



УДК 579.871.08:577.112.385.4.08

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ВКЛЮЧЕНИЯ $^2\text{H}$ И $^{13}\text{C}$ В МОЛЕКУЛЫ АМИНОКИСЛОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

© 1996 г. О. В. Мосин, Д. А. Складнев\*, Т. А. Егорова, В. И. Швец<sup>#</sup>

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

\* Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Поступила в редакцию 14.03.96 г.

Методом высокочувствительной масс-спектрометрии электронного удара исследованы уровни включения стабильных изотопов  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы секретируемых аминокислот *L*-фенилаланинпродуцирующего штамма *Brevibacterium methylcum* и *L*-лейцинпродуцирующего штамма *Methylobacillus flagellatum* и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы при выращивании бактерий на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов ( $^2\text{H}$ )метанол, ( $^{13}\text{C}$ )метанол и  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Также осуществлено включение *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}$ ]фенилаланина, *L*-[3,5- $^2\text{H}$ ]тирозина и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]триптофана в бактериородопсин, синтезируемый *Halobacterium halobium* ET 1001. Для масс-спектрометрического анализа мультикомпонентные смеси аминокислот в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов (гидролиз в 6 М  $^2\text{HCl}$  (3% фенол) и 2 М  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) превращали в *N*-бензилоксикарбонилпроизводные аминокислот и метиловые эфиры *N*-диметиламинафталин-5-сульфонилпроизводных аминокислот, которые препаративно разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученные [ $^2\text{H}$ ]- и [ $^{13}\text{C}$ ]аминокислоты представляли собой смеси, различающиеся количеством включенных в молекулу изотопов. Уровни включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы секретируемых аминокислот и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы меняются в зависимости от содержания меченых субстратов в ростовых средах и различаются для разных аминокислот (до 10% для *L*-лейцина/изолейцина и до 97.5% для *L*-аланина).

*Ключевые слова:* стабильные изотопы; метилотрофные бактерии; галофильные бактерии; выращивание на  $^2\text{H}_2\text{O}$ ; изотопномеченые аминокислоты, бактериородопсин.

Обогащение молекул стабильными изотопами ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и др.) в настоящее время является важным методом в разнопрофильных биохимических и метаболических исследованиях с использованием аминокислот и других биологически активных соединений (БАС) [1–3]. 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- [4], ИК- [5] и лазерную спектроскопию [6] и масс-спектрометрию [7]. 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 [8, 9]. В частности, аминокислоты, меченные  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  с различными уровнями изотопного включения, применяются для изуче-

ния пространственной структуры и конформационных изменений белков [10], взаимодействия белковых молекул [11], а также в химических синтезах широкого круга изотопномеченых соединений на их основе. Например, меченый *L*-фенилаланин использован в синтезах пептидных гормонов и нейротрансмиттеров [12].

Важным моментом в исследованиях с применением меченых аминокислот является их доступность. Изотопномеченые аминокислоты могут быть получены с использованием химических, ферментативных и биосинтетических методов. Однако химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов ценных реагентов и меченых субстратов и приводят в результате к продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*-форм, для разделения которых требуются специальные методы [13]. Более тонкие синтезы меченых аминокислот связаны с использованием комбинации химических и ферментативных подходов [14–16].

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Для многих целей, и прежде всего для структурных исследований белков, биотехнология предлагает альтернативный химическому синтезу путь получения аминокислот, меченных стабильными изотопами, который приводит к высоким выходам синтезируемых продуктов, к эффективному включению изотопов в молекулы и к сохранению природной конфигурации синтезируемых соединений. При биосинтетическом получении меченых аминокислот используют несколько подходов, один из которых заключается в равномерном обогащении синтезируемых соединений по всему углеродному скелету молекулы за счет выращивания штаммов продуцентов на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов следующие субстраты:  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  [17],  $(^{13}\text{C})$ метанол,  $(^2\text{H})$ метанол [18] и  $^2\text{H}_2\text{O}$  [19]. Этот подход включает в себя также комплексное использование химических компонентов биомассы, выращенной в присутствии стабильных изотопов, для выделения и фракционирования нужных изотопномеченых соединений. Другой подход заключается в сайт-специфическом обогащении аминокислот по определенным положениям молекул за счет ассимиляции клеткой меченых предшественников, например  $[1,4-^{13}\text{C}]$ сукцината,  $[1,2-^{13}\text{C}]$ ацетата,  $[1-^{13}\text{C}]$ лактата и др. [20, 21]. Методы получения изотопномеченых аминокислот в аспекте их использования для ЯМР-исследований белков более подробно изложены в работах ЛеМастера [22].

Настоящая работа является продолжением исследований [23–25], направленных на биосинтетическое получение  $[^2\text{H}]$ - и  $[^{13}\text{C}]$ аминокислот за счет утилизации низкомолекулярных меченых субстратов –  $(^2\text{H})$ метанола,  $(^{13}\text{C})$ метанола и  $^2\text{H}_2\text{O}$  в клетках микроорганизмов и реализацию возможности определения стабильных изотопов методом масс-спектрометрии электронного удара. Чувствительность масс-спектрометрии составляет  $10^{-9}$ – $10^{-11}$  нмоль, что существенно выше, чем при использовании ИК- и ЯМР-спектроскопии. Данный метод в сочетании с обращенно-фазовой ВЭЖХ хорошо зарекомендовал себя для исследования уровня изотопного обогащения молекул аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, каковыми являются препараты культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот и гидролизаты белков, полученные со сред, содержащих стабильные изотопы.

Объектами исследования служили полученные в результате мутагенеза *L*-фенилаланинпродуцирующий штамм факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, ассимилирующий метанол по рибулозо-5-монофосфатному пути фиксации углерода, и *L*-лейцинпродуцирующий штамм облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus flagellatum*, реализующий 2-кето-3-дезоксиглюконатальдозазный вариант рибулозо-5-монофосфатного пути фиксации углерода. Для

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	$\text{CH}_3\text{OH}$	0	100	1.1
7	$^{13}\text{CH}_3\text{OH}$	0.1	72.0	1.0

\* Данные опытов 1–5 приведены для *B. methylicum* при выращивании на водных средах, содержащих 2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  и указанное количество (%)  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Данные опытов 6–7 приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде, содержащей 1%  $\text{CH}_3\text{OH}$  (6) или 1%  $(^{13}\text{C})$ метанол (7).

компенсации ауксотрофности по *L*-лейцину и *L*-изолейцину эти аминокислоты добавляли в ростовые среды в протонированном виде. При этом уровни накопления *L*-фенилаланина и *L*-лейцина в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов достигали величины 0.8 и 1.0 г/л соответственно [23]. Включение дейтерия в молекулы секретируемых аминокислот и суммарных белков биомассы осуществляли за счет выращивания штамма *B. methylicum* на средах с  $^2\text{H}_2\text{O}$  и обычным метанолом, так как уровень включения  $^2\text{H}$  в молекулы аминокислот за счет ассимиляции  $(^2\text{H})$ метанола незначителен [25].

Поскольку в клетке происходит ассимиляция водорода (дейтерия) из  $\text{H}_2\text{O}$  ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) среды, мы подбирали условия включения дейтерия в молекулы аминокислот и белков при ступенчатом возрастании концентрации  $^2\text{H}_2\text{O}$  в ростовых средах, как показано в табл. 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 ранее [23]. В данной работе были исследованы образцы культуральной жидкости *B. methylicum* и гидролизаты биомассы, полученные в ходе многоступенчатой адаптации бактерий к тяжелой воде на средах с различным содержанием  $^2\text{H}_2\text{O}$  (от 24.5 до 98%  $^2\text{H}_2\text{O}^*$ ). Поскольку этот штамм метилотрофных бактерий удалось адаптировать к росту на  $^2\text{H}_2\text{O}$ , исследование уровней включения дейтерия в молекулы аминокислот представлялось наиболее интересным.

\* Здесь и далее использованы проценты по объему.

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

В качестве другой модельной системы для включения изотопной метки в молекулы белков использовали бактериородопсин [26], синтезируемый в мембране *Halobacterium halobium* ET 1001. Выбор для этих целей бактериородопсина, функционирующего как АТФ-зависимая транслоказа в клетках галофильных бактерий, 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 сайт-специфического обогащения белка за счет выращивания *H. halobium* ET 1001 на синтетической среде с дейтерийсодержащими аналогами ароматических аминокислот: *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}$ ]фенилаланином, *L*-[3,5- $^2\text{H}$ ]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]триптофаном.

Основные этапы при выделении [ $^2\text{H}$ ]- и [ $^{13}\text{C}$ ]аминокислот заключались в выращивании штаммов-продуцентов на средах с мечеными субстратами – ( $^2\text{H}$ )метанолом, ( $^{13}\text{C}$ )метанолом и  $^2\text{H}_2\text{O}$  или *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}$ ]фенилаланином, *L*-[3,5- $^2\text{H}$ ]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]триптофаном (бактериородопсин); отделении культуральных жидкостей, содержащих секретиреваемые аминокислоты, от микробной биомассы; разрушении клеток, выделении фракции суммарных белков биомассы и бактериородопсина с последующим их гидролизом; дериватизации смесей аминокислот дансилхлоридом, бензилоксикарбонилхлоридом и диазومتаном; разделении метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот и *N*-Cbz-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ; масс-спектрометрией электронного удара полученных производных аминокислот.

$^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -содержащие аминокислоты выделяли из лиофилизированных культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот *B. methylcum* 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 пиг-

ментов экстракцией органическими растворителями (метанол–хлороформ–ацетон). В редких случаях для полного отделения от сопутствующих компонентов прибегали к солюбилизации белков в SDS 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. [27]), что особенно важно для бактериородопсина, являющегося высоко-спиральным белком. Поэтому при выделении бактериородопсина из пурпурных мембран галофильной бактерии *H. halobium* ET 1001 мы солюбилизовали его в 0.5% растворе SDS с сохранением  $\alpha$ -спиральной конфигурации белка [28], а далее осаждали метанолом. Гомогенность очищенного бактериородопсина была подтверждена электрофорезом в 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS.

Гидролиз дейтериймеченых белков проводили в условиях предотвращения реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ходе гидролиза и сохранения остатков ароматических аминокислот в белке. Были рассмотрены два альтернативных варианта проведения гидролиза – кислотный и щелочной. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 М HCl, 24 ч, 110°C), как известно, приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот [29]. Другим значительным недостатком при проведении гидролиза в HCl является изотопный ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ )-обмен ароматических протонов (дейтеронсв) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтеронсв) при атоме C3 аспарагиновой и C4 глутаминовой кислот [30]. Поэтому, чтобы получить реальные данные о биосинтетическом включении дейтерия в молекулы аминокислот, необходимо проводить гидролиз белка с использованием дейтерированных реагентов (6 М  $^2\text{HCl}$  с 3% фенолом (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ )). Другой вариант гидролиза белка заключался в использовании 2 М Ba(OH) $_2$  (110°C, 24 ч). В этих условиях гидролиза белка реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ароматических аминокислотах – тирозине и триптофане – не происходит, а триптофан не разрушается. Оба метода гидролиза показали хорошие результаты по сохранению ароматических аминокислот в гидролизатах белка и содержанию дейтерия в молекулах аминокислот. Необходимо подчеркнуть, однако, что для препаративного получения дейтерированных аминокислот из белка микроорганизмов целесообразнее использовать гидролиз в  $^2\text{HCl}$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (в присутствии добавки фенола для сохранения ароматических аминокислот), позволяющий избежать рацемизации. Для изучения же уровня включения стабильных изотопов в остатки ароматических кислот бактериородопсина и в аналитических целях

лучше применять гидролиз белка в растворе  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , при котором отсутствует ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ )-обмен в аминокислотах и сохраняются остатки фенилаланина, тирозина и триптофана. При щелочном гидролизе возможная рацемизация аминокислот не влияет на результат последующего масс-спектрометрического определения уровней включения дейтерия в аминокислоты.

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

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

Эффективность использования N-Cbz-производных аминокислот в обращенно-фазовой ВЭЖХ и в масс-спектрометрических исследованиях была показана ранее [31, 32]. Летучесть N-производных аминокислот при масс-спектрометрическом анализе может быть повышена за счет дополнительной дериватизации по карбоксильной группе, поэтому N-Dns-аминокислоты были переведены в их метиловые эфиры. Для предотвращения обратного изотопного обмена ароматических протонов (дейтеронов) при этерификации дейтерий-меченых аминокислот в данной работе отдали предпочтение использованию диазометана [33]. Свежеприготовленным раствором диазометана в диэтиловом эфире обрабатывали сухие остатки смесей аминокислот. При дериватизации аминокислот диазометаном происходило дополнительное N-метилирование по  $\alpha$ -NH-(Dns)-группе 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.

В данной работе включение изотопов  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот мультикомпонентных смесей в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов определяли методом масс-спектрометрии электронного удара. Метиловые эфиры N-Dns-производных аминокислот или N-Cbz-про-

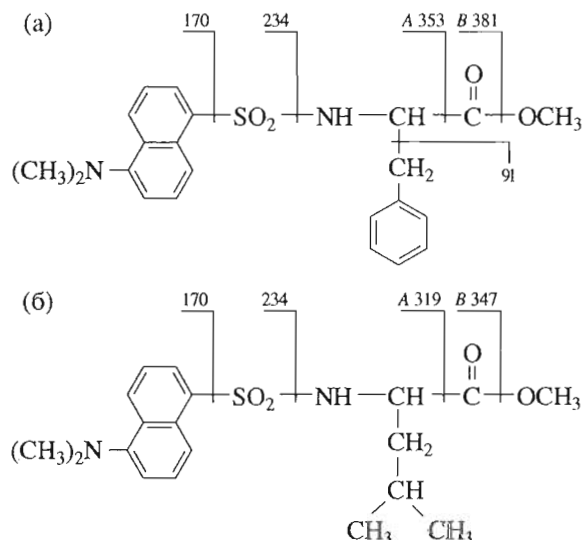


Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с  $M_r$  412 (а) и N-Dns-лейцина с  $M_r$  378 (б) при масс-спектрометрии электронного удара.

изводные аминокислот препаративно разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Степени хроматографической чистоты  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -содержащих аминокислот, выделенных из культуральных жидкостей *B. methylicum* и *M. flagellatum* и гидролизатов белков в виде их N-Cbz-производных аминокислот, составили 96–98% при выходах 67–89%. Для отдельных аминокислот оказалось более удобным разделение в виде метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот. При этом степень хроматографической чистоты полученных из гидролизатов бактериородопсина метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина, N-Dns-тирозина и N-Dns-триптофана составила 96, 96 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 аминокислоты в присутствии низкомолекулярных метаболитов среды и других продуктов дериватизации. Последний факт очень важен для изучения состава пула аминокислот, секретлируемых 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 при  $m/z$  412 и 378 и к образованию дансильных фрагментов и продуктов их дальнейшего распада до N-диметиламиноафталина, а также к получению аминных  $A^+$  и аминокислотных фрагментов  $B^+$ . Показанная на рис. 1 фрагментация метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина характерна для

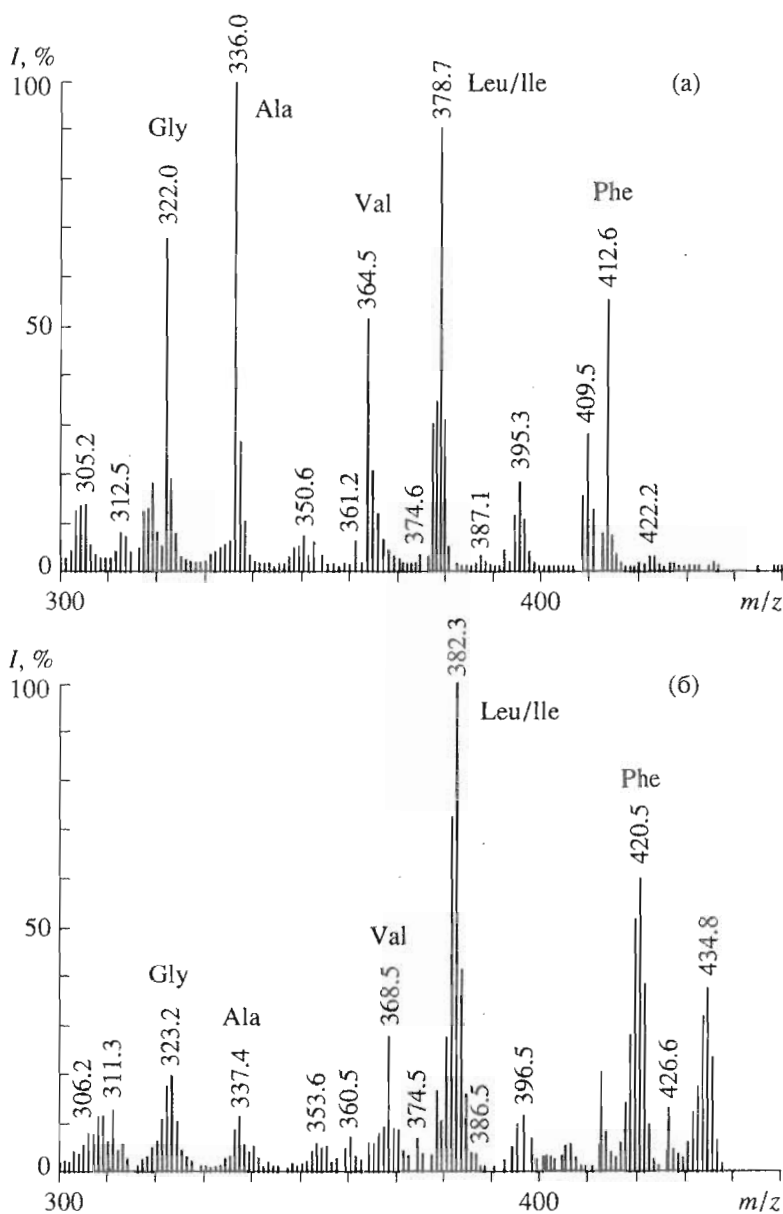


Рис. 2. Масс-спектры метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *M. flagellatum* после ее обработки дансилхлоридом и диазометаном. Условия выращивания: 1% CH<sub>3</sub>OH в H<sub>2</sub>O (а) и 1% (<sup>13</sup>C)метанол в H<sub>2</sub>O (б). Символом аминокислоты здесь и далее обозначен пик молекулярного иона M<sup>+</sup> производных аминокислот.

таких производных всех других аминокислот, что позволяет проводить масс-спектрометрический мониторинг изотопномеченных 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 в аминокислоты белковых гидролизатов.

При использовании в качестве источников стабильных изотопов (<sup>13</sup>C)метанола и <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O в клетке синтезируются изотопнозамещенные аминокислоты, различающиеся количеством включенных

атомов <sup>13</sup>C и <sup>2</sup>H. При этом, чем выше молекулярная масса аминокислот, тем возможен больший набор ионов, соответствующих изотопнозамещенным формам. Пики при m/z 323.2, 337.4, 368.5, 382.3, 420.5 в масс-спектре [<sup>13</sup>C]аминокислот дериватизованной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной среды, содержащей 1% (<sup>13</sup>C)метанол (рис. 2б), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns-производным глицина, аланина, валина, лейцина/изолейцина и фенилаланина. Следует подчеркнуть, что величина m/z для молекулярного иона метиловых эфиров N-Dns-лейцина и изолейцина в масс-спектрах электронного удара

одинакова, поэтому данным методом нельзя точно идентифицировать эти аминокислоты. Максимальные уровни включения  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот, измеренные по увеличению усредненного значения  $m/z$  для молекулярного иона изотопномеченного образца в сравнении с молекулярной массой природной аминокислоты, варьируют от 35% для [ $^{13}\text{C}$ ]аланина до 95% для [ $^{13}\text{C}$ ]фенилаланина (табл. 2). Учитывая аукотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснен вкладом экзогенного *L*-изолейцина в уровень изотопного включения лейцина/изолейцина, а также других метаболически связанных с ним аминокислот (см. текст ниже).

Для штамма *B. methylicum* наблюдалось специфическое возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулы индивидуальных аминокислот культуральных жидкостей (табл. 2) при ступенчатом увеличении концентраций  $^2\text{H}_2\text{O}$  в ростовой среде. Уровни включения дейтерия в молекулы разных аминокислот при одинаковых условиях культивирования различаются. Такой результат зафиксирован во всех экспериментах, где источником стабильных изотопов служили  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Из масс-спектра метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот культуральной жидкости, полученной со среды, содержащей 49%  $^2\text{H}_2\text{O}$  (рис. 3б), видно, что молекула фенилаланина содержала 6 изотопнозамещенных форм со средним значением  $m/z$  414.2, которое возрастает по

сравнению с контрольными условиями ( $m/z$  412.0, рис. 3а) на 2.2 единицы, т.е. 27.5% 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  $\alpha$ -NH-(Dns)-группе. Пик с  $m/z$  400 (рис. 3б), вероятнее всего, отвечает продукту отщепления метильной группы от дейтерированного производного фенилаланина.

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-фенилаланина с  $m/z$  416.1, указывает на увеличение молекулярной массы фенилаланина на 4.1 единицы, т.е. 51.2% атомов водорода в молекуле фенилаланина в этом случае замещены на дейтерий. Очевидно, что атомы дейтерия включились в молекулу фенилаланина за счет процесса биосинтеза *de novo*, т.е. по углеродному скелету молекулы. К легкообмениваемым следует отнести протоны (дейтероны) при гетероатомах в  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -группах аминокислот, которые замещаются за счет легкости диссоциации в  $\text{H}_2\text{O}$  ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ).

Из табл. 2 видно, что в условиях аукотрофности по *L*-лейцину уровни включения  $^2\text{H}$  в молекулы

Таблица 2. Уровни включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот, секретируемых в культуральную жидкость (КЖ) *B. methylicum* и *M. flagellatum*, и в аминокислотные остатки белков (данные получены для метиловых эфиров *N*-Dns-аминокислот и *N*-Cbz-аминокислот)

Аминокислоты	Содержание $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде, %*								1% $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ **	
	24.5		49.0		73.5		98.0			
	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок
Gly	–	15.0	–	35.0	–	50.0	–	90.0	60.0	90.0
Ala	24.0	20.0	37.5	45.0	62.5	62.5	77.5	97.5	35.0	95.0
Val	20.0	15.0	46.3	36.3	43.8	50.0	58.8	50.0	50.0	50.0
Leu/Ile	15.0	10.0	47.0	42.0	46.0	45.0	51.0	49.0	38.0	49.0
Phe	15.0	24.5	27.5	37.5	51.2	50.0	75.0	95.0	95.0	80.5
Tyr	–	20.0	–	25.6	–	68.8	–	92.8	–	53.5
Ser	–	15.0	–	36.7	–	47.6	–	86.6	–	73.3
Asp	–	20.0	–	36.7	–	60.0	–	66.6	–	33.3
Glu	–	20.0	–	40.0	–	53.4	–	70.0	–	40.0
Lys	–	10.0	–	35.3	–	40.0	–	58.9	–	54.4

\* Приведены данные по включению  $^2\text{H}$  в молекулы аминокислот для *B. methylicum* при выращивании на водных средах, содержащих 2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  и указанное количество (%)  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

\*\* Данные по включению  $^{13}\text{C}$  приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде, содержащей 1% ( $^{13}\text{C}$ )метанол.

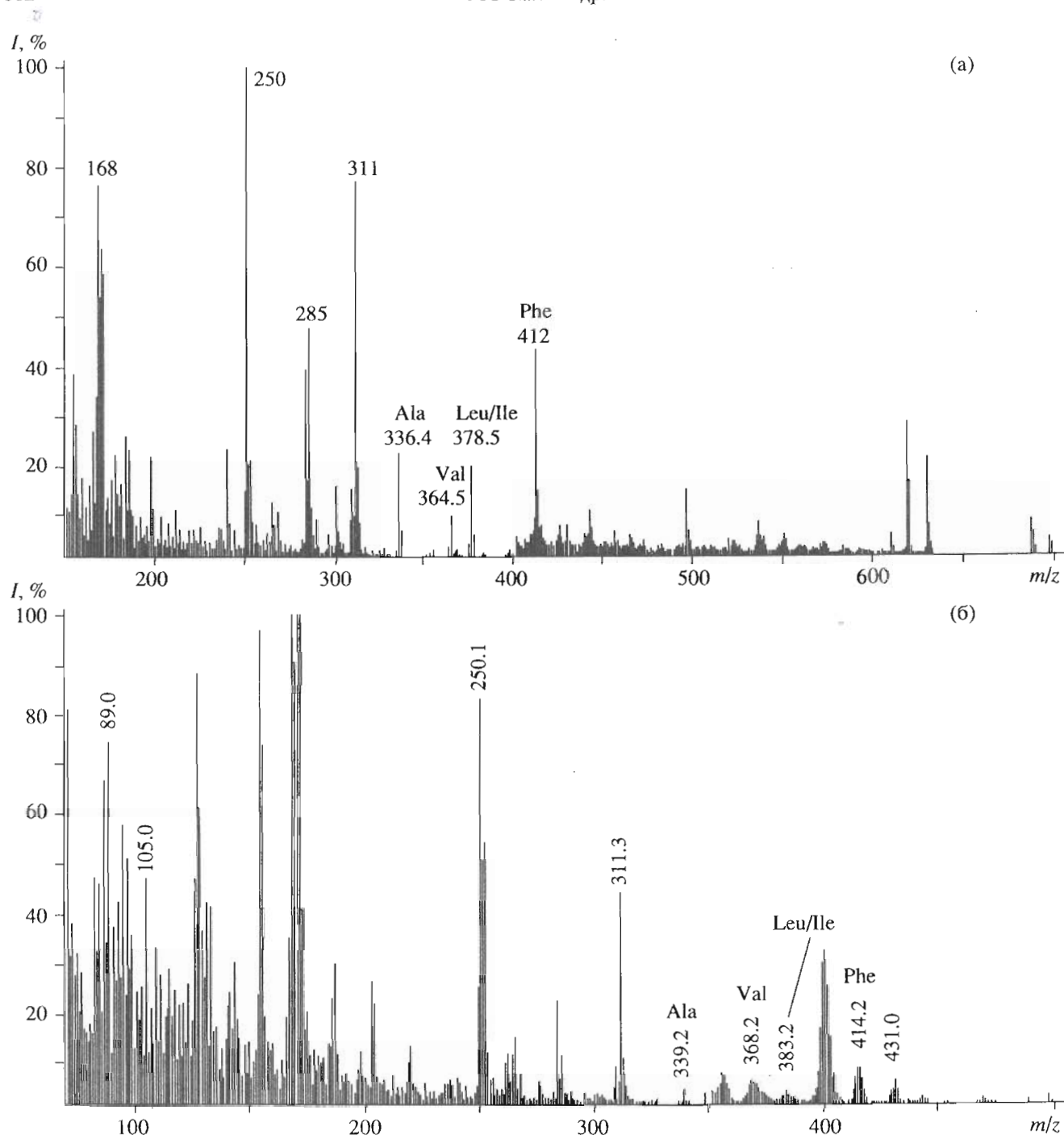


Рис. 3. Масс-спектры метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum* при выращивании в водной среде, содержащей 2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  (а) и 2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в 49%  $^2\text{H}_2\text{O}$  (б).

лейцина/изолейцина ниже, чем для фенилаланина. Отмеченная особенность отчетливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Еще раз этот результат подтвердил рис. 5, где показан масс-спектр [ $^2\text{H}$ ]аминокислот культуральной жидкости в виде метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот после выращивания бактерий *B. methylicum* в указанных

условиях. Видно, что величина  $m/z$  418.0 пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-фенилаланина увеличивается по сравнению с контрольными условиями на 6 единиц, что соответствует замещению 75% общего количества атомов водорода в молекуле. В отличие от фенилаланина уровень включения дейтерия в лейцин/изолейцин составил 51.0%, а в валин – 58.8%. Примечательно,

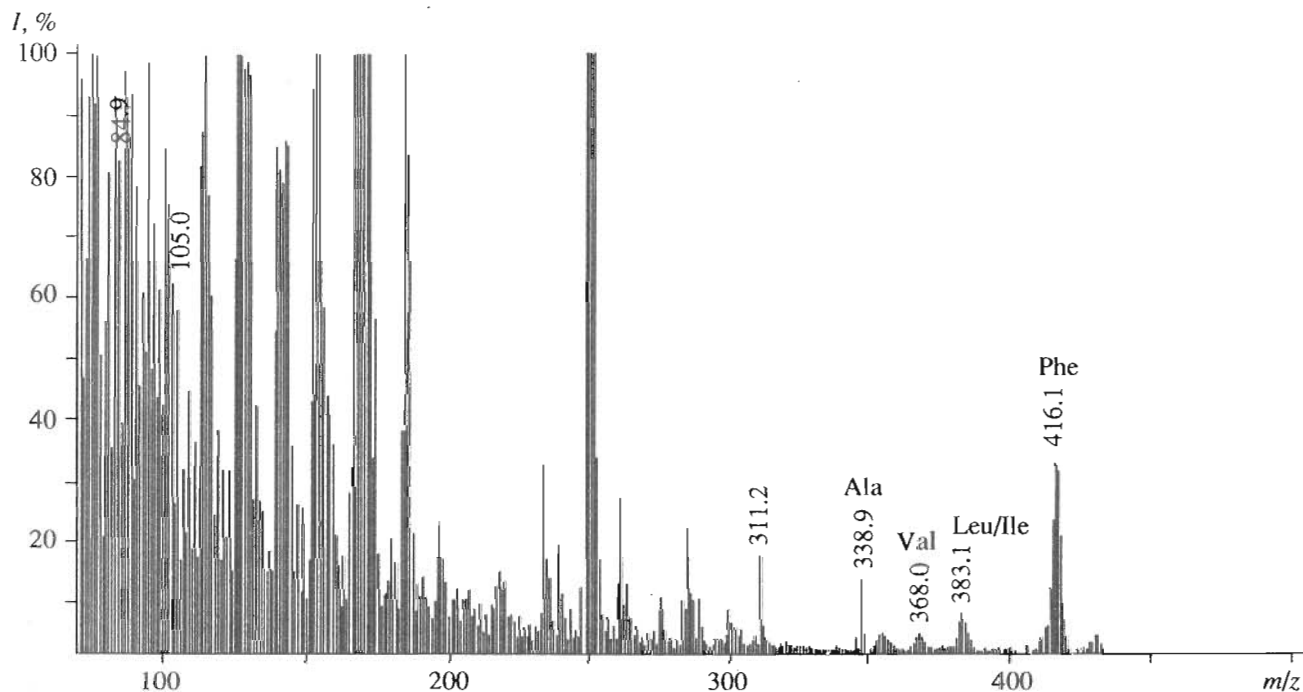


Рис. 4. Масс-спектр метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum* при выращивании в водной среде, содержащей 2% CH<sub>3</sub>ОН в 73.5% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O.

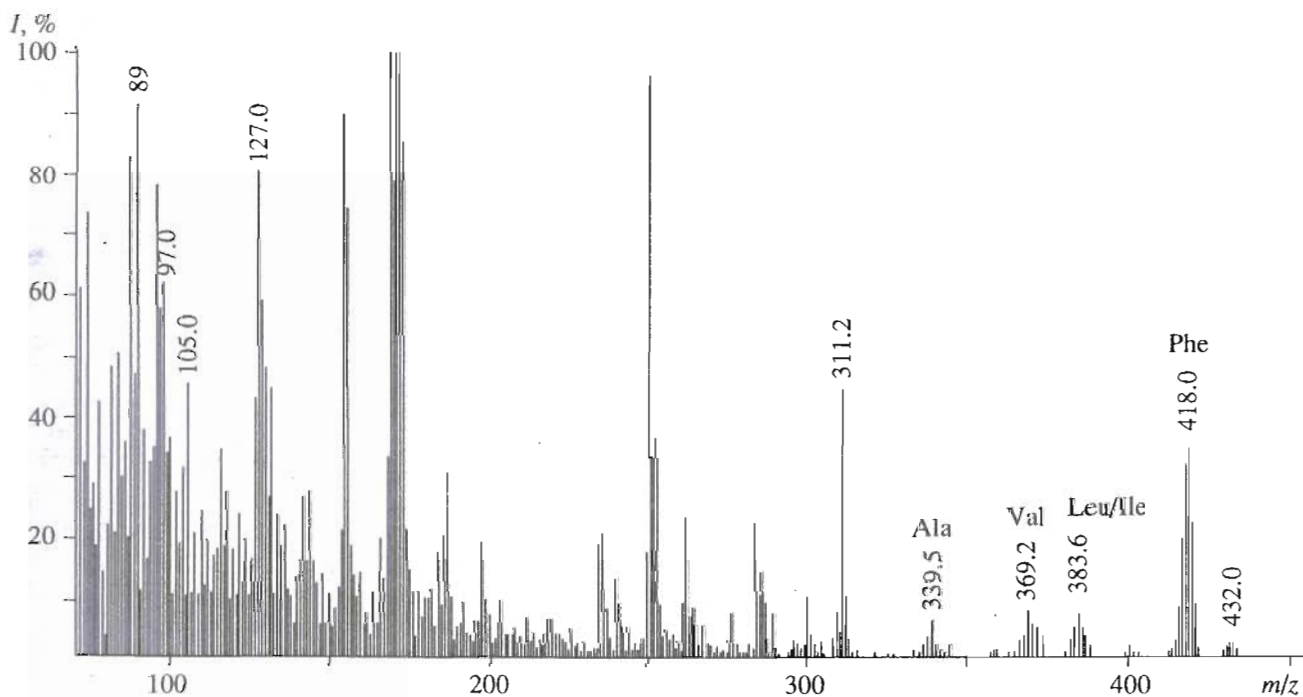


Рис. 5. Масс-спектр метиловых эфиров N-Dns-аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2% CH<sub>3</sub>ОН в 98% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O.

что в масс-спектре этого образца фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного фрагмента при  $m/z$  97.0 (вместо  $m/z$  при 91.0 в контроле), что указывает на частичную локализацию

атомов дейтерия в молекуле фенилаланина в положениях C2–C6 ароматического кольца и сопредельном с ними положении при углеродном атоме β. Несмотря на то что в остальных опытах пики



бензильных фрагментов не были зафиксированы, логично предположить, что при других концентрациях  $^2\text{H}_2\text{O}$  дейтерий также включается в ароматическое кольцо фенилаланина, так как в  $^2\text{H}_2\text{O}$  метаболизм у штамма *V. methylicum* не прерывает существенных изменений [25].

Аналогичная закономерность в уровнях включения  $^{13}\text{C}$  в молекулы аминокислот, связанных с ауксотрофным метаболизмом, проявляется при выращивании *L*-изолейцинзависимого штамма *M. flagellatum* на среде с 1% ( $^{13}\text{C}$ )метанолом. Как видно из табл. 2, в отличие от наблюдаемого для [ $^{13}\text{C}$ ]фенилаланина (уровень изотопного включения 95.0%) уровни включения изотопа  $^{13}\text{C}$  в молекулы лейцина/изолейцина, аланина и валина составили 38.0, 35.0, 50.0% соответственно. Уровень изотопного включения для [ $^{13}\text{C}$ ]глицина (60%) хотя и выше, чем для трех последних аминокислот, но намного ниже, чем для фенилаланина.

Суммируя полученные данные по уровням включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в молекулы секретируемых аминокислот, можно сделать вывод о сохранении минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом лейцина и метаболически родственных с ним аминокислот *de novo*. Другим логическим объяснением наблюдаемого эффекта, если принять во внимание происхождение лейцина и изолейцина по различным путям биосинтеза, может быть ассимиляция клеткой немеченого лейцина из среды на фоне биосинтеза меченого изолейцина *de novo*. Учитывая данные эффекты, следует подчеркнуть, что использование ауксотрофных форм микроорганизмов для получения изотопномеченых аминокислот не оправдывает себя практически из-за множественного включения изотопов в молекулы. Напротив, использование для этих целей прототрофных форм микроорганизмов кажется более перспективным.

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, а также индивидуального белка — бактериородопсина. Как видно из рис. 6, до 10 аминокислот могут быть идентифицированы в гидролизате белка *V. methylicum* по пикам молекулярных ионов метиловых эфиров их *N*-Dns-производных аминокислот. Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, пики  $M^+$  соответствовали смесям изотопнозамещенных форм аминокислот. Для лизина и тирозина пики  $M^+$  соответствовали метиловым эфирам дипроизводных аминокислот —  $\alpha,\epsilon$ -ди-Dns-лизину (с  $M^+$  при  $m/z$  631.0) и *O,N*-ди-Dns-тироzinу (с  $M^+$  при  $m/z$  663.9). Уровни изотопного включения дейтерия в молекулы аминокислот при содержании  $^2\text{H}_2\text{O}$  в ростовой среде

49% варьируют от 25.6% для тирозина до 45.0% для аланина (рис. 6б, табл. 2). В молекулах глицина, валина, фенилаланина, серина, лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот они находятся в пределах 35–40%. Что касается других 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 обращенно-фазовой ВЭЖХ в виде *N*-Cbz-производных аминокислот или метиловых эфиров их *N*-Dns-производных аминокислот и ионообменной хроматографии, где детектируется уже 15 аминокислот (см., например, рис. 7).

Полученные данные свидетельствуют о возможности достижения максимальных уровней включения стабильных изотопов  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в аминокислотные остатки суммарных белков биомассы (за исключением лейцина/изолейцина и валина, сниженные уровни включения для которых объясняются эффектом ауксотрофности по *L*-лейцину и *L*-изолейцину). Например, в случае с дейтерированными аминокислотами полного замещения на стабильные изотопы удалось достичь за счет использования в качестве источника дейтерия 98%  $^2\text{H}_2\text{O}$  (табл. 2). Как видно из табл. 2, при росте *V. methylicum* на среде с 98%  $^2\text{H}_2\text{O}$  уровни включения дейтерия в остатки глицина, аланина, фенилаланина и тирозина составляют 90.0, 97.5, 95.0 и 92.8%. В экспериментах по включению изотопа  $^{13}\text{C}$  в суммарные белки биомассы за счет утилизации ( $^{13}\text{C}$ )метанола метилотрофными бактериями *M. flagellatum* также наблюдались высокие уровни изотопного включения в глицине (90%), аланине (95.0%) и фенилаланине (80.5%) (табл. 2). Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, сниженные уровни включения стабильных изотопов в лейцине/изолейцине (49%), а также в метаболически связанных с ним аминокислотах в этих условиях могут быть объяснены эффектом ауксотрофности штамма по *L*-изолейцину, который добавляли в ростовую среду в немеченом виде.

Во всех экспериментах по включению стабильных изотопов в молекулы аминокислот уровни включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в метаболически связанные аминокислоты обнаружили определенную корреляцию. Так, уровни изотопного включения для валина и лейцина (семейство пирувата), фенилаланина и тирозина (семейство ароматических аминокислот) коррелируют (см. табл. 2). Уровни изотопного включения для глицина и серина (семейство серина), аспарагиновой кислоты и лизина (семейство аспарагина) также имеют близкие величины. 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

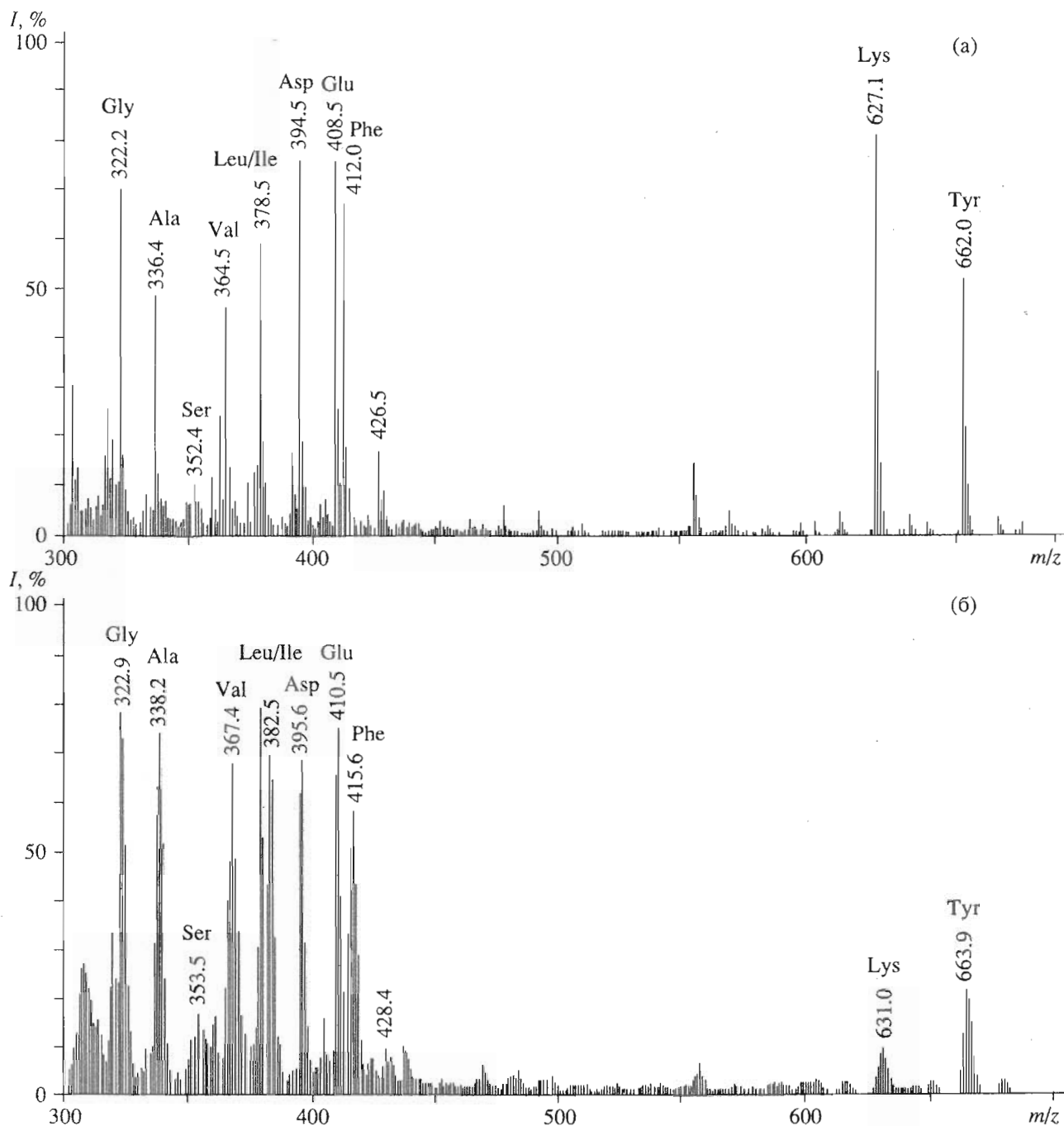


Рис. 6. Масс-спектры смеси метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот дериватизованных гидролизатов суммарных белков биомассы *B. methylicum* при выращивании в H<sub>2</sub>O, содержащей 2% CH<sub>3</sub>OH (а) и 2% CH<sub>3</sub>OH в 49% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (б).

также коррелируют. Причина некоторых наблюдаемых расхождений в уровнях включения изотопов в молекулы аминокислот до конца не изучена.

Данный биосинтетический подход показал хорошие результаты по изучению введения дейтериевой метки в молекулу бактериородопсина, выращенного на среде, содержащей L-[2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H]фенилаланин, L-[3,5-<sup>2</sup>H]тирозин и L-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H]триптофан. Как видно из рис. 8, в масс-спектре дериватизо-

ванного гидролизата бактериородопсина детектируются пики, соответствующие молекулярным ионам обогащенных дейтерием метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с молекулярным ионом при m/z 417 (ср. m/z 412 для немеченого производного фенилаланина), N-Dns-тирозина с M<sup>+</sup> при m/z 429 (ср. m/z 428 для производного тирозина) и N-Dns-триптофана с M<sup>+</sup> при m/z 456 (ср. m/z 451 для производного триптофана). Все они отвечают

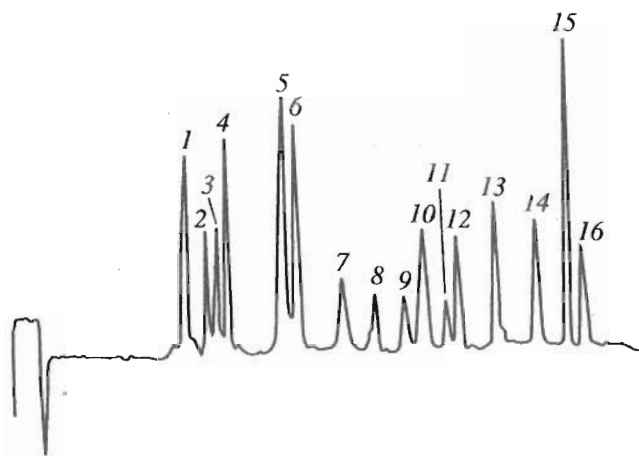


Рис. 7. Ионнообменная хроматография гидролизата суммарных белков *B. methylicum*. Условия выращивания: 2% CH<sub>3</sub>OH в 98% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O: 1 – Asp; 2 – Thr; 3 – Ser; 4 – Glu; 5 – Gly; 6 – Ala; 7 – Val; 8 – Met; 9 – Ile; 10 – Leu; 11 – Tyr; 12 – Phe; 13 – His; 14 – Lys; 15 – аммиак; 16 – Arg.

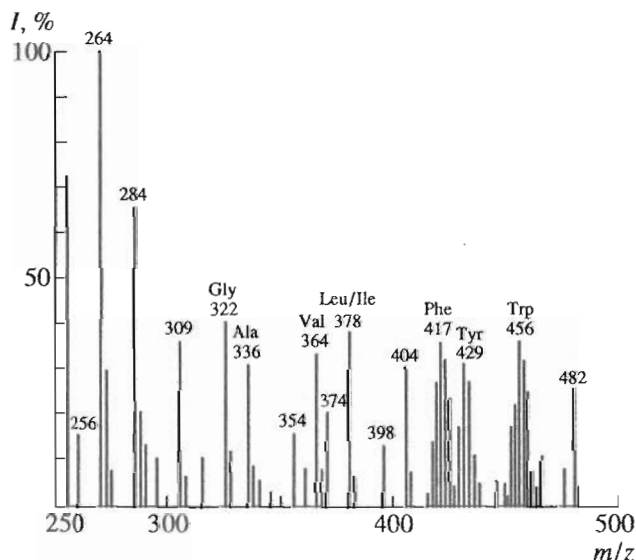


Рис. 8. Масс-спектр гидролизата бактериородопсина, полученного на среде, содержащей *L*-[2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланин, *L*-[3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозин и *L*-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофан в виде метиловых эфиров *N*-Dns-производных аминокислот.

смеси изотопозамещенных форм аминокислот, различающихся количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Множественный характер включения дейтерия свидетельствует о возможном вкладе биосинтеза *de novo* в уровни дейтерированности ароматических аминокислот, но также не исключено, что он определяется самим способом получения изотопномеченых молекул. Кроме вышеобозначенных аминокислот в масс-спектре фиксируются пики молекулярных ионов

метиловых эфиров *N*-Dns-глицина ( $m/z$  322), *N*-Dns-аланина ( $m/z$  336), *N*-Dns-валина ( $m/z$  364) и *N*-Dns-лейцина/изолейцина ( $m/z$  378). Как и следовало ожидать, эти аминокислотные остатки в бактериородопсине не содержат дейтерия.

Таким образом, проведенные 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.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *D,L*-аминокислоты (Reanal, Венгрия), аденозин- и уридин-5-монофосфаты (Sigma, США), панкреатическую телячью дезоксирибонуклеазу I (Fluka Chemie AG, Швейцария), додецилсульфат натрия (Chemapol, Чехо-Словакия), *L*-[2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланин (90 ат. % <sup>2</sup>H), *L*-[3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозин (96 ат. % <sup>2</sup>H) и *L*-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофан (98 ат. % <sup>2</sup>H) (способы получения указаны в работах [34, 35]) были предоставлены А.Б. Пшеничниковой (МИТХТ). Для синтеза производных аминокислот использовали *N*-диметиламинонафталин-5-сульфохлорид (дансилхлорид) (Sigma, США), бензилоксикарбонилхлорид (Войковский химзавод, РФ) и diazometan, 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:

*Brevibacterium methylicum* ВКПМ В 5652, *L*-лейцинзависимый штамм факультативных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-фенилаланина;

*Methylobacillus flagellatum* КТ, *L*-изолейцинзависимый штамм облигатных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-лейцина;

*Halobacterium halobium* ET 1001, пигментсодержащий штамм галофильных бактерий, способный синтезировать бактериородопсин.

Выращивание метилотрофных бактерий *B. methylicum* и *M. flagellatum* осуществляли на минеральной среде М9 [36] в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с наполнением средой 50 мл по методике [23], используя в качестве источников

стабильных изотопов ( $^2\text{H}$ )метанол, ( $^{13}\text{C}$ )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 (10000g, 20 мин). В культуральной жидкости анализировали секретируемые аминокислоты.

Для выделения фракции суммарных белков биомассы клетки дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием (10000g, 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 получения дейтериймеченого бактериородопсина использовали синтетическую среду, содержащую 18 аминокислот, в которой немеченые *L*-аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) были заменены их дейтерированными аналогами – [2,3,4,5,6- $^2\text{H}$ ]фенилаланином, [3,5- $^2\text{H}$ ]тирозином и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]триптофаном (*D,L*-аланин – 0.43; *L*-аргинин – 0.4; *D,L*-аспарагиновая кислота – 0.45; *L*-цистеин – 0.05; *L*-глутаминовая кислота – 1.3; *L*-глицин – 0.06; *D,L*-гистидин – 0.3; *D,L*-изолейцин – 0.44; *L*-лейцин – 0.8; *L*-лизин – 0.85; *D,L*-метионин – 0.37; *D,L*-фенилаланин – 0.26; *L*-пролин – 0.05; *D,L*-серин – 0.61; *D,L*-треонин – 0.5; *L*-тирозин – 0.2; *D,L*-триптофан – 0.5; *D,L*-валин – 1.0); нуклеотиды (аденозин-5-монофосфат – 0.1; уридин-5-монофосфат – 0.1); соли ( $\text{NaCl}$  – 250;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 20;  $\text{KCl}$  – 2;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0.5;  $\text{KNO}_3$  – 0.1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.05; цитрат натрия – 0.5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  –  $3 \times 10^{-4}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.065;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $7 \times 10^{-5}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $5 \times 10^{-4}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  –  $5 \times 10^{-5}$ ); глицерин – 1.0; ростовые факторы (биотин –  $0.1 \times 10^{-3}$ ; фолиевая кислота –  $10 \times 10^{-3}$ ; витамин  $\text{B}_{12}$  –  $0.02 \times 10^{-3}$ ) (концентрации компонентов приведены в г/л).

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- $\text{HCl}$  (pH 7.6), добавляли 1 мг дезоксирибонуклеазы I и инкубировали 5–6 ч при 37°C, затем разбавляли дистиллированной водой до 200 мл и инкубировали 15 ч при 4°C. Осадок промывали дистиллированной водой с последующим отделением водной фракции до получения бесцветных промывных вод. Чистоту полученной суспензии пурпурных мембран (в  $\text{H}_2\text{O}$ ) контролировали на спектрофотометре Beckman DU-6 (США) по соотношению полос поглощения 280/568 нм ( $\epsilon_{280} 1.1 \times 10^5$  [37] и  $\epsilon_{568} 6.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [38]).

Бактериородопсин выделяли по методу [39], солибилизируя препараты пурпурных мембран (50 мг) в 2 мл 0.5% раствора SDS в  $\text{H}_2\text{O}$  и осаждая продукт 5-кратным избытком метанола на холоду (0°C). Выход бактериородопсина составил 17–20 мг.

Электрофорез препаратов бактериородопсина проводили в 12.5% ПААГ с 0.1% SDS. Образцы для электрофореза готовили стандартным способом (протокол фирмы 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, США).

Липиды и пигменты экстрагировали смесью хлороформ-метанол-ацетон (2 : 1 : 1) по методу Блайя и Дайера [40].

Гидролиз белка проводили 6 М  $^2\text{HCl}$  (3% фенола в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) или 2 М  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (110°C, 24 ч) [41].

**N-Dns-аминокислоты.** К 4–5 мг лиофилизированных препаратов культуральной жидкости и белковых гидролизатов в 1 мл 2 М  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9–10) порциями при перемешивании добавляли 25.6 мг дансилхлорида в 2 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при перемешивании при 40°C, затем подкисляли 2 М  $\text{HCl}$  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.

**Метилловые эфиры N-Dns-аминокислот.** Для получения диазометана к 20 мл 40%  $\text{KOH}$  в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г влажной нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течение 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-дансиламинокислот в составе культуральной жидкости или гидролизатов суммарных белков биомассы.

**N-Cbz-аминокислоты.** К 1.5 мл охлажденного до 0°C раствора культуральной жидкости (50 мг) или белковых гидролизатов (4–5 мг) в 4 М  $\text{NaOH}$  добавляли порциями при перемешивании 2 мл 4 М  $\text{NaOH}$  и 28.5 мг бензилоксикарбонилхлорида. Реакционную смесь выдерживали при 0°C, перемешивали 3 ч, подкисляли 2 М  $\text{HCl}$  до pH 3 и продукты 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 аминокислот** осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (Чехо-Словакия) в системах растворителей: хлороформ-метанол-уксусная кислота, 10 : 1 : 0.3 (А) для

N-Cbz-аминокислот и хлороформ-метанол-ацетон, 7 : 1 : 1 (B) для метиловых эфиров N-Dns-аминокислот.

N-Cbz-аминокислоты детектировали по поглощению при 254 нм. Метилловые эфиры N-Dns-аминокислот детектировали по флуоресценции в УФ-свете.

**Аналитическое и препаративное разделение смеси N-Cbz-аминокислот культуральной жидкости и белковых гидролизатов осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [31].**

**Метилловые эфиры N-Dns-аминокислот** разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженном насосом Knauer, УФ-детектором 2563 и интегратором C-R 3A (Shimadzu, Япония). Использовали неподвижную фазу: Separon SGX C<sub>18</sub>; 18,7 мкм; 150 × 3,3 мм (Kova, Чехо-Словакия); система растворителей: А – ацетонитрил-трифторуксусная кислота, 20 : 80; В – ацетонитрил. Использовали градиентное элюирование: от 0 до 20% В – 5 мин, от 20 до 100% В – 30 мин, 100% В – 5 мин, от 100 до 0% В – 2 мин, 0% В – 10 мин.

**Ионообменную хроматографию белковых гидролизатов** осуществляли на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230 × 3,2 мм; рабочее давление 50–60 атм; скорость подачи натрий-цитратного буфера 18,5; нингидрина – 9,25 мл/ч; детекция при 570 и 440 нм (для пролина).

**Секретируемый L-фенилаланин и L-лейцин** определяли на приборе Beckman DU-6 (США) при 540 нм в образцах культуральной жидкости объемом 10 мкл после ее обработки нингидрином.

**Масс-спектры электронного удара** производных аминокислот снимали на приборе MB-80 A (Hitachi, Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beaufreire B., Fournier V., Salle B., Putet G.* // *Am. J. Physiol.* 1992. V. 263. P. 214–220.
2. *McIntosh L.P., Dahlquist F.W.* // *Quart. Revs Biophys.* 1990. V. 23. P. 1–38.
3. *Young V.R., Tu Y.M., Krempf M.* // *New Techniques in Nutritional Research*. V. 9 / Ed. R.G. Whitehead. N.Y.: Acad. Press, 1990. P. 17–72.
4. *Fesic S.W., Zuiderweg E.R.* // *Quart. Revs Biophys.* 1990. V. 23. P. 97–131.
5. *Haris P.I., Robillard G.T., Vandijk A.A., Chapman D.* // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 6279–6284.
6. *Rothschild K.J., Braiman M.S., Yi-Wu He, Marti T., Khorana H.G.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 121. P. 16985–16990.
7. *Raap J., Winkel C., de Wit A.H.M., van Houten A.H.H., Hoff A.J., Lugtenburg J.* // *Anal. Biochem.* 1990. V. 191. P. 9–18.
8. *Stockman B.J., Reily M.D., Westler W.M., Ulrich E.L., Markley J.L.* // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 230–236.
9. *Ellman J.A., Volkman B.F., Mendel D.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 7959–7961.
10. *Redfield C., Dobson C.M.* // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 122–136.
11. *Zuiderweg E.R.P., McIntosh L.P., Dahlquist F.W., Fesik S.W.* // *J. Mag. Reson.* 1986. V. 2. P. 210–216.
12. *Hruby V.J.* // *J. Synth. Appl. Isot. Label Comp.* 1985. V. 4. P. 287–292.
13. *Berger A., Smolarsky M., Kurn N., Bosshard H.R.* // *J. Org. Chem.* 1973. V. 38. P. 457–460.
14. *Raap J., Wolthuis W.N.E., Hehenkamp J.J.J., Lugtenburg J.* // *Amino Acids*. 1995. V. 8. P. 171–186.
15. *Lugwig S.N., Unkefer C.J.* // *J. Label. Comp. Radiopharm.* 1992. V. 31. P. 95–102.
16. *van der Berg E.M.M., van Liemt J.H., Willem B.S.* // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1989. V. 108. P. 304–313.
17. *McIntosh L.P., Griffey R.H., Muchmore D.C., Nielson C.P., Redfield A.G., Dahlquist F.W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 1244–1248.
18. *Karnaukhova E.N., Reshetova O.S., Semenov S.Y., Skladnev D.A., Tsygankov D.Y.* // *Amino Acids*. 1994. V. 6. P. 165–176.
19. *Katz J.J., Crespi H.L.* // *Pure Appl. Chem.* 1972. V. 32. P. 221–250.
20. *Patel G.B., Sprott G.D., Ekiel I.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. P. 1099–1103.
21. *LeMaster D.M., Cronan J.E.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 1224–1230.
22. *LeMaster D.M.* // *Quart. Revs Biophys.* 1990. V. 23. P. 133–174.
23. *Мосин О.В., Карнаухова Е.Н., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Акимова О.Л.* // *Биотехнология*. 1993. № 9. С. 16–20.
24. *Егорова Т.А., Мосин О.В., Еремин С.В., Карнаухова Е.Н., Звонкова Е.Н., Швец В.И.* // *Биотехнология*. 1993. № 8. С. 45–50.
25. *Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Юркевич А.М., Швец В.И.* // *Биотехнология*. 1996. № 3. С. 3–12.
26. *Stoeckenius W., Bogomolni R.A.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1982. V. 51. P. 587–616.
27. *Первушин К.В., Арсеньев А.С.* // *Биоорган. химия*. 1995. Т. 21. С. 83–111.
28. *Steel J.C.H., Reynolds J.A.* // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 1633–1638.
29. *Звонкова Е.Н., Зотчик Н.В., Филиппович Е.И., Митрофанова Т.К., Мяжкова Г.И., Серебренникова Г.А.* *Химия биологически активных природных соединений*. М.: Химия, 1970. С. 65–68.
30. *Cohen J.S., Putter I.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. V. 222. P. 515–520.
31. *Egorova T.A., Eremin S.V., Mitsner B.I., Zvonkova E.N., Shvets V.I.* // *J. Chromatogr. B*. 1995. V. 665. P. 53–62.

32. Daniely B. // J. Org. Mass Spectrometry. 1989. V. 24. P. 225–229.
33. Физер Л.Ф., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1971. Т. 2. С. 92.
34. Griffiths D.V., Feeney J., Roberts G.C., Burgen A.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 446. P. 479–585.
35. Matthews H.R., Kathleen S., Matthews K., Stanley J. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 497. P. 1–13.
36. Miller J.H. // Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.: Cold Spring Harbor, 1976. P. 393.
37. Oesterheld D., Hess B. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 37. P. 316–326.
38. Tokunada F., Ebrey T. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 1915–1922.
39. Oesterheld D., Stoeckenius W. // Meth. Enzymol. 1974. V. 31. P. 660–668.
40. Bligh E.G., Dyer W.J. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. № 8. P. 911–918.
41. Мосин О.В., Егорова Т.А., Чеботаев Д.В., Складнев Д.А., Юркевич А.М., Швеи В.И. // Биотехнология. 1996. № 4. С. 27–34.

## Mass Spectrometric Evaluation of the Incorporation of $^2\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ into Amino Acids of Bacteria

O. V. Mosin\*, D. A. Skladnev\*\*, T. A. Egorova\*, and V. I. Shvets\*

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

\*\*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

**Abstract**—A highly sensitive EIMS method was used to study the incorporation of stable isotopes  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  into amino acids secreted by the *L*-phenylalanine-producing strain of *Brevibacterium methylicum* and the *L*-leucine-producing strain of *Methylobacillus flagellatum*, as well as into the amino acid residues of the total biomass proteins upon growing the bacteria on media containing [ $^2\text{H}$ ]methanol, [ $^{13}\text{C}$ ]methanol, and  $^2\text{H}_2\text{O}$  as sources of the stable isotopes. *L*-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}$ ]phenylalanine, *L*-[3,5- $^2\text{H}$ ]tyrosine, and *L*-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}$ ]tryptophan were incorporated into bacteriorhodopsin synthesized by *Halobacterium halobium* ET 1001. For the mass spectrometric analysis, multicomponent mixtures of amino acids in the culture media and protein hydrolysates (hydrolysis with 6 M  $^2\text{HCl}$  containing 3% of phenol and with 2 M barium hydroxide) were used. Barium hydroxide was converted into mixtures of *N*-benzyloxycarbonyl derivatives of amino acids and methyl esters of *N*-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl derivatives of amino acids, which were preparatively separated by means of reversed phase HPLC. The obtained [ $^2\text{H}$ ]- and [ $^{13}\text{C}$ ]amino acids represented mixtures, which differed in the number of isotopes incorporated into their molecules. The incorporation of  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  into the secreted amino acids and the amino acid residues of the total biomass proteins depends on the content of labeled substrates in the growth media and are different for different amino acids (from 10% for *L*-leucine/isoleucine to 97.5% for *L*-alanine).

**Key words:** stable isotopes, methylotrophic bacteria, halophilic bacteria, growth on  $^2\text{H}_2\text{O}$ , isotopically labeled amino acids, bacteriorhodopsin.