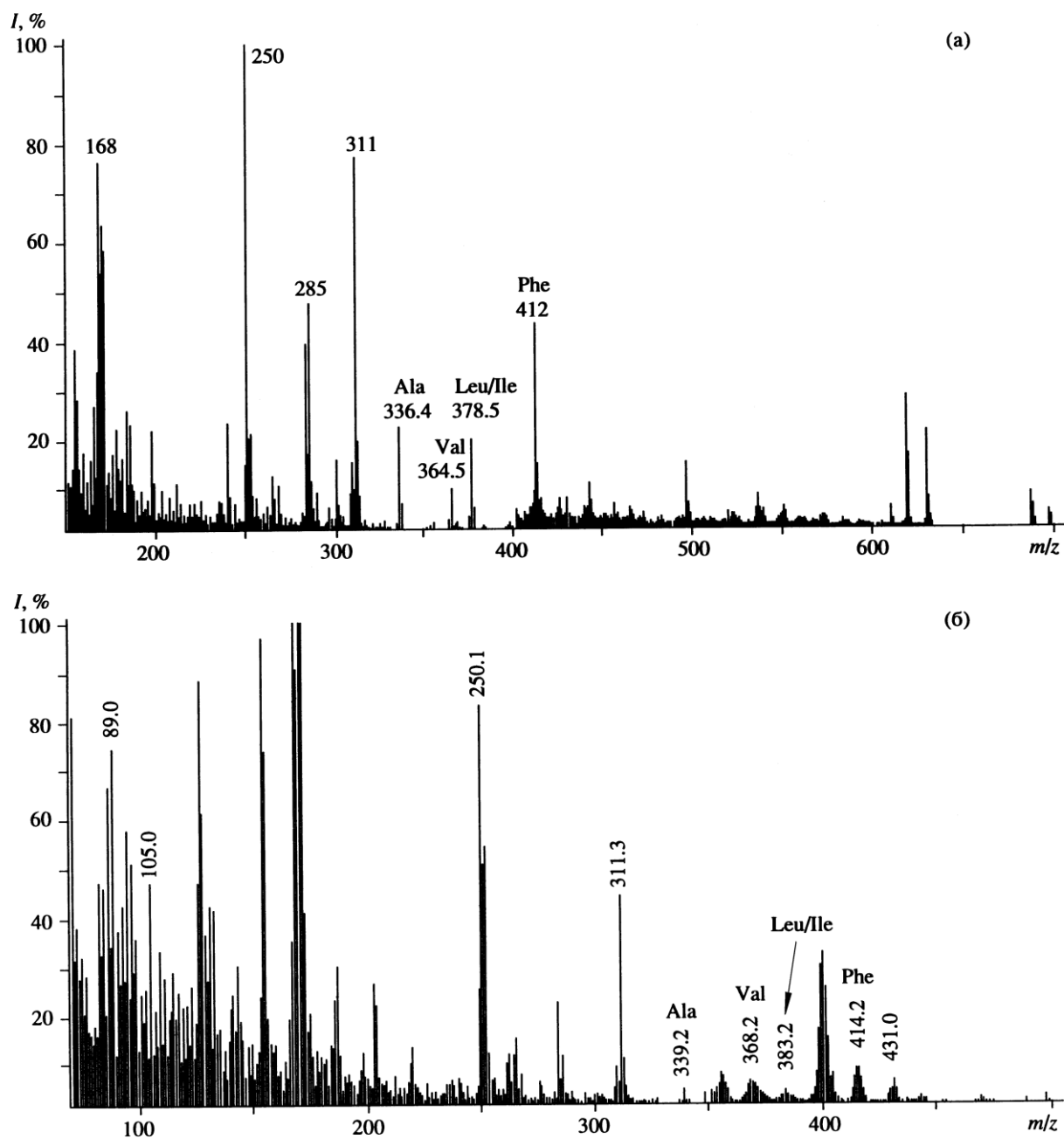


Рис. 3. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном: а) – 2 % метанол и 98,0 % H_2O (контрольные условия); б) – 2 % [^2H]метанол и 49,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$

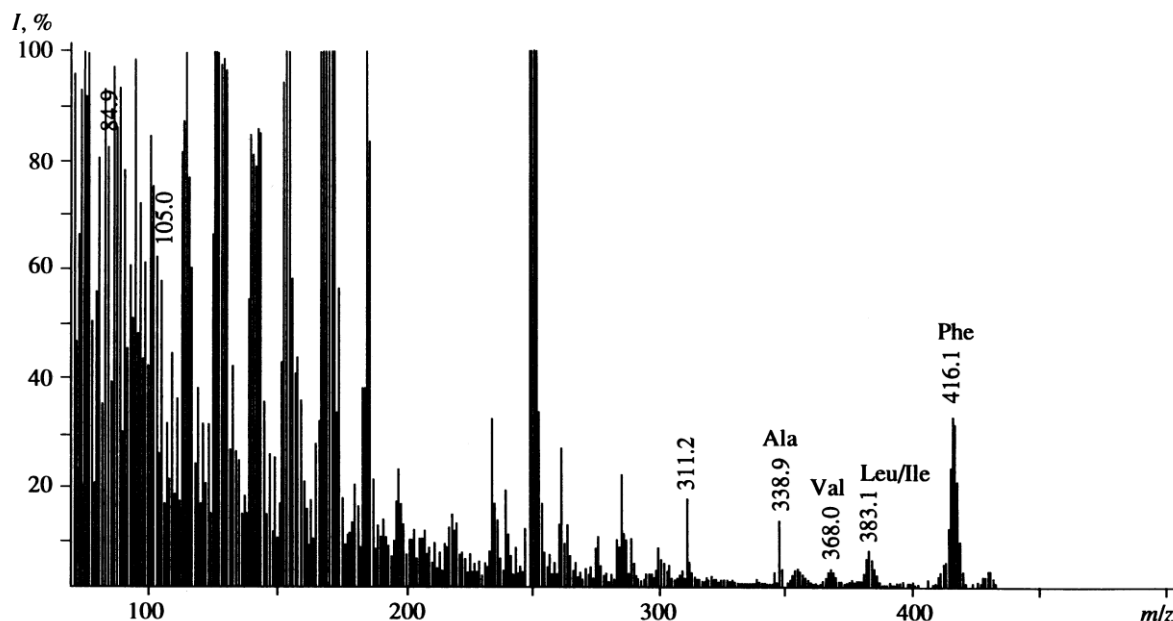


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$

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 $\alpha\text{-NH}_2$ - группе. Кроме этого, в масс-спектре фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [^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].

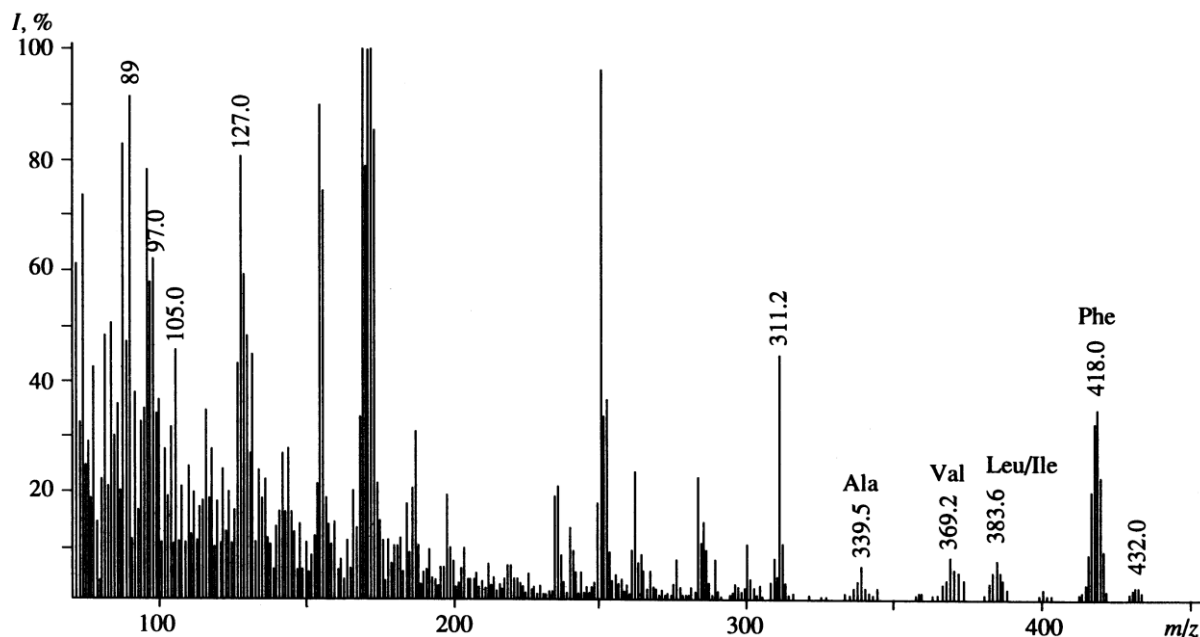


Рис. 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (максимально дейтерированная среда)

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.

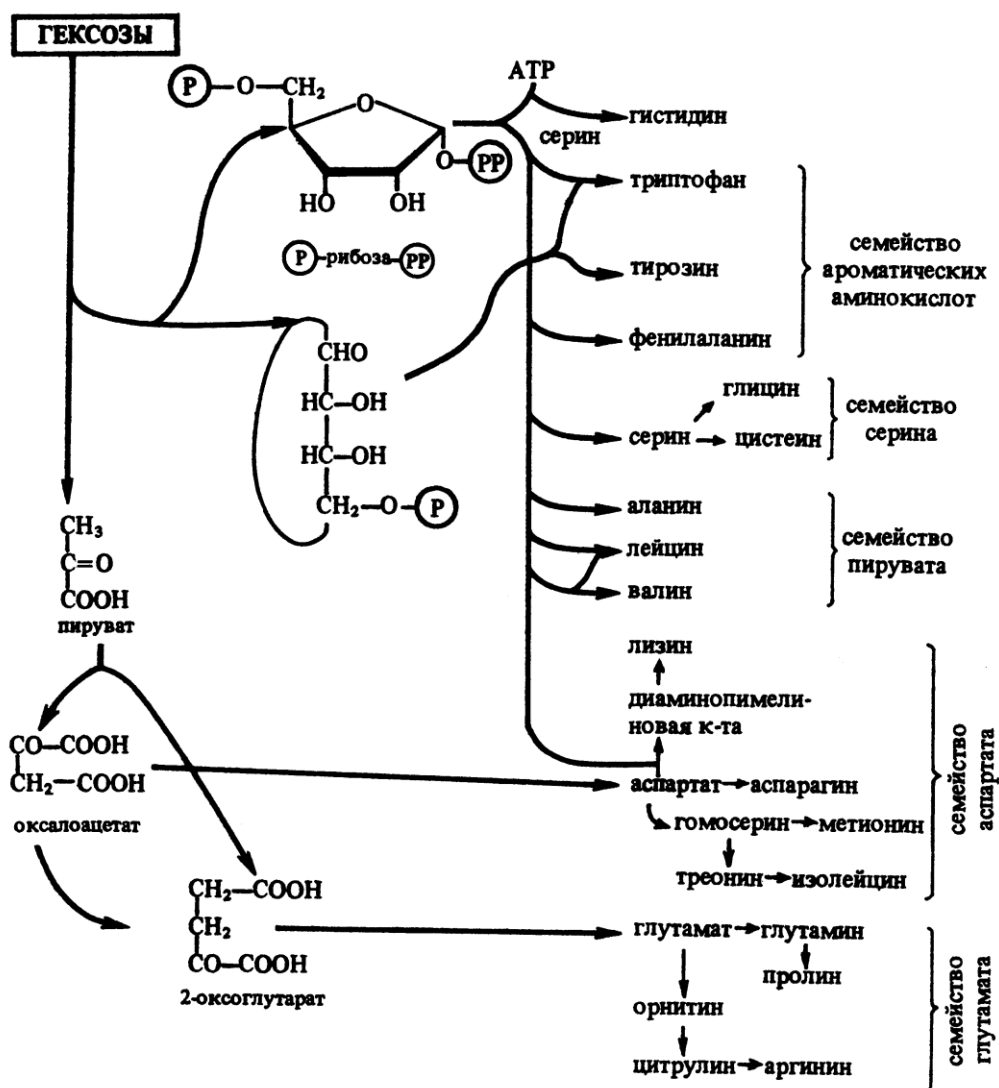


Рис. 6. Аминокислоты, необходимые для синтеза белков, образующиеся в клетке из предшественников (по Г. Шлегелю [27])

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- $[^2\text{H}]$ производных аминокислот.

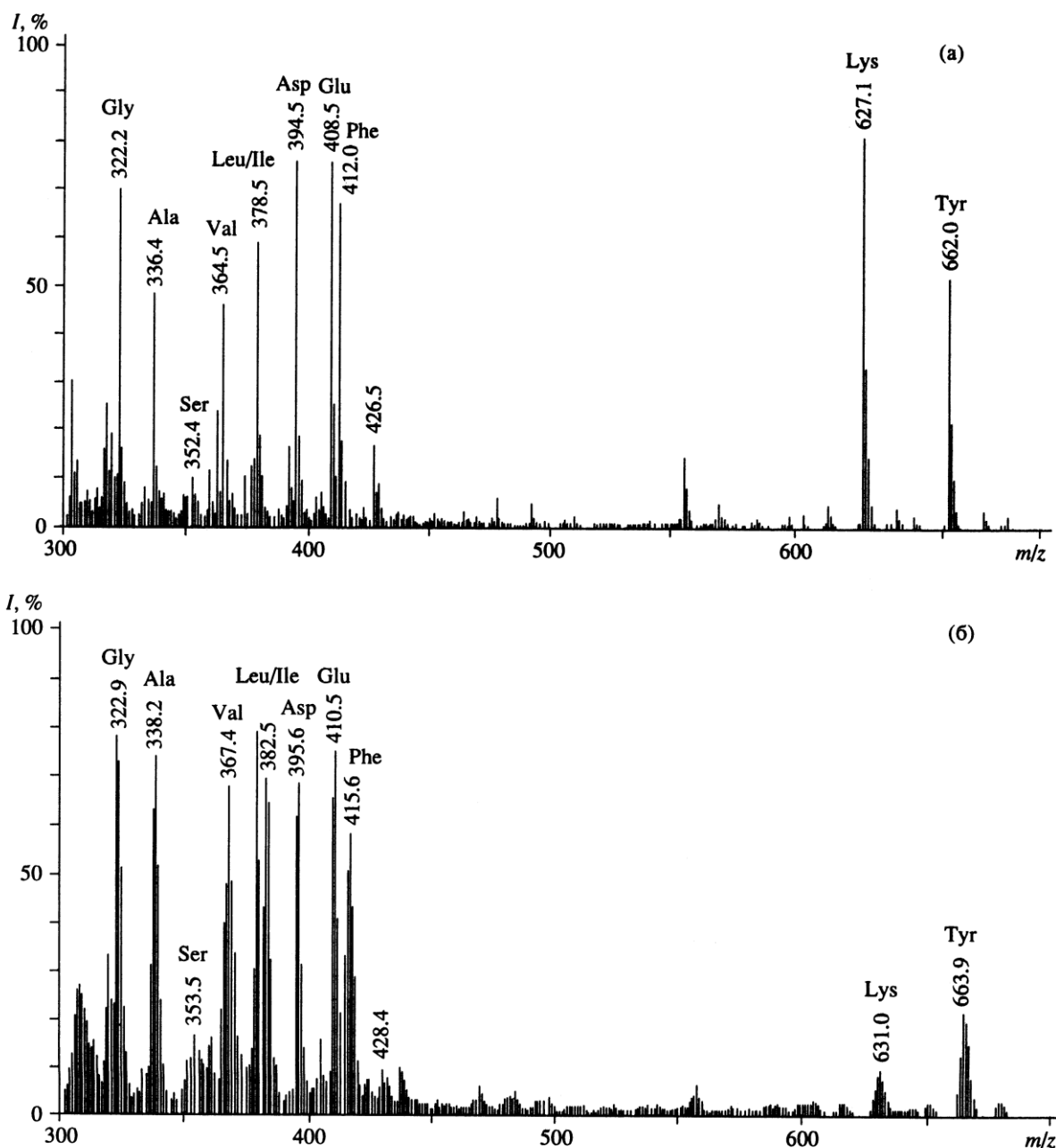


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из гидролизатов суммарных белков биомассы *B. methylicum* при выращивании в среде M9, содержащей 2 % метанол и H_2O (а) и 2 % [^2H]метанол и 98,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (б)

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-тирозину (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 секретлируемыми 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).

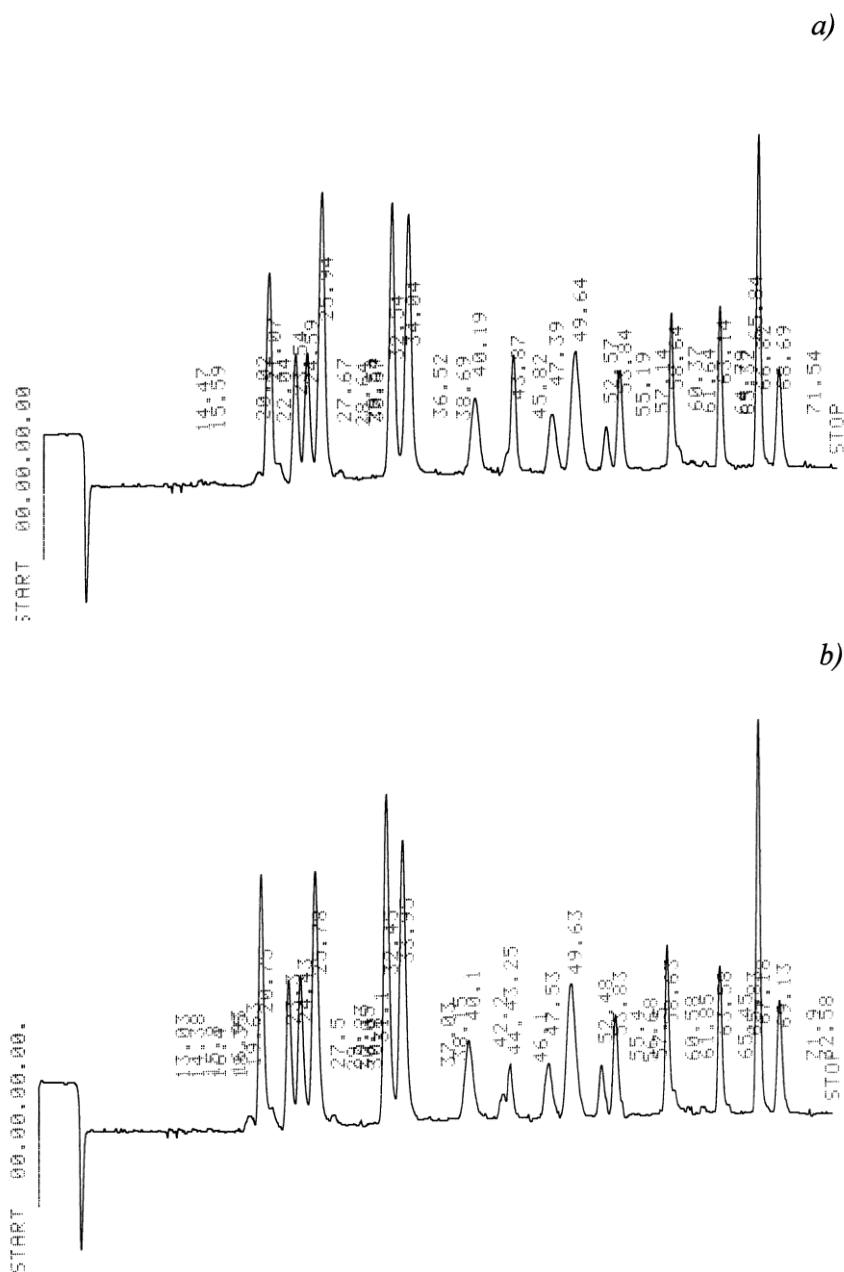


Рис. 8. Ионнообменная хроматография аминокислот, выделенных из гидролизатов протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток *B. methylicum* на максимально дейтерированной среде: Biotronic LC-5001 (230×3,2 mm) (“Eppendorf–Nethleler–Hinz”, Germany); подвижная фаза: UR-30 сульфонирующая стирольная смола (“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 уровне дейтерированности молекул**

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

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

** При подсчёте уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH - и NH_2 группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации и изотопного обмена в $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$

*** Проверк означает отсутствие данных.

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

Во всех экспериментах по включению стабильных изотопов в молекулы аминокислот уровни включения ^2H и ^{13}C в метаболически связанные аминокислоты обнаружили определённую корреляцию. Так, уровни изотопного включения для аланина, валина и

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

Данный биосинтетический подход показал хорошие результаты по введению дейтериевой метки в молекулу трансмембранного белка бактериородопсина, выращенного на среде, содержащей L -[2,3,4,5,6- ^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.

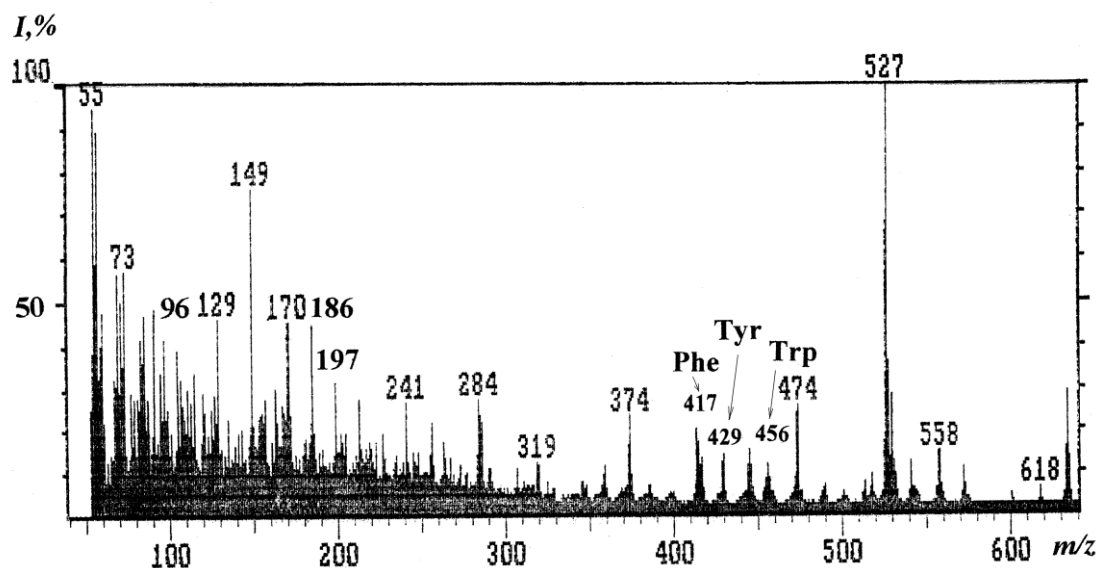


Рис. 8. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата бактериородопсина на синтетической среде с [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe (0,26 г/л), [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr (0,2 г/л) и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp (0,5 г/л)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

Таблица 4

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

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

* Прочерк означает отсутствие включения дейтерия

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

Выводы

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

Примечания:

1. Мосин О.В. Изучение методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных стабильными изотопами ^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., Швеце 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., Швеце 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., Швеце 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., Швеце 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. 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., Швеце В.И.. Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1999. т. 35, № 1. С. 34–42.
15. Neugebauer D.C., Zingsheim H.P., Oesterhelt D. Recrystallization of the purple membrane *in vivo* and *in vitro* // *Journal Molecular Biology.* 1978. V. 123. P. 247–257.

16. Oesterhelt D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from *Halophilic Archaea* *Curr. Op. // Struct. Biol.* 1988. V. 8. P. 489–500.
17. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. № 8. P. 911–918.
18. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швец В.И. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых ^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 poolucheniya belkov, aminokislot i nukleozidov, mechennyh stabil'nymi izotopami ^2H i ^{13}C s vysokimi stepenjami izotopnogo obogashheniya, 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 polucheniya 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 aromatičeskih aminokislot [2,3,4,5,6-2H₅]Phe, [3,5-2H₂]Tyr and [2,4,5,6,7-2H₅]Trp // *Problemy biologičeskoj, medicinskoj i farmaceutičeskoj himii*. 2013. No 8. S. C. 29–39.

13. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of 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 – istočniki izotopnomečenyh 2N- i 13S-aminokislot // *Biotehnologija*. 1996. No 5. S. 25–34.

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

20. Mosin O. V., Skladnev D. A., Shvets V. I. Biosynthesis of 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-preobrazujuščij fotohromnyj transmembrannyj belkovyj material bakteriorodopsin iz purpurnyh membran galobakterii *Halobacterium halobium* // *Nano i mikrosistemnaja tehnika*. 2013. No 7. S. 47–54.

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

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

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

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

26. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. Biosynthesis of 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 обогащения¹ Олег Викторович Мосин² Игнат Игнатов³ Дмитрий Анатольевич Складнев⁴ Виталий Иванович Швец

¹ Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация

Старший научный сотрудник, 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)

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

³ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация

Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

E-mail: genetika@genetika.ru

⁴ Московский государственный университет тонких химических технологий им.

М.В. Ломоносова, Российская Федерация

Академик РАН, доктор химических наук

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

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

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