

УДК 579.871.08+577.112.385.4.08

© О. В. Мосин, И. Игнатов, В. И. Швец, Г. Тыминский

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ЭЛЕКТРОННОГО УДАРА В АНАЛИЗЕ ВКЛЮЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ ДЕЙТЕРИЯ И УГЛЕРОДА-13 В МОЛЕКУЛЫ АМИНОКИСЛОТ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В работе продемонстрирована возможность использования масс-спектрометрии электронного удара (ЭУ) на приборе MB-80 A ("Hitachi", Япония) с двойным электронным фокусированием для анализа смесей [^2H , ^{13}C]аминокислот *L*-фенилаланин-продуцирующего штамма *Brevibacterium methylicum* и *L*-лейцин-продуцирующего штамма *Methylobacillus flagellatum*, а также [^2H , ^{13}C]аминокислот суммарных белков биомассы, выделенных при выращивании клеток бактерий на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов [^2H]метанол, [^{13}C]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$. Для масс-спектрометрического анализа уровней включения стабильных изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы [^2H , ^{13}C]аминокислот их многокомпонентные смеси 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: [^2H , ^{13}C]аминокислоты и метиловые эфиры *N*-5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонил-производных [^2H , ^{13}C]аминокислот, — которые разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке с октадецилсилановым силикагелем Separon SGX C18. Уровни включения ^2H и ^{13}C в молекулы секретируемых аминокислот и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы варьируются в зависимости от метаболических путей биосинтеза [^2H , ^{13}C]аминокислот и содержания ^2H - и ^{13}C -меченых субстратов в ростовых средах и различаются для разных аминокислот (от 20.0 атом. % для *L*-лейцина / изолейцина и до 97.5 атом. % для *L*-аланина).

Кл. сл.: стабильные изотопы, метилотрофные бактерии, изотопно-меченые аминокислоты, ОФ ВЭЖХ, масс-спектрометрия ЭУ

ВВЕДЕНИЕ

Метод изотопного мечения является важным инструментальным этапом в разнообразных биохимических и метаболических исследованиях с использованием аминокислот и других биологически активных соединений (БАС), меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O [1]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекулах БАС методами высокого разрешения, включая ЯМР [2], ИК-спектроскопию [3] и масс-спектрометрию [4]. Развитие инструментальных методов детектирования и анализа стабильных изотопов за последние годы позволило повысить эффективность биохимических исследований, а также изучать структуру и механизм действия клеточных БАС на молекулярном уровне. В частности, ^2H - и ^{13}C -меченые аминокислоты применяются для изучения пространственной структуры и конформационных изменений белков, взаимодействия белковых молекул, а также в химических синтезах изотопно-

меченых соединений на их основе [5, 6].

Определяющим фактором в исследовании с применением [^2H , ^{13}C]аминокислот, является их доступность. [^2H , ^{13}C]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 , ^{13}C]аминокислот связаны с использованием комбинации химических и ферментативных подходов [8].

Микробиология предлагает альтернативный химическому синтезу метод получения [^2H , ^{13}C]аминокислот, 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 микробиологическом получении [^2H , ^{13}C]аминокислот используют несколько подходов, один из которых заключается в равномерном обогащении синтези-

руемых соединений стабильными изотопами по всему углеродному скелету молекулы за счет 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 последующее выделение целевых ^2H - и ^{13}C -меченых соединений. Другой подход заключается в селективном обогащении аминокислот стабильными изотопами по определенным положениям молекул за счет 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, связанных с применением масс-спектрометрии электронного удара (ЭУ) в анализе уровней включения стабильных изотопов ^2H и ^{13}C в сложные многокомпонентные смеси [^2H , ^{13}C]аминокислот, полученные микробиологически за счет утилизации клетками микроорганизмов низкомолекулярных меченых субстратов — [^2H]метанола, [^{13}C]метанола и $^2\text{H}_2\text{O}$. Чувствительность масс-спектрометрии ЭУ составляет 10^{-9} – 10^{-11} моль, что существенно выше, чем при использовании ИК- и ЯМР-спектроскопии. Данный метод в сочетании с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ) показал большие перспективы в исследовании уровней изотопного обогащения молекул [^2H , ^{13}C]аминокислот в составе их многокомпонентных смесей, каковыми являются образцы культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот и гидролизаты суммарных белков биомасс, полученные с минимальных ростовых сред, содержащих изотопно-меченые субстраты.

ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для синтеза производных [^2H , ^{13}C]аминокислот использовали N-5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлорид (Dns-хлорид) ("Sigma Aldrich", США), бензилоксикарбонилхлорид ("Sigma Aldrich", США) и диазометан, получаемый из N-нитрозометилмочевины ("Sigma Aldrich", США). Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.9 атом. % ^2H), ^2HCl (95.6 атом. % ^2H), [^2H]метанол (98.5 атом. % ^2H) и [^{13}C]метанол (99.5 атом. % ^{13}C), полученные из Российского научно-технического центра "Изотоп" (Санкт-Петербург, Россия). Неорганические соли предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250

("Bruker Daltonics", ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si), химические сдвиги протонов (δ , ppm) измерены в миллионных долях по отношению к Me_4Si .

Разделение смеси метиловых эфиров N-Dns-[^2H , ^{13}C]аминокислот из культуральной жидкости и белковых гидролизатов проводили методом ОФ ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer Smartline ("Knauer", Германия), снабженном УФ-детектором UF-2563 и интегратором C-R 3A ("Shimadzu", Япония) при $t = 20$ –(± 25) °C, используя колонку размерами 250×10 мм с неподвижной обращенной фазой Separon SGX C18, 7 мкм ("Kova", Словакия). Подвижная фаза: (А) — ацетонитрил—трифторуксусная кислота = 100 : (0.1–0.5) об. % и (Б) — ацетонитрил = 100 об. % в условиях градиентного элюирования. Объем пробы — 50–100 мкл; скорость элюирования — 1.5 мл/мин. Выход индивидуальных метиловых эфиров N-Dns-[^2H , ^{13}C]аминокислот — 75–89 %; хроматографическая чистота — 95–98 %.

Ионообменную хроматографию белковых гидролизатов [^2H , ^{13}C]аминокислот осуществляли на приборе Biotronic LC 5001 ("Eppendorf-Nethleler-Hinz", Германия) с использованием колонки Biotronic resin BIC 2710; $t = 20$ –(± 25) °C; размеры колонки — 3.2×230 мм. Неподвижная фаза — сульфированная стирольная смола UR-30 ("Beckman Spenco", США); подвижная фаза — 0.2 М Na-цитратный буфер. Рабочее давление — 50–60 атм; скорость подачи Na-цитратного буфера — 18.5, нингидрина — 9.25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Масс-спектры ЭУ производных [^2H , ^{13}C]аминокислот регистрировали на приборе MB-80 A ("Hitachi", Япония) с двойным электронным фокусированием при ионизирующем напряжении 70 эВ, ускоряющем напряжении 8 кВ и температуре катодного источника 180–200 °C. Сканирование анализируемых образцов проводили при разрешении 7500 усл. ед., используя 10 %-ю резкость изображения.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы-продуценты [^2H , ^{13}C]аминокислот

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 ме-

тилотрофных бактерий, продуцент *L*-фенилаланина;

2) *Methylobacillus flagellatum* КТ — *L*-изолейцин-зависимый штамм облигатных метилотрофных бактерий, продуцент *L*-лейцина;

Условия выращивания бактерий и выделения ^2H , ^{13}C -меченых белков и аминокислот

Выращивание метилотрофных бактерий *B. methylicum* и *M. flagellatum* осуществляли в минеральной среде М9 в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с наполнением средой 50 мл по методике [12], 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) (10 000 g, 20 мин). В культуральной жидкости анализировали секретируемые аминокислоты. Для выделения фракции суммарных белков биомассы клетки дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием (10 000 g, 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. Липиды и пигменты экстрагировали смесью хлороформ—метанол—ацетон (2 : 1 : 1) по методу Блайя и Дайера [13]. Гидролиз белка проводили с помощью 6 М ^2HCl (3 % фенол в $^2\text{H}_2\text{O}$) или 2 М $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (110 °С, 24 ч).

Синтез N-Dns- ^2H , ^{13}C аминокислот

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 $t = 40$ °С, 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

К 20 мл 40 % КОН в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3.0 г влажной нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течение 15–20 мин. После окончания интенсивного

газовыделения из реакционной смеси диазометана 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.

Синтез N-Cbz- ^2H , ^{13}C аминокислот

Для синтеза N-Cbz- ^2H , ^{13}C аминокислот к 1.5 мл охлажденного до 0 °С 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 °С, 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение ^2H , ^{13}C аминокислот из культуральных жидкостей и белковых гидролизатов

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-кетоглюконоат-альдозазный 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 [14, 15]. Включение дейтерия в молекулы секретируемых аминокислот и суммарных белков биомассы осуществляли за счет выращивания штамма *B. methylicum* на минеральных средах М9 с $^2\text{H}_2\text{O}$ и обычным метанолом, т. к. уровень включения ^2H в молекулы аминокислот за счет ассимиляции ^2H метанола незначителен.

Поскольку в клетке происходит ассимиляция водорода (дейтерия) из $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ сред, 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 микроорганизмов

Табл. 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 опытов 6–7 приведены для *M. flagellatum* при выращивании на водной среде М9, содержащей 1 % метанол (6) или 1 % [¹³C]метанол.

на ²H₂O-содержащих средах характеризуется увеличением продолжительности лаг-фазы, времени клеточной генерации и снижением выходов микробной биомассы (табл. 1), поэтому было необходимо проводить клеточную адаптацию к ²H₂O.

Метод адаптации штамма факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* к росту на ²H₂O при сохранении способности к биосинтезу *L*-фенилаланина описан в работе [16]. В данной работе были исследованы образцы культуральной жидкости *B. methylicum* и гидролизаты биомассы, полученные в ходе многоступенчатой адаптации бактерий к тяжелой воде на минимальных минеральных средах М9 с различным содержанием ²H₂O (от 24.5 до 98.0 % ²H₂O). Поскольку данный штамм метилотрофных бактерий удалось адаптировать к росту на ²H₂O, исследование уровней включения дейтерия в молекулы аминокислот представлялось наиболее интересным.

В отличие от выращивания на ²H₂O-среде, где необходимо проводить клеточную адаптацию к дейтерию, при получении [¹³C]аминокислот за счет ассимиляции ¹³CH₃OH данный этап не является обязательным, поскольку этот изотопный субстрат не оказывает негативного биостатического эффекта на ростовые характеристики метилотрофов (см. табл. 1). Поэтому в случае со штаммом облигатных метилотрофных бактерий *M. flagellatum* включение изотопа ¹³C в молекулы аминокислот осуществляли в одну стадию за счет выращивания бактерий на водных средах М9, содержащих 1 % [¹³C]метанол в качестве источника изотопа углерода-13.

Основные этапы при выделении [²H, ¹³C]-аминокислот заключались

– в выращивании соответствующих штаммов-

продуцентов на средах с мечеными субстратами — [²H]метанолом, [¹³C]метанолом и ²H₂O;

– отделении культуральных жидкостей (КЖ), содержащих секретируемые аминокислоты от микробной биомассы;

– очистке от липидов;

– разрушении клеток;

– выделении фракции суммарных белков биомассы с последующим их гидролизом, обработкой смесей аминокислот дансилхлоридом, бензилоксикарбонилхлоридом и диазометаном;

– разделении метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот и N-Cbz-производных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ;

– масс-спектрометрии ЭУ 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 клеточных компонентов прибегали к высаливанию их сульфатом аммония.

Гидролиз ²H-меченых белков проводили в условиях предотвращения реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ходе гидролиза и сохра-

нения остатков ароматических [^2H]аминокислот в белке. Рассмотрены два альтернативных варианта проведения гидролиза — кислотный и щелочной. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 М HCl , 24 ч, 110 °C) приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот [17]. Другим существенным недостатком при проведении гидролиза в HCl является изотопный (^1H — ^2H) обмен ароматических протонов (дейтериевых) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтериевых) при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот [18]. 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 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (110 °C, 24 ч). В этих условиях гидролиза белка реакций изотопного обмена водорода на дейтерий в ароматических [^2H]аминокислотах — тирозине и триптофане — 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. Для препаративного получения ^2H -меченых аминокислот из белка микроорганизмов целесообразнее использовать гидролиз с использованием ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ (в присутствии добавки фенола для сохранения ароматических аминокислот), позволяющего избежать рацемизации.

Для получения летучих производных [^2H , ^{13}C]аминокислоты переводили в метиловые

эфиры N-Dns-[^2H , ^{13}C]аминокислот или в N-Cbz-[^2H , ^{13}C]аминокислоты, которые затем разделяли методами ОФ ВЭЖХ. Условия N-derivatизации [^2H , ^{13}C]аминокислот обрабатывали таким образом, чтобы получить в масс-спектрах ЭУ как можно более интенсивные пики их молекулярных ионов (M^+) на уровне фона метаболитов среды. Для этого проводили реакцию N-аминирования [^2H , ^{13}C]аминокислот (в составе лиофилизированных культуральных жидкостей и гидролизатов суммарных белков биомассы) пятикратным избытком дансилхлорида (в ацетоне) или бензилоксикарбонилхлорида.

В условиях реакции N-аминирования для лизина, гистидина, тирозина, серина, треонина и цистеина наряду с монопроизводными образовывались N-ди-Dns- и N-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- и N-Dns-производных аминокислот в ОФ ВЭЖХ и в масс-спектрометрических исследованиях была показана нами ранее [19]. 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 (дейтериевых) при этерификации ^2H -меченых аминокислот в данной работе отдали предпочтение использованию диазометана. Свежеприготовленным раствором диазометана в диэтиловом

Табл. 2. Результаты одноступенчатого градиентного разделения смеси метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из белкового гидролизата методом ОФ ВЭЖХ на колонке 250×10 мм, $t = 20-(\pm 25)$ °C, с октадецилсилановым селикагелем Separon SGX C18, 7 мкм ("Kova", Словакия)

Номер обработки	Компоненты подвижной фазы, об. %		Время элюирования, мин
	А*	Б**	
1	90	10	10
2	80	20	10
3	60	40	10
5	50	50	10
6	30	60	5
8	20	80	5
9	10	90	5
10	0	100	5

* А: ацетонитрил—трифторуксусная кислота 100 : (0.1–0.5) об. %;

** Б: ацетонитрил 100 об. %.

эфире обрабатывали сухие остатки смесей аминокислот. При этерификации аминокислот диазотаном 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 больших исходных.

Исследование уровней включения изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы секретируемых аминокислот и белковых гидролизатов

Уровни включения изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот мультикомпонентных смесей в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов определяли аналитически методом масс-спектрометрии ЭУ. Метиловые эфиры N-Dns- ^{13}C производных аминокислот или N-Cbz- ^{13}C производных аминокислот разделяли методом ОФ ВЭЖХ на колонке с октадецилсилановым селикагелем Separon SGX C18, 7 мкм. Наилучшее разделение достигалось при градиентном элюировании метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C производных аминокислот смесью растворителей (А): ацетонитрил—трифторуксусная кислота = 100 : (0.1–0.5) об. % и (Б): ацетонитрил = 100 об. % в условиях градиентного элюирования за счет постепенного увеличения концентрации компонента Б в смеси от 0 до 100 % (см. табл. 2). В этом случае каждый из компонентов смеси разделяется при наиболее оптимальном составе элюента, отчего достигается их полное и качественное разделение за гораздо меньшее время, чем при изократическом режиме. Кроме того, при использовании градиента существенно увеличивается максимальное количество пиков, способных разместиться на хроматограмме, — пиковая емкость, что весьма немаловажно при разделении сложных многокомпонентных смесей, каковыми являются белковые гидролизаты. Таким способом удалось разделить триптофан и трудно разрешимую пару фенилаланин / тирозин. Степени хроматографической чистоты [^2H , ^{13}C]аминокислот, выделенных из культуральных жидкостей *B. Methylicum*, и *M. Flagellatum*, и гидролизатов белков в виде N-Cbz- ^{13}C производных их аминокислот, составили 96–98 % при выходах 67–89 %. Для отдельных [^2H , ^{13}C]аминокислот оказалось более удобным разделение в виде метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C производных аминокислот. При этом степень хроматографической чистоты полученных из гидролизатов суммарных белков биомассы метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C фенилаланина, N-Dns- ^{13}C тирозина и N-Dns- ^{13}C триптофана со-

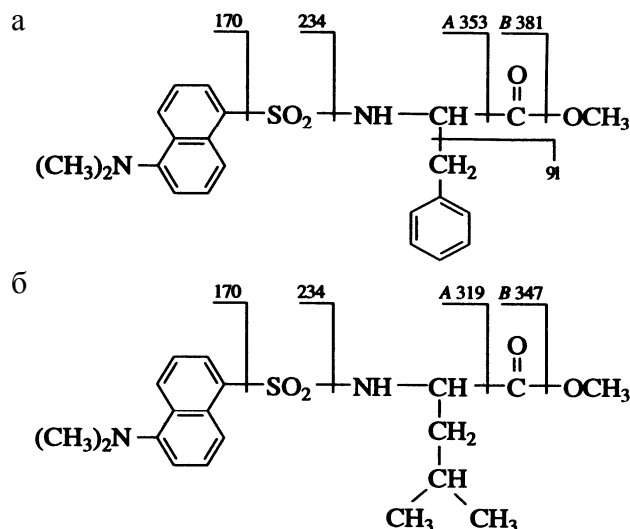


Рис. 1. Фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина с $M_r = 412$ (а) и N-Dns-лейцина с $M_r = 378$ (б) при масс-спектрометрии электронного удара

ставили 96, 97 и 98 % соответственно. Данный результат важен потому, что именно метиловые эфиры N-Dns-аминокислот вследствие своей химической стабильности, наличия высокоинтенсивных молекулярных ионов (M^+) при высоких молекулярных массах оказались весьма удобными для масс-спектрометрических исследований и позволяют идентифицировать [^2H , ^{13}C]аминокислоты в присутствии низкомолекулярных метаболитов среды и других продуктов аминирования и карбоксиметилирования аминокислот. Последний факт очень важен для изучения состава пула [^2H , ^{13}C]аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости (КЖ) штаммов-продуцентов.

Пути фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина при масс-спектрометрии ЭУ приводят к формированию пиков их молекулярных ионов (M^+) при $m/z = 412$ и $m/z = 378$ и к образованию дансильных фрагментов и продуктов их дальнейшего распада до N-диметиламинонафталина, а также к образованию аминных A^+ и аминацильных фрагментов B^+ (рис. 1). Показанная на рис. 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 , ^{13}C]аминокислот в составе 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.

При использовании в качестве источников стабильных изотопов ^{13}C метанола и $^2\text{H}_2\text{O}$ в клетке синтезируются изотопно-замещенные ^{13}C , ^2H аминокислоты, различающиеся количеством атомов, замещенных на ^{13}C и ^2H . При этом чем выше молекулярная масса аминокислот, тем возможен больший набор молекулярных ионов (M^+), соответствующих изотопно-замещенным формам. Пики при $m/z = 323.2$, 337.4 , 368.5 , 382.3 , 420.5 в масс-спектре ^{13}C аминокислот обработанной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной средой и с 1 % ^{13}C метанолом (рис. 2, б), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns- ^{13}C глицина, N-Dns- ^{13}C аланина, N-Dns- ^{13}C валина, N-Dns- ^{13}C лейцина / ^{13}C изолейцина и N-Dns- ^{13}C фенилаланина. Следует подчеркнуть,

что величина m/z для молекулярного иона (M^+) метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C лейцина и ^{13}C изолейцина в масс-спектрах электронного удара одинакова, поэтому данным методом нельзя точно идентифицировать эти аминокислоты. Максимальные уровни включения ^{13}C в молекулы аминокислот, измеренные по увеличению усредненного значения соотношения массы к заряду m/z для молекулярного иона (M^+) изотопно-меченого образца в сравнении с молекулярной массой природной аминокислоты варьируют от 35 % для ^{13}C аланина до 95 % для ^{13}C фенилаланина (рис. 2). Учитывая ауксотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснен вкладом экзогенного изолейцина в уровень изотопного включения ^{13}C лейцина, а также других метаболически связанных с ним аминокислот — ^{13}C аланина и ^{13}C валина.

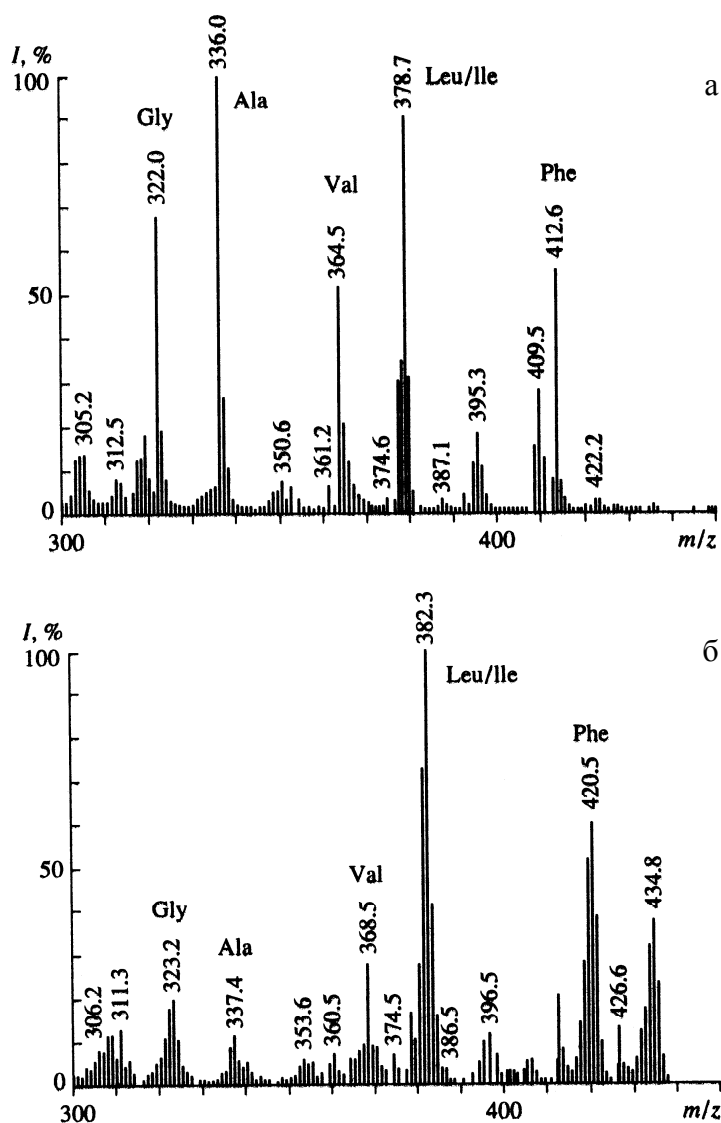


Рис. 2. Масс-спектры ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^{13}C аминокислот из культуральной жидкости *M. flagellatum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном. а — 1 % метанол и H_2O (контроль); б — 1 % ^{13}C метанол и H_2O . Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов $[\text{M}]^+$ метиловых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

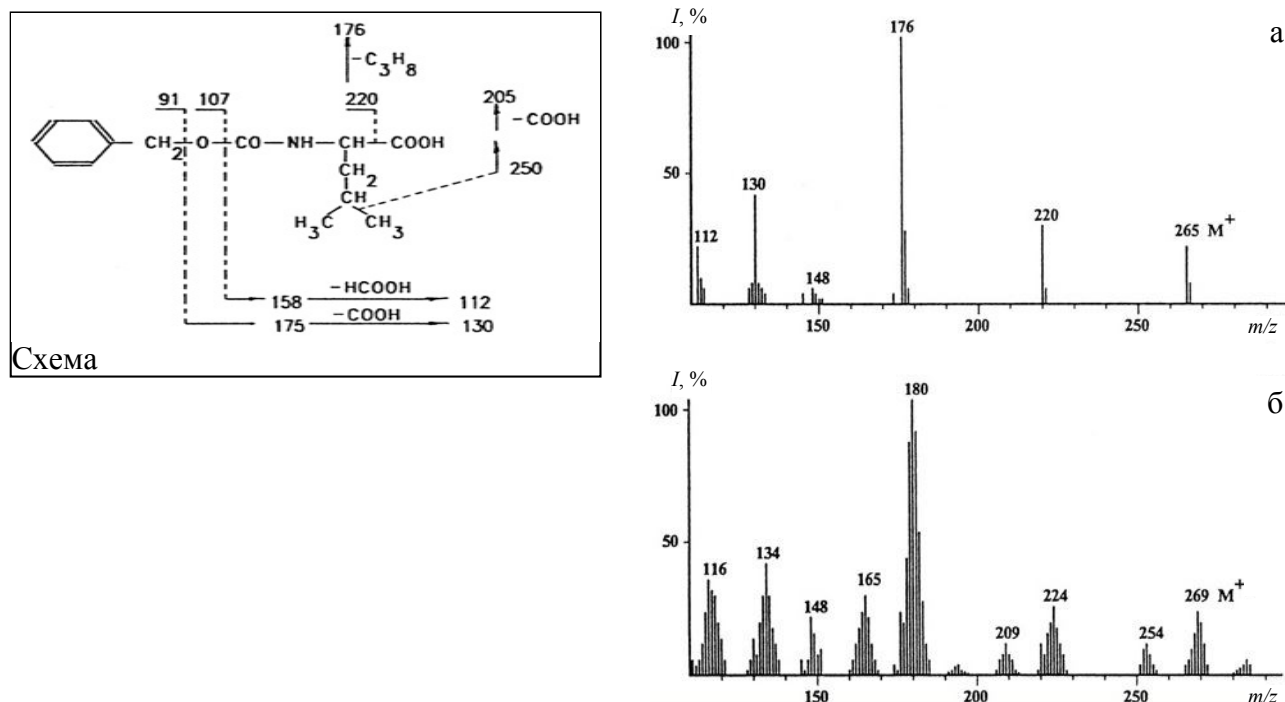


Рис. 3. Масс-спектры ЭУ N-Cbz-[^{13}C]-Leu, выделенного из культуральной жидкости *M. flagellatum* после обработки бензилоксикарбонилхлоридом.

а — 1 % метанол и H_2O (контроль); б — 1 % [^{13}C]метанол и H_2O .

Схема — углеродный скелет молекулы

Данные масс-спектрометрии ЭУ по уровням включения ^{13}C и ^2H в молекулы N-Cbz-[^2H , ^{13}C]производных аминокислот в пределах различных концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$ не отличались от таковых для метиловых эфиров N-Dns-[^2H , ^{13}C]производных аминокислот (точность определения уровней изотопного включения в молекулы аминокислот данным методом составляет $\pm 5\%$). В качестве примера на рис 3, б, изображен масс-спектр N-Cbz-[^{13}C]-Leu (относительно немеченого N-Cbz-Leu, (рис. 3, а), выделенного методом ОФ ВЭЖХ из КЖ *M. flagellatum* после обработки бензилоксикарбонилхлоридом. Пик молекулярного иона N-Cbz-[^{13}C]-Leu соответствует среднему значению (M^+) при $m/z = 269$ (относительно (M^+) при $m/z = 265$ в контрольных условиях), что свидетельствует о включении 4 атомов изотопа ^{13}C в молекулу лейцина (рис. 3, схема). Специфическая фрагментация N-бензилоксикарбонильного производного [^{13}C]лейцина при электронном ударе позволяет локализовать сайты включения атомов изотопа ^{13}C по углеродному скелету молекулы. Как видно из рис. 3, таковыми являются 4 атома углерода в положениях [2, 3, 4, 5] углеродного скелета молекулы лейцина.

Для штамма факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* наблюдалось специфиче-

ское возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулы индивидуальных [^2H]аминокислот культуральных жидкостей (табл. 3) при ступенчатом увеличении концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$ 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. 3). Такой результат зафиксирован во всех экспериментах, где источником стабильных изотопов является $^2\text{H}_2\text{O}$.

Из масс-спектра ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]производных аминокислот культуральной жидкости *B. methylicum*, полученной со среды, содержащей 49 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 4, б), видно, что молекула фенилаланина содержит 6 изотопно-замещенных форм со средним значением пика молекулярного иона (M^+) при $m/z = 414.2$, которое возрастает по сравнению с контрольными условиями ($m/z = 412.0$, рис. 4, а) на 2.2 единицы, т. е. 27.5 атом. % от общего количества атомов водорода в молекуле замещены на дейтерий. Область масс-спектра со значениями $m/z = 90\text{--}300$

Табл. 3. Уровни включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот (атом. %), 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% $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ **	
	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.

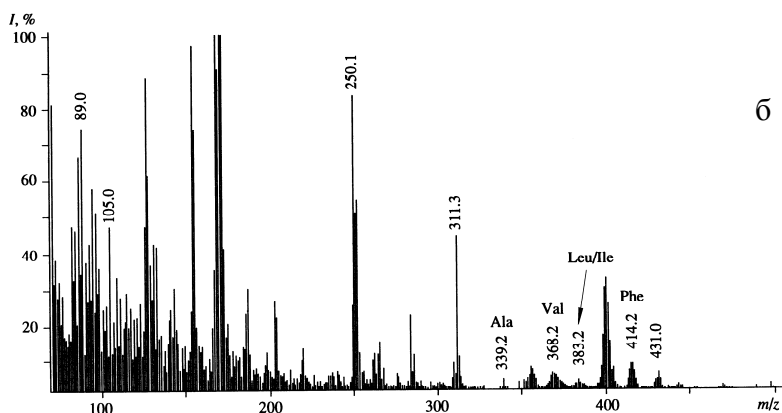
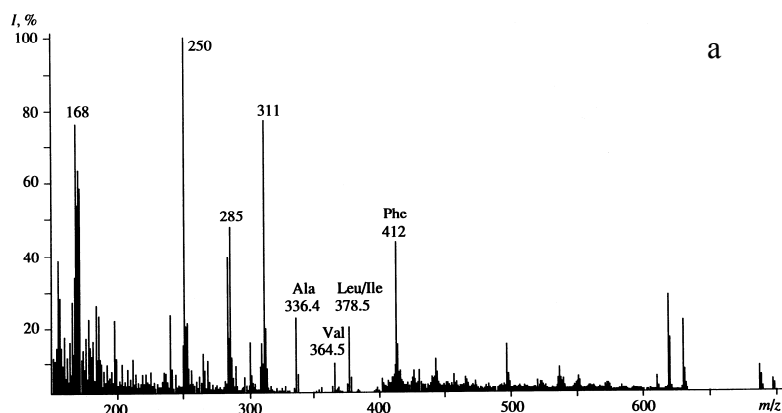


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном. а — 2 % метанол и 98.0 % H_2O (контроль); б — 2 % [^2H]метанол и 49.0 % $^2\text{H}_2\text{O}$

соответствует продуктам дериватизации метаболитов ростовой среды. Пик с $m/z = 431.0$, зафиксированный в масс-спектре ЭУ культуральной жидкости и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования фенилаланина по α -NH-(Dns)-группе. Пик с $m/z = 400$ (рис. 4, б) отвечает продукту отщепления метильной группы от дейтерированного производного $[^2\text{H}]$ фенилаланина.

Присутствие в масс-спектре ЭУ (рис. 5) образца культуральной жидкости *B. methylicum*, полученной на среде с 73.5 % $^2\text{H}_2\text{O}$, пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина (M^+) при $m/z = 416.1$ указывает на увеличение молекулярной массы $[^2\text{H}]$ фенилаланина на 4.1 единицы, т. е. 51.2 % атомов водорода в молекуле $[^2\text{H}]$ фенилаланина замещены на дейтерий. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу $[^2\text{H}]$ фенилаланина за счет

процесса биосинтеза *de novo*, т. е. по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым относятся протоны (дейтероны) при гетероатомах в NH_2 - и COOH -группах аминокислот, которые замещаются за счет легкости диссоциации в H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$).

Из табл. 3 видно, что в условиях ауксотрофности по *L*-лейцину уровни включения ^2H в молекулы $[^2\text{H}]$ лейцина / $[^2\text{H}]$ 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. 6, где показан масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот культуральной жидкости после выращивания бактерий *B. methylicum* в указанных условиях. Видно, что величина пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина (M^+) при $m/z = 418.0$ увеличивается по сравнению с контрольными условиями на 6 единиц, что соответствует

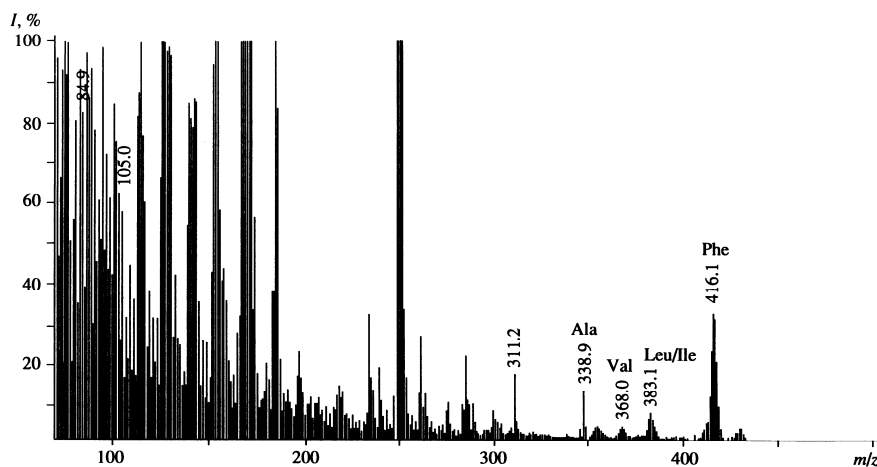


Рис. 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % $[^2\text{H}]$ метанол и 73.5 % $^2\text{H}_2\text{O}$

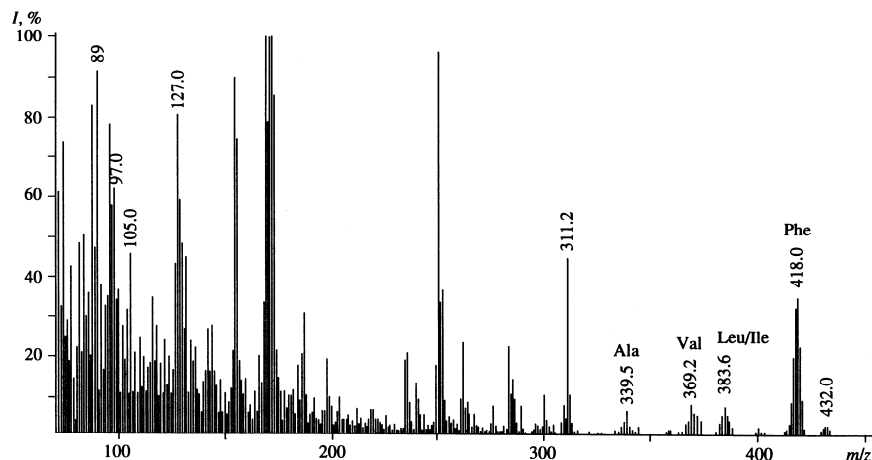


Рис. 6. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % $[^2\text{H}]$ метанол и 98.0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (максимально дейтерированная среда)

замещению 75.0 атом. % от общего количества атомов водорода в молекуле. В отличие от $[^2\text{H}]$ фенилаланина уровень включения дейтерия в $[^2\text{H}]$ лейцин / $[^2\text{H}]$ изолейцин составил 50.0 атом. %, а в $[^2\text{H}]$ валин — 58.8 атом. %. Пик при $m/z = 432$, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот КЖ на рис. 6 соответствует продукту дополнительного метилирования $[^2\text{H}]$ фенилаланина по α -NH₂-группе. Кроме этого, в масс-спектре фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного C₆H₅CH₂-фрагмента молекулы $[^2\text{H}]$ фенилаланина при $m/z = 97$ (вместо $m/z = 91$ в контроле), что указывает на то, что местами локализации 6 атомов дейтерия в молекуле $[^2\text{H}]$ фенилаланина являются положения C1–C6 ароматических протонов в бензильном C₆H₅CH₂-фрагменте. Из масс-спектрометрических данных следует, что при других концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$

дейтерий также включается в ароматическое кольцо $[^2\text{H}]$ фенилаланина, т. к. метаболизм адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений в $^2\text{H}_2\text{O}$.

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 % $[^{13}\text{C}]$ метанолом. Как видно из табл. 3, в отличие от наблюдаемого для $[^{13}\text{C}]$ фенилаланина (уровень изотопного включения 95.0 %) уровни включения изотопа ^{13}C в молекулы $[^{13}\text{C}]$ лейцина / изолейцина, $[^{13}\text{C}]$ аланина и $[^{13}\text{C}]$ валина составили 38.0, 35.0, 50.0 % соответственно. Уровень изотопного включения для $[^{13}\text{C}]$ глицина (60 %), хотя и выше, чем для трех последних аминокислот, но намного ниже, чем для $[^{13}\text{C}]$ фенилаланина.

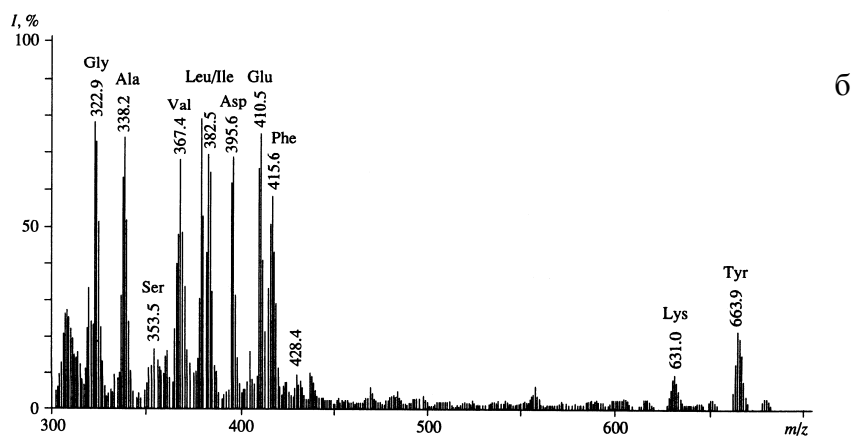
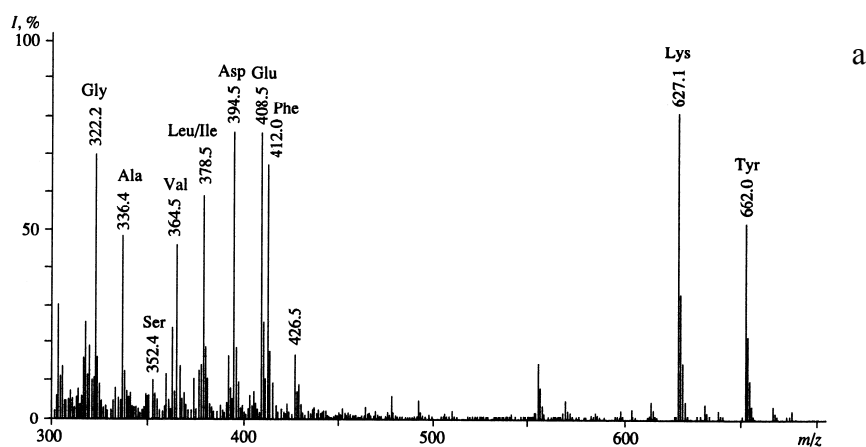


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот из гидролизатов суммарных белков биомассы *B. methylicum* при выращивании в среде M9, содержащей 2 % метанол и H₂O (контроль) (а) и 2 % $[^2\text{H}]$ метанол и 98.0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (б)

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), может быть ассимиляция клеткой немеченого лейцина из среды на фоне биосинтеза изотопно-меченого изолейцина *de novo*. Учитывая вышесказанное, следует подчеркнуть, что использование ауксотрофных форм микроорганизмов для получения изотопно-меченых аминокислот не оправдывает себя практически из-за множественного включения изотопов в молекулы [20]. 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 масс-спектрометрического анализа сложных многокомпонентных смесей, полученных после гидролиза суммарных белков биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum*. Как видно из рис. 7, до десяти аминокислот могут быть идентифицированы в масс-спектре ЭУ гидролизата белка *B. methylicum* по пикам молекулярных ионов (M^+) метиловых эфиров их N-Dns- ^{15}N -производных аминокислот.

Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, пики молекулярных ионов (M^+) соответствовали смесям изотопно-замещенных форм производных аминокислот. Для лизина и тирозина пики (M^+) соответствовали метиловым эфирам дипроизводных аминокислот — α , ϵ -ди-Dns-лизину (M^+ при $m/z = 631.0$) и O,N-ди-Dns-тироzinу (M^+ при $m/z = 663.9$). Уровни изотопного включения дейтерия в молекулы ^{15}N -аминокислот гидролизата суммарных белков биомассы при содержании $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде 49.0 % варьируют от 25.6 % для ^{15}N -тирозина до 45.0 % для ^{15}N -аланина (рис. 8, б, и табл. 3). В молекулах ^{15}N -глицина,

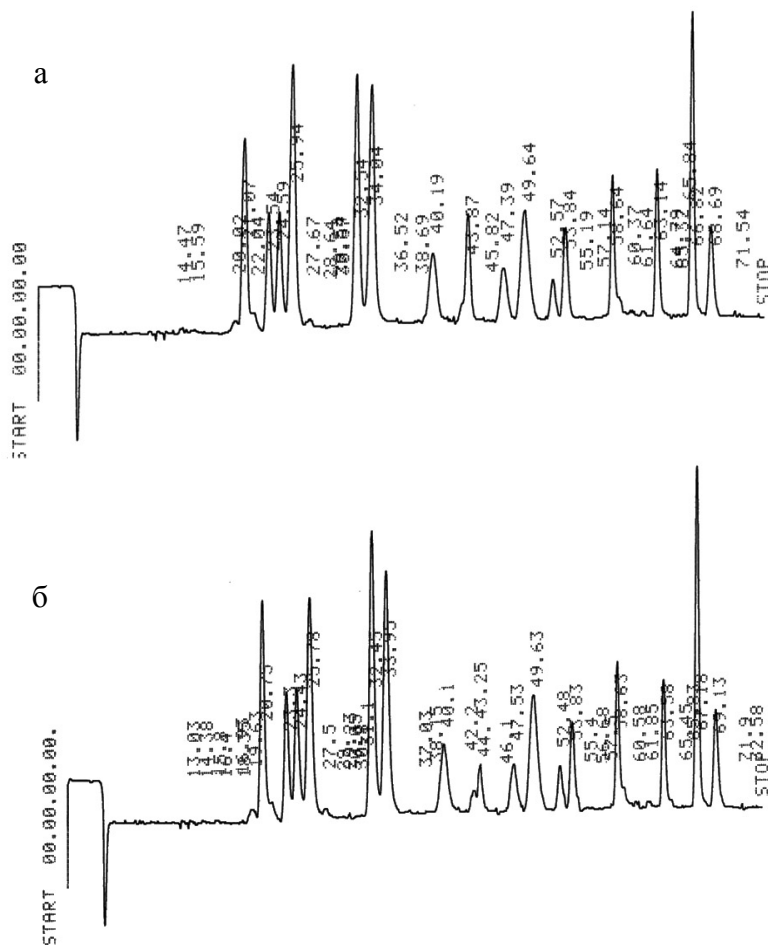


Рис. 8. Ионообменная хроматография аминокислот из гидролизатов протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток *B. methylicum* на максимально дейтерированной среде.

Прибор Biotronic LC-5001 (230×3.2 мм) ("Eppendorf-Nethleler-Hinz", Germany). Подвижная фаза: сульфонирующая стирольная смола UR-30 ("Beckman-Spinco", USA). Диаметр гранул — 25 мкм; рабочее давление 50–60 атм; подвижная фаза — 0.2 M Na-цитратный буфер (pH = 2.5); скорость подачи элюента — 18.5, нингидрина — 9.25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ и $\lambda = 440$ нм (для пролина)

[^2H]валина, [^2H]фенилаланина, [^2H]серина, [^2H]лизина, [^2H]аспарагиновой и [^2H]глутаминовой кислот они находятся в пределах 35–46 %. Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, при повышении концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде наблюдалось пропорциональное повышение уровней включения ^2H в молекулы аминокислот. Что касается других [^2H]аминокислот, не детектируемых данным методом, очевидно, что уровни изотопного включения в них приблизительно такие же. Это подтверждается данными по разделению белковых гидролизатов метилотрофных бактерий методом ОФ ВЭЖХ в виде N-Cbz-[^2H]производных аминокислот и метиловых эфиров N-Dns-[^2H]производных аминокислот и ионообменной хроматографией исходных белковых гидролизатов, где детектируется уже 15 аминокислот (рис. 8, табл. 4).

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. 4). Как видно из табл. 4, при выращивании *B. 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

Табл. 4. Аминокислотный состав белкового гидролизата суммарных белков биомассы *B. methylicum*, ** полученный при росте в максимально дейтерированной среде, * и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы		Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода ***
	протонированный образец (контроль)	образец, полученный в 98.0% $^2\text{H}_2\text{O}$		
Глицин	8.03	9.69	2	90.0
Аланин	12.95	13.98	4	97.5
Валин	3.54	3.74	4	50.0
Лейцин	8.62	7.33	5	50.0
Изолейцин	4.14	3.64	5	50.0
Фенилаланин	3.88	3.94	8	95.0
Тирозин	1.56	1.83	7	92.8
Серин	4.18	4.90	3	86.6
Треонин	4.81	5.51	—	—
Метионин	4.94	2.25	—	—
Аспарагин	7.88	9.59	2	66.6
Глутаминовая кислота	11.68	10.38	4	70.0
Лизин	4.34	3.98	5	58.9
Аргинин	4.63	5.28	—	—
Гистидин	3.43	3.73	—	—

* Данные получены на среде М9 с 98.0 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом.

** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH - и NH_2 -группах молекул аминокислот не учитывались из-за легкости их диссоциации и изотопного обмена в H_2O / $^2\text{H}_2\text{O}$.

*** Прочерк означает отсутствие данных.

по включению изотопа ^{13}C в суммарные белки биомассы за счет 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. 3). Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, сниженные уровни включения стабильных изотопов в ^{13}C лейцине / изолейцине (49.0 %), а также в метаболически связанных с ним ^{13}C аминокислотах в этих условиях могут быть объяснены эффектом ауксотрофности штамма по *L*-изолейцину, который добавляли в ростовую среду в протонированном виде.

Во всех экспериментах по включению стабильных изотопов в молекулы аминокислот уровни включения ^2H и ^{13}C в метаболически связанные аминокислоты обнаружили корреляцию. Так, уровни изотопного включения для аланина, валина и лейцина (семейство пировата), фенилаланина и тирозина (семейство ароматических аминокислот, синтезируемых из шикимовой кислоты) коррелируют. 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 лизина (семейство аспарагина) также имеют близкие величины и находятся в корреляции. Уровни изотопного включения секретируемых аминокислот и соответствующих аминокислотных остатков суммарного белка при выращивании бактерий на средах с одинаковым изотопным составом, 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования продемонстрировали эффективность метода масс-спектрометрии ЭУ на примере *N*-Cbz- и *N*-Dns-производных ^{2}H , ^{13}C аминокислот с различными уровнями изотопного обогащения, полученных микробиологическим синтезом, для исследования уровней изотопного обогащения молекул ^{2}H , ^{13}C аминокислот в составе их многокомпонентных смесей, полученных микробиологически с использованием клеток микроорганизмов. Метод удобен для изучения состава пула аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов и гидролизатов белков биомассы, выращенной на средах со стабильными изотопами ^2H и ^{13}C ,

и может найти применение в метаболических и биомедицинских исследованиях.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария), грант № 115-RU.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. дис. ... канд. хим. наук. М.: МГАТХТ им. М.В. Ломоносова, 1996. 25 с.
2. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1990. Vol. 19, no. 2. P. 243–266. doi: [10.1146/annurev.bb.19.060190.001331](https://doi.org/10.1146/annurev.bb.19.060190.001331).
3. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment // *J. Chem. Educ.* 1986. Vol. 62, no. 7. P. 633–638. doi: [10.1021/ed062p633](https://doi.org/10.1021/ed062p633).
4. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Шве́ц 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. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Шве́ц В.И. Методы получения аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O // *Биотехнология*. 1996, № 10. С. 24–40.
6. Мосин О.В., Шве́ц В.И., Складнев Д.А., Игнатов И. Биосинтез фотопреобразующего трансмембранного белка ^{2}H бактериородопсина, меченного дейтерием по остаткам ароматических аминокислот $[2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5]\text{Phe}$, $[3,5\text{-}^2\text{H}_2]\text{Tyr}$ и $[2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5]\text{Trp}$ // *Научное приборостроение*. 2013. Т. 23, № 2. С. 14–26.
7. Matthews H.R., Kathleen S., Matthews K., Stanley J. Selective deuterated amino acid analogues. Synthesis, incorporation into proteins and NMR properties // *Biochim. et Biophys. Acta*. 1977. Vol. 497. P. 1–13. doi: [10.1016/0304-4165\(77\)90134-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(77)90134-9).
8. LeMaster D.M., Cronan J.E. Biosynthetic production of ^{13}C -labeled amino acids with site-specific enrichment // *Journal of Biological Chemistry*. 1982. Vol. 257, no. 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. Vol. 3, no. 2. P. 132–138.
10. Мосин О.В., Шве́ц 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 H₂-CO₂ plus [¹³C]acetate // *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. Vol. 59, no. 4. P. 1099–1103.
12. 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. Vol. 7, no. 3. P. 249–260.
 13. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. Vol. 37, no. 8. P. 911–918. doi: [10.1139/o59-099](https://doi.org/10.1139/o59-099).
 14. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А. и др. Метилотрофные бактерии — источники изотопно-меченых ²H- и ¹³C-аминокислот // *Биотехнология*. 1996. № 5. С. 25–34.
 15. Karnaukhova E.N., Mosin O.V., Reshetova O.S. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* // *Amino Acids*. 1993. Vol. 5, no. 1. P. 125.
 16. 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, no. 2. P. 225–229. doi: [10.1271/bbb.62.225](https://doi.org/10.1271/bbb.62.225).
 17. Cohen J.S., Putter I. The isolation of deuterated amino acids // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. Vol. 222. P. 515–520. doi: [10.1016/0304-4165\(70\)90143-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(70)90143-1).
 18. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins // *Analytical Biochemistry*. 1974. Vol. 60, no. 1. P. 45–50. doi: [10.1016/0003-2697\(74\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90129-8).
 19. 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.
 20. Мосин О.В., Игнатов И. Биологическое воздействие дейтерия на клетки прокариот и эукариот // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014. Т. 2, № 7. С. 122–131.
- Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Москва (Мосин О.В.)**
- Научно-исследовательский центр медицинской биофизики, София, Болгария (Игнатов И.)**
- Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва (Швец В.И.)**
- Европейское научное общество, Европейская академия естественных наук, Ганновер, Германия (Тыминский Г.)**
- Контакты: Мосин Олег Викторович,
mosin-oleg@yandex.ru
- Материал поступил в редакцию: 13.08.2015

ELECTRON IMPACT MASS SPECTROMETRY IN ANALYSIS OF INTRODUCTION OF STABLE ISOTOPES OF DEUTERIUM AND CARBON-13 INTO AMINO ACID MOLECULES FROM BIOLOGICAL OBJECTS

O. V. Mosin¹, I. Ignatov², V. I. Shvets³, G. Tyminski⁴

¹Moscow State University of Applied Biotechnology, Russia

²The Scientific Research Center of Medical Biophysics, Sofia, Bulgaria

³Moscow State University of Fine Chemical Technology named after M. V. Lomonosov, Russia

⁴European Scientific Society, European Academy of Natural Sciences, Hannover, Germany

The work demonstrates the possibility of using electron impact mass spectrometry (EI) on a MB-80A ("Hitachi", Japan) with a double electron focusing for analysis of [²H, ¹³C]amino acid mixtures of *L*-phenylalanine producing strain of *Brevibacterium methylicum* and *L*-leucine-producing strain of *Methylobacillus flagellatum*, and [²H, ¹³C]amino acids of the total biomass protein isolated while growing the bacterial cells on media containing as a source of stable isotopes [²H]methanol, [¹³C] methanol and ²H₂O. For mass-spectrometric analysis of the level of incorporation of stable isotopes ²H and ¹³C into the molecules of [²H, ¹³C]amino acids the multi-componential mixtures of [²H, ¹³C]amino acids, derived from cultural media and protein hydrolysates after hydrolysis in 6 M ²HCl (3 % phenol) and 2 M Ba(OH)₂ were modified into N-benzyloxycarbonyl-derivatives of [²H, ¹³C]amino acids as well as into the methyl esters of N-dansyl-derivatives of [²H, ¹³C]amino acids, which were separated by RP HPLC on a column with octadecylsilane gel Separon SGX C18. The levels of ²H and ¹³C enrichment of secreted amino acids and amino acid residues of protein were found to be varied depending on the metabolic pathways of biosynthesis and concentration of ²H- and ¹³C-labelled substrates in growth media from 20.0 atom % to *L*-leucine/isoleucine up to 97.5 atom % for *L*-alanine.

Keywords: stable isotopes, methylotrophic bacteria, isotope labeled amino acids, RP HPLC, EI mass spectrometry

REFERENCES

1. Mosin O.V. *Izucheniye metodov biotekhnologicheskogo polucheniya belkov, aminokislot i nukleozidov, mechen'nykh stabil'nymi izotopami ²H i ¹³C s vysokimi stepenyami izotopnogo obogascheniya*. Avtoref. dis. kand. chim. nauk. [Studying of methods of biotechnological preparation of proteins, amino acids and nucleosides, labeled with stable isotopes ²H and ¹³C with high levels of isotopic enrichment. Doct. Diss. Autoref.]. Moscow, M.V. Lomonosov MGATChT Publ., 1996. 25 p. (In Russ.).
2. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 1990, vol. 19, no. 2, pp. 243–266. doi: 10.1146/annurev.bb.19.060190.001331.
3. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment. *J. Chem. Educ.*, 1986, vol. 62, no. 7, pp. 633–638. doi: 10.1021/ed062p633.
4. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvets V.I. [Mass and spectrometer assessment of level of inclusion ²H and ¹³C in molecules of amino acids of bacterial objects]. *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic chemistry], 1996, vol. 22, no. 10–11, pp. 856–869. (In Russ.).
5. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvets V.I. [Methods of receiving amino acids and proteins, marked stable isotopes ²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O]. *Biotehnologiya* [Biotechnology], 1996, no. 10. pp. 24–40. (In Russ.).
6. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. [Biosynthesis of transmembrane photo-transforming protein [²H]bacteriorhodopsin, labelled with deuterium on residues of aromatic amino acids [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr, [2,4,5,6,7-²H₅]Trp]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Science Instrumentation], 2013, vol. 23, no. 2. pp. 14–26. (In Russ.).
7. Matthews H.R., Kathleen S., Matthews K., Stanley J. Selective deuterated amino acid analogues. Synthesis, incorporation into proteins and NMR properties. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1977, vol. 497, pp. 1–13. doi: 10.1016/0304-4165(77)90134-9.
8. LeMaster D.M., Cronan J.E. Biosynthetic production of ¹³C-labeled amino acids with site-specific enrichment. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, vol. 257, no. 3, pp. 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, vol. 3, no. 2, pp. 132–138.
10. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. [Microbiological synthesis of deuterium of marked *L*-phenylalanine a facultative methylotrophic bacterium of *Brevibacterium methylicum* on Wednesdays with various concentration

- of heavy water]. *Biofarmazevticheskiy zhurnal* [Biopharmaceutical journal], 2012, vol. 4, no. 1, pp. 11–22. (In Russ.).
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, vol. 59, no. 4, pp. 1099–1103.
 12. 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, vol. 7, no. 3, pp. 249–260.
 13. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, no. 8, pp. 911–918. doi: [10.1139/o59-099](https://doi.org/10.1139/o59-099).
 14. Skladnev D.A., Mosin O.V., Egorova T.A. et al. [Methylotrophic bacteria — sources isotopno marked ²H- and ¹³C-amino acids]. *Biotechnologiya* [Biotechnology], 1996, no. 5, pp. 25–34. (In Russ.).
 15. Karnaukhova E.N., Mosin O.V., Reshetova O.S. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum*. *Amino Acids*, 1993, vol. 5, no. 1, pp. 125.
 16. 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, no. 2, pp. 225–229. doi: [10.1271/bbb.62.225](https://doi.org/10.1271/bbb.62.225).
 17. Cohen J.S., Putter I. The isolation of deuterated amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, vol. 222, pp. 515–520. doi: [10.1016/0304-4165\(70\)90143-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(70)90143-1).
 18. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Analytical Biochemistry*, 1974, vol. 60, no. 1, pp. 45–50. doi: [10.1016/0003-2697\(74\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90129-8).
 19. Egorova T.A., Mosin O.V., Eremin S.V., Karnaukhova E.N., Zvonkova E.N., Shvets V.I. [Division of amino acids of proteinaceous hydrolyzates natural object by VEZhH method in the form of a karbobenzoksa of derivatives]. *Biotechnologiya* [Biotechnology], 1993, no. 8, pp. 21–25. (In Russ.).
 20. Mosin O.V., Ignatov I. [Biological impact of a deuterium on prokariot and eukariot cages]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* [Development and registration of medicines], 2014, vol. 2, no. 7, pp. 122–131. (In Russ.).

Contacts: Mosin Oleg Viktorovich,
mosin-oleg@yandex.ru

Article received in edition: 13.08.2015