БИОТЕХНОЛОГИЯ

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ВКЛЮЧЕНИЯ ДЕЙТЕРИЯ И УГЛЕРОДА-13 В МОЛЕКУЛЫ АМИНОКИСЛОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ**

***@ О. В. МОСИН***

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

**Методом высокочувствительной масс-спектрометрии электронного удара исследованы уровни включения стабильных изотопов дейтерия 2H и углерода-13 13С в молекулы секретируемых аминокислот *L*-фенилаланинпродуцирующего штамма *Brevibacterium methylicum* и *L*-лейцинпродуцирующего штамма *Methylobacillus flagellatum* и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы при выращивании бактерий на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов (2Н)метанол, (13С)метанол и 2Н2О. Также осуществлено включение *L*-[2,3,4,5,6-2Н]фенилаланина, *L*-[3,5-2Н]тирозина и *L*-[2,4,5,6,7-2Н]триптофана в бактериородопсин, синтезируемый *Halobacterium halobium ЕТ 1001.* Для масс-спектрометрического анализа мультикомпонентные смеси аминокислот в составе культуральных жидкостей и белковых гидролизатов (гидролиз в 6 М 2НСl (3% фенол) и 2 М Ва(ОН)2), превращали в N-бензилоксикарбонил-производные аминокислот и метиловые эфиры N-диметиламинонафталин-5-сульфонил-производных аминокислот, которые препаративно разделеляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученные [2H]- и [13C]аминокислоты представляли собой смеси, различающиеся количеством включённых в молекулу изотопов. Уровни включения 2Н и 13С 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 2Н2О; изотопномеченые аминокислоты, бактериородопсин***

# ВВЕДЕНИЕ

Обогащение молекул стабильными изотопами (2Н, 13С, 15N и другие) 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 2Н, 13С, 15N с различными уровнями изотопного включения, применяются для изучения 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].

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, самое главное, 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 счёт выращивания штаммов продуцентов на средах, содержащих в качестве источников стабильных изотопов следующие субстраты: 15NН4Сl [17], (13С)метанол, (2Н)метанол [18], и 2Н2О [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 определённым положениям молекул за счёт ассимиляции клеткой меченых предшественников, например, [1,4- 13С]сукцината, [1, 2- 13С]ацетата, [1- 13С]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 [2Н]- и [13С]аминокислот за счёт утилизации низкомолекулярных меченых субстратов - (2Н)метанола, (13С)метанола и 2Н2О 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 обращённо-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.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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-дезоксиглюконатальдолазный вариант рибулозо-5-монофосфатного пути фиксации углерода. Для 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 счёт выращивания штамма *B. methylicum* на средах с 2Н2О и обычным метанолом, так как уровень включения 2Н в молекулы аминокислоты за счёт ассимиляции (2Н)метанола незначителен [25].

Поскольку в клетке происходит ассимиляция водорода (дейтерия) из Н2О (2Н2O)среды, мы подбирали условия включения дейтерия в молекулы аминокислот и белков при ступенчатом возрастании концентрации 2Н2O в ростовых средах, как показано в табл. 1. Рост бактерий на 2H2O-cодержащих средах характеризуется увеличением продолжительности лаг-фазы, времени клеточной генерации и снижением выходов микробной биомассы (табл. 1), поэтому было необходимо проводить адаптацию бактерий к 2Н2О. Метод адаптации штамма *B. methylicum* к росту на 2Н2О при сохранении способности к биосинтезу *L*-фенилаланина описан в работе [23]. В данной работе были исследованы образцы культуральной жидкости *B. methylicum* и гидролизаты биомассы, полученные в ходе многоступенчатой адаптации бактерий к тяжёлой воде на средах с различным содержанием 2Н2О (от 24.5 до 98% 2Н2О\*). Поскольку данный штамм метилотрофных бактерий удалось адаптировать к росту на 2Н2О, исследование уровней включения дейтерия в молекулы аминокислот представлялось наиболее интересным.

В отличие от культивирования на 2Н2О-среде, где необходимо проводить клеточную адаптацию к дейтерию, при получении [13С]аминокислот за счет утилизации 13СН3ОН данный этап не является обязательным, поскольку этот изотопный субстрат не оказывает негативного биостатического эффекта на ростовые характеристики метилотрофов (см. табл. 1). Поэтому в случае *M.* *flagellatum* включение 13С в молекулы аминокислот осуществляли в одну стадию при выращивании бактерий на водных средах, содержащих 1% (13C)метанол*.*

**Таблица 1**

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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер опыта | Среда выращивания | Величина лаг-фазы, ч | Выход биомассы, % от контроля | Время генерации, ч |
| 1 | 0 | 24.0 | 100 | 2.2 |
| 2 | 24.5 | 32.1 | 90.6 | 2.4 |
| 3 | 49.0 | 40.5 | 70.1 | 3.0 |
| 4 | 73.5 | 45.8 | 56.4 | 3.5 |
| 5 | 98.0 | 60.5 | 32.9 | 4.4 |
| 6 | CН3ОН | 0 | 100 | 1.1 |
| 7 | 13СН3ОН | 0.1 | 72.0 | 1.0 |

В качестве другой модельной системы для включения изотопной метки в молекулы белков, использовали бактериородопсин [26], синтезируемый в мембране *Halobacterium halobium ЕТ 1001*. Выбор для этих целей бактериородопсина, функционирующего как АТP-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 счёт выращивания *H. halobium ЕТ 1001* на синтетической среде с дейтерийсодержащими аналогами ароматических аминокислот - *L*-[2,3,4,5,6-2Н]фенилаланином, *L*-[3,5-2Н]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7-2Н]триптофаном*.*

Основные этапы при выделении [2H]-и [13C]-аминокислот заключались в выращивании штаммов-продуцентов на средах с мечеными субстратами - (2Н)метанолом, (13С)метанолом и 2Н2О или *L*-[2,3,4,5,6-2Н]фенилаланином, *L*-[3,5-2Н]тирозином и *L*-[2,4,5,6,7-2Н]триптофаном (бактериородопсин), отделении культуральных жидкостей, содержащих секретируемые аминокислоты, от микробной биомассы, разрушении клеток, выделении фракции суммарных белков биомассы и бактериородопсина с последующим их гидролизом, дериватизации смесей аминокислот дансилхлоридом, бензилоксикарбонилхлоридом и диазометаном, разделении метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот и N-Cbz-производных аминокислот методом обращённо-фазовой ВЭЖХ, масс-спектрометрии электронного удара полученных производных аминокислот.

2Н- и 13C-Содержащие аминокислоты выделяли из лиофилизованных культуральных жидкостей штаммов-продуцентов аминокислот *B. methylicum* и *M. flagellatum*, а также в составе гидролизатов суммарных белков биомассы. При выделении фракции суммарных белков необходимо учитывать наличие в них углеводов, липидов и пигментов. В работе использовали богатые по белку штаммы бактерий со сравнительно небольшим содержанием углеводов в них. Гидролизу в качестве фракции суммарных белков подвергали остаток после исчерпывающего отделения липидов и пигментов экстракцией органическими растворителями (метанол-хлороформ-ацетон). В редких случаях для полного отделения от сопутствующих компонентов прибегали к солюбилизации белков в SDS или высаливании 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 высокоспиральным белком. Поэтому при выделении бактериородопсина из пурпурных мембран галофильной бактерии *H. halobium* *ЕТ 1001* мы солюбилизовали его в 0.5% растворе SDS с сохранением α-спиральной конфигурации белка [28], а далее осаждали его 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, 1100 С), 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 (1Н-2Н)-обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтеронов) при атоме С3 аспарагиновой и С4 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 2НCl с 3% фенолом (в 2Н2O)). Другой вариант гидролиза белка заключался в использовании 2 М Ba(OH)2 (1100 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 2НСl в 2Н2О (в присутствии добавки фенола для сохранения ароматических аминокислот), позволяющего избежать рацемизации. Для изучения же уровня включения стабильных изотопов в остатки ароматических кислот бактериородопсина и в аналитических целях лучше применять гидролиз белка в растворе Ва(ОН)2, при котором отсутствует (1Н-2Н)-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.

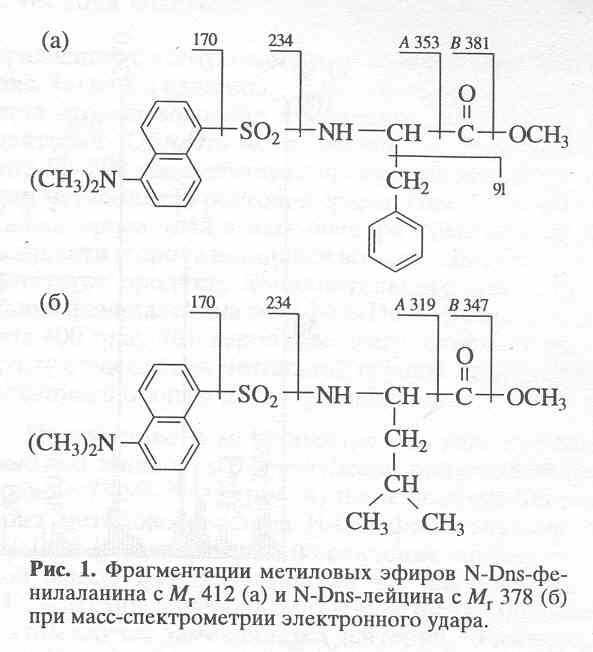
Для получения летучих производных аминокислоты переводили в метиловые эфиры N-Dns-аминокислот или N-Cbz-аминокислоты, которые затем разделяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ. Условия N-дериватизации аминокислот отрабатывали таким образом, чтобы получить в масс-спектрах как можно более интенсивные пики их молекулярных ионов М+. на уровне фона метаболитов среды. Для этого проводили прямую дериватизацию аминокислот в составе лиофилизованных 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 этого, из аргинина синтезировался N-три-Dns-(Cbz)-аргинин. Поэтому в масс-спектрометрических исследованиях молекулярные ионы М+. этих соединений соответствовали ди- или три- производным.

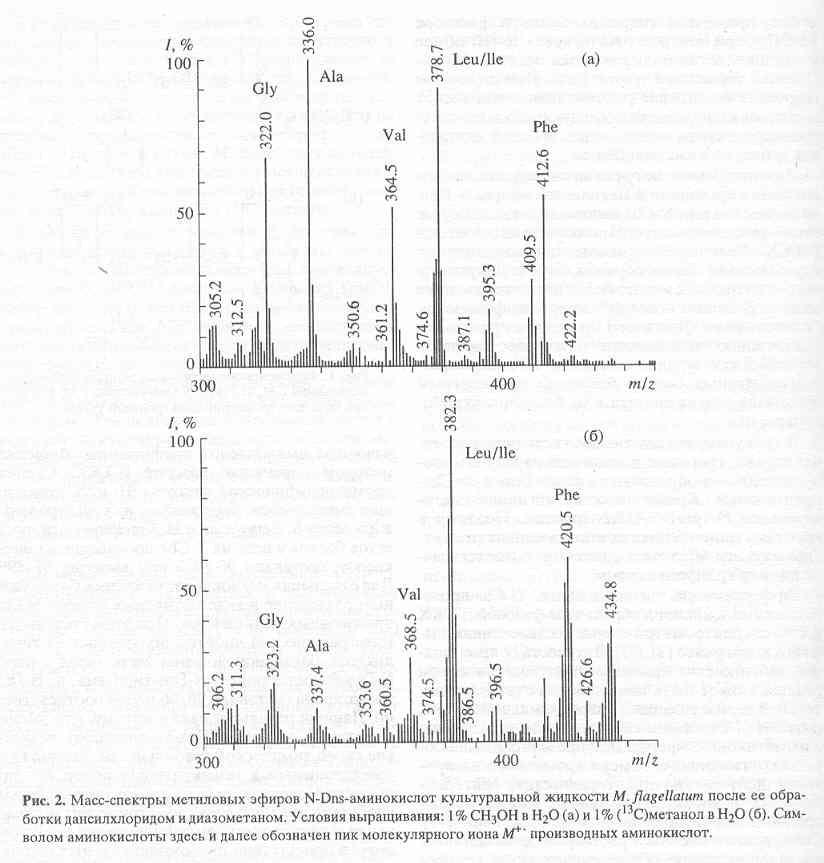
Эффективность использования N-Cbz-производных аминокислот в обращённо-фазовой ВЭЖХ и в масс-спектрометрических исследованиях была показана ранее [31, 32]. Летучесть N-производных аминокислот при масс-спектрометрическом анализе может быть повышена за счет дополнительной дериватизации по карбоксильной группе, поэтому N-Dns-аминокислоты были переведены в их метиловые эфиры. Для предотвращения обратного изотопного обмена ароматических протонов (дейтеронов) при этерификации дейтериймеченых аминокислот, в данной работе отдали предпочтение использованию диазометана для этих целей [33]. Свежеприготовленным раствором диазометана в диэтиловом эфире обрабатывали сухие остатки смесей аминокислот. При дериватизации аминокислот диазометаном происходило дополнительное N-метилирование по α-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 2Н и 13С 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-производные аминокислот препаративного разделяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ. Степени хроматографической чистоты 2Н- и 13С-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 составили 96, 97 и 98% соответственно. Данный результат важен потому, что именно метиловые эфиры N-Dns-аминокислот вследствие своей химической стабильности, наличия высокоинтенсивных молекулярных ионов М+. 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, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов.

Пути фрагментации метиловых эфиров N-Dns-фенилаланина и N-Dns-лейцина при масс-спектрометрии электронного удара приводят к формированию пиков их молекулярных ионов при m/z 412 и m/z 378 и к образованию дансильных фрагментов и продуктов их дальнейшего распада до N-диметиламинонафталина, а также к получению аминных А+ и аминоацильных фрагментов В+ (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 изотопномеченых 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.

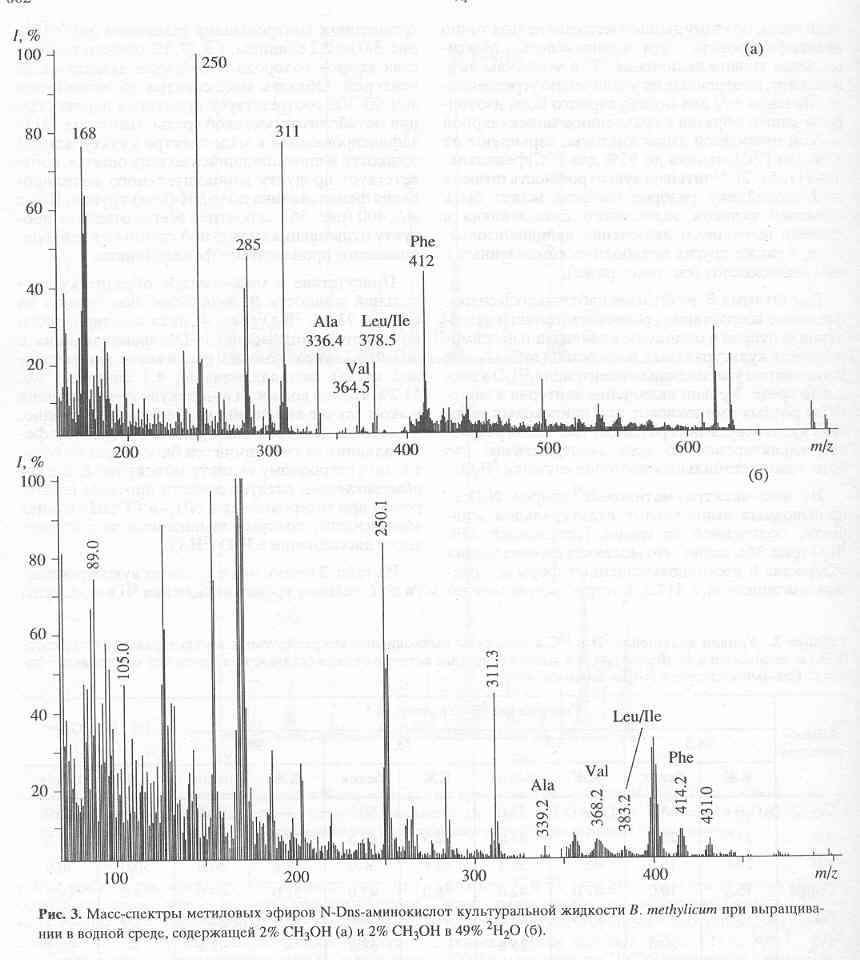


При использовании в качестве источников стабильных изотопов (13С)метанола и 2Н2О, в клетке синтезируются изотопнозамещённые аминокислоты, различающиеся количеством атомов, замещённых на 13С и 2Н. При этом, чем выше молекулярная масса аминокислот, тем возможен больший набор ионов, соответствующих изотопнозамещённым формам. Пики при m/z 323.2; 337.4; 368.5; 382.3; 420.5 в масс-спектре [13С]аминокислот дериватизованной культуральной жидкости *M. flagellatum*, полученной с водной среды, содержащей 1% (13С)метанол (рис. 2 *б*), соответствуют по массе метиловым эфирам N-Dns-глицина, N-Dns-аланина, N-Dns-валина, N-Dns-лейцина/изолейцина и N-Dns-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 13С в молекулы аминокислот, измеренные по увеличению усреднённого значения m/z для молекулярного иона изотопномеченого образца в сравнении с молекулярной массой природной аминокислоты варьируют от 35% для [13C]аланина до 95% для [13С]фенилаланина (табл. 2). Учитывая ауксотрофность штамма по *L*-изолейцину, разброс значений может быть объяснён вкладом экзогенного *L*-изолейцина в уровень изотопного включения лейцина, 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 2Н2O 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 служила 2Н2О.

Из масс-спектра метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот культуральной жидкости, полученной со среды, содержащей 49% 2Н2О (рис. 3 *б*) видно, что молекула фенилаланина содержала 6 изотопнозамещённых форм со средним значением m/z 414.2, которое возрастает по сравнению с контрольными условиями (m/z 412.0, рис. 3 *а*) на 2.2 единицы, т. е. 27.5% от общего количества атомов водорода в молекуле замещены на дейтерий. Область масс-спектра со значениями m/z 90-300 соответствует продуктам дериватизации метаболитов ростовой среды. Пик с m/z 431.0, зафиксированный в масс-спектре культуральной жидкости и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования фенилаланина по α-NH-(Dns)- группе. Пик с m/z 400 (рис. 3 *б*) вероятнее всего отвечает продукту отщепления метильной группы от дейтерированного производного фенилаланина.



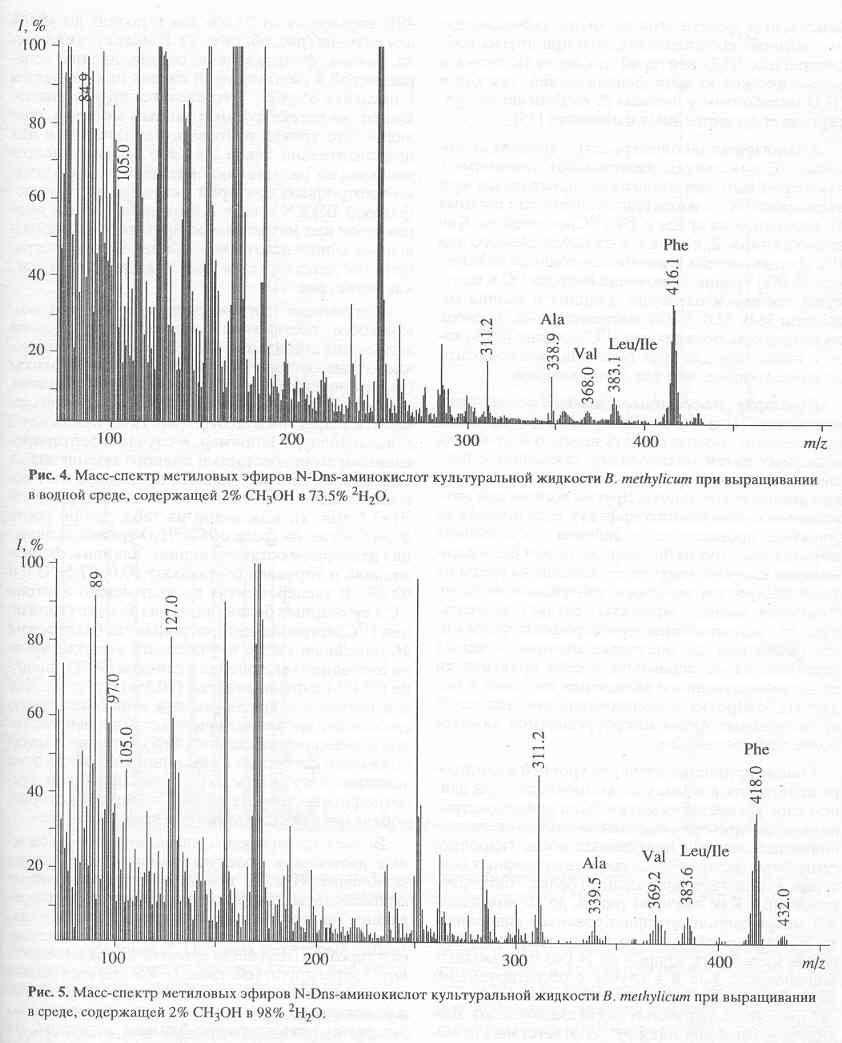
Присутствие в масс-спектре образца культуральной жидкости *B. methylicum*, полученной на среде с 73.5% 2Н2О (рис. 4) пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns-фенилаланина с m/z 416.1 указывает на увеличение молекулярной массы фенилаланина на 4.1 единицу, т. е., 51.2% атомов водорода в молекуле фенилаланина в этом случае замещены на дейтерий. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу фенилаланина за счет процесса биосинтеза *de novo*, т. е. по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым следует отнести протоны (дейтероны) при гетероатомах в NH2-и СООН- группах аминокислот, которые замещаются за счёт лёгкости диссоциации в Н2О (2Н2О).

**Таблица 2**

Уровни включения 2Н и 13С 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)

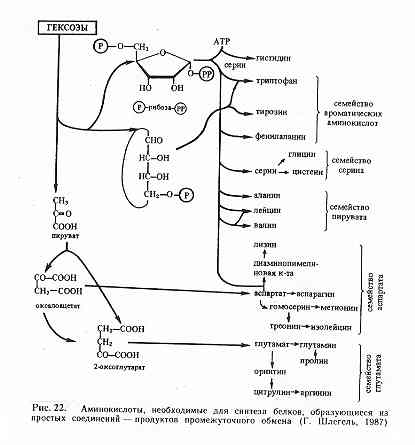
|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Аминокислоты | Содержание 2Н2О в среде, %\*  24.5 49.0 73.5 98.0  КЖ белок КЖ белок КЖ белок КЖ белок | | | | 1%13СН3ОН\*\*  КЖ белок | |
| Глицин | - 15.0 | - 35.0 | - 50.0 | - 90.0 | | 60.0 90.0 |
| Аланин | 24.0 20.0 | 37.5 45.0 | 62.5 62.5 | 77.5 97.5 | | 35.0 95.0 |
| Валин | 20.0 15.0 | 46.3 36.3 | 43.8 50.0 | 58.8 50.0 | | 50.0 50.0 |
| Лейцин/изолейцин | 15.0 10.0 | 47.0 42.0 | 46.0 45.0 | 51.0 49.0 | | 38.0 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 | - 68.8 | - 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 |

Из табл. 2 видно, что условиях ауксотрофности по *L*-лейцину уровни включения 2Н в молекулы лейцина/изолейцина ниже, чем для фенилаланина. Отмеченная особенность отчётливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией 2Н2О. Ещё раз этот результат подтвердили рис. 5, где показан масс-спектр [2Н]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-фенилаланиа увеличивается по сравнению с контрольными условиями на 6 единиц, что соответствует замещению 75% от 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, что в масс-спектре этого образца фиксируется пик обогащённого 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 С2-С6 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 2Н2О дейтерий также включается в ароматическое кольцо фенилаланина, так как в 2Н2О метаболизм у штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений [25].



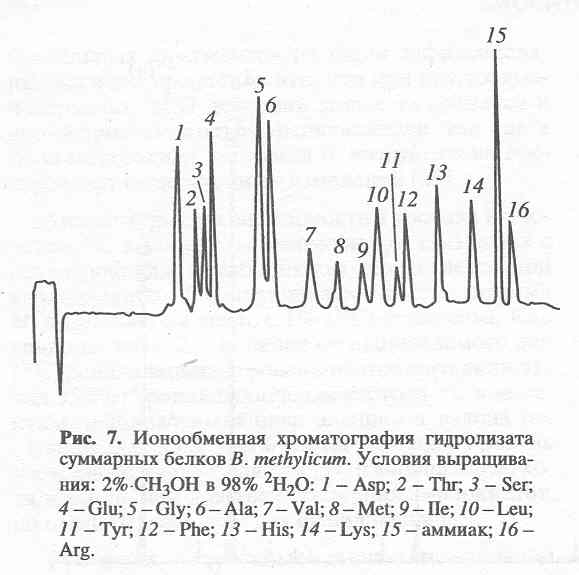
Аналогичная закономерность в уровнях включения 13С в молекулы аминокислот, связанных с ауксотрофным метаболизмом, проявляется при выращивании *L*-изолейцинзависимого штамма *M. flagellatum* на среде с 1% (13С)метанолом. Как видно из табл. 2, в отличие от наблюдаемого для [13С]фенилаланина (уровень изотопного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

Суммируя полученные данные по уровням включения 2Н-и 13С 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, выполняющего роль АТФ-зависимой транслоказы в клетках галофильной бактерии Halobacterium halobium. Как видно из рис. 6, до десяти аминокислот могут быть идентифицированы в гидролизате белка *B. methylicum* по пикам молекулярных ионов метиловых эфиров их N-Dns-производных аминокислот.

Как и в случае с секретируемыми аминокислотами, пики М+. соответствовали смесям изотопнозамещённых форм аминокислот. Для лизина и тирозина пики М+. соответствовали метиловым эфирам ди-производных аминокислот - α, ε-ди-Dns-лизину (с М+. при m/z 631.0) и О, N-ди-Dns-тирозину (с М+. при m/z 663.9). Уровни изотопного включения дейтерия в молекулы аминокислот при содержании 2Н2O в ростовой среде 49% варьируют от 25.6% для тирозина до 45.0% для аланина (рис. 6 *б* и 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 обращённо-фазовой ВЭЖХ в виде N-Cbz-производных аминокислот или метиловых эфиров их N-Dns-производных аминокислот и ионнообменной хроматографии, где детектируется уже 15 аминокислот (см., например, рис. 7).



Полученные данные свидетельствуют о возможности достижения максимальных уровней включения стабильных изотопов 2Н и 13С в аминокислотные остатки суммарных белков биомассы (за исключением лейцина/изолейцина и валина, 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% 2Н2О (табл. 2). Как видно из табл. 2, при росте *B.* *methylicum* на среде с 98% 2Н2О, 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 13С в суммарные белки биомассы за счёт утилизации (13С)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 2Н и 13С в метаболически связанные аминокислоты обнаружили определённую коррелляцию. 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 в 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, 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*-[2,3,4,5,6-2Н]фенилаланин, *L*-[3,5-2Н]тирозин и *L*-[2,4,5,6,7-2Н]триптофан (рис. 8). Как видно из рис. 8, в масс-спектре дериватизованного гидролизата бактериородопсина детектируются пики, соответствующие молекулярным ионам обогащённых 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 М+. при m/z 429 (ср. m/z 428 для производного тирозина) и N-Dns-триптофана с М+. при m/z 456 (ср. m/z 451 для производного триптофана). Все они отвечают смеси изотнопозамещённых форм аминокислот, различающихся количеством атомов водорода, замещённых 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, проведённые исследования продемонстрировали эффективность масс-спектрометрии электронного удара N-Cbz-производных аминокислот и метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот для исследования уровней изотопного обогащения молекул аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, полученных биосинтетически с использованием микроорганизмов. Метод незаменим для изучения состава пула аминокислот, секретируемых в культуральные жидкости штаммов-продуцентов, выращенных на средах со стабильными изотопами.

**Экспериментальная часть**

В работе использовали *D*, *L*-аминокислоты (Reanal, Венгрия), аденозин- и уридин-5-монофосфаты (Sigma, США), панкреотическую телячью дезоксирибонуклеазу Ι (Fluka Chemie AG, Швейцария), додецилсульфат натрия (Chemapol, Чехо-Словакия). *L*-[2,3,4,5,6-2Н5]фенилаланин (90 ат.% 2Н), *L*-[3,5-2Н2]тирозин (96 ат.% 2Н) и *L*-[2,4,5,6,7-2Н5]триптофан (98 ат.% 2Н) (способы получения указаны в работах [34, 35]), были предоставлены А. Б. Пшеничниковой (МИТХТ им. М. В. Ломоносова). Для синтеза производных аминокислот использовали N-диметиламинонафталин-5-сульфохлорид (дансилхлорид) (Sigma, США), бензилоксикарбонилхлорид (Войковский химзавод, РФ) и диазометан, получаемый из N-нитрозометилмочевины (Merck, Германия).

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

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

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

*Halobacterium halobium ЕТ 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 объёмом 250 мл с наполнением средой 50 мл по методике [23], используя в качестве источников стабильных изотопов (2H)метанол, (13С)метанол и 2Н2O в присутствии *L*-лейцина для *B. methylicum* и *L*-изолейцина для *M. flagellatum* в концентрациях 10 мг/л. Клетки отделяли центрифугированием (10000 g, 20 мин). В культуральной жидкости анализировали секретируемые аминокислоты.

*Для выделения фракции суммарных белков биомассы* клетки дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием (10000 g, 20 мин), экспонировали ультразвуком при 40 кГц (3 x 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 - [2,3,4,5,6-2Н]фенилаланином, [3,5-2Н]тирозином, и [2,4,5,6,7-2Н]триптофаном (количества компонентов приведены в г/л): (*D*, *L*-аланин 0.43, *L*-аргинин 0.4, *D*, *L*-аспарагиновая кислота 0.45; *L*-цистеин 0.05; *L*-глутаминовая кислота 1.3; *L*-глицин 0.06; *D*, *L*-гистидин 0.3; *D*, *L*-изолейцин 0.44; *L*-лейцин 0.8; *L*-лизин 0.85; *D*, *L*-метионин 0.37; *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 (NaCl 250; MgSO4 x 7H2O 20; KСl 2; NH4Cl 0.5; KNO3 0.1; KH2PO4 0.05; K2HPO4 0.05; цитрат натрия 0.5; MnSO4 x H2O 3 x 10-4; CaCl2 x 6H2O 0.065; ZnSO4 x 7H2O 4 x10-5; FeSO4 x 7H2O 5 x 10-4; CuSO4 x 5H2O 5 x 10-5); глицерин 1.0; ростовые факторы (биотин 0.1 x 10-3; фолиевая кислота 10 x10-3; витамин В12  0.02 x 10-3).

*Для выделения фракции пурпурных мембран* клетки, полученные после отделения культуральной жидкости и двухкратной промывки дистиллированной водой (100-150 мг), суспендировали в 100 мл 0.1 М буфера трис-HCl (рН 7.6), добавляли 1 мг дезоксирибонуклеазы Ι и инкубировали в течении 5-6 ч при 37 0С, затем разбавляли дистиллированной водой до 200 мл и инкубировали 15 ч при 4 0С. Осадок промывали дистиллированной водой с последующим отделением водной фракции до получения бесцветных промывных вод. Чистоту полученной суспензии пурпурных мембран (в Н2О) контролировали на спектрофотометре Beckman DU-6 (США) по соотношению полос поглощения 280/568 нм (ε280 1.1 x 105 М-1см-1 [37] и ε568 6.3 x 104 М-1 см-1 [38]).

*Бактериородопсин* выделяли по методу [39], солюбилизируя препараты пурпурных мембран (50 мг) в 2 мл 0.5% раствора SDS в Н2О и осаждая продукт 5-кратным избытком метанола на холоду (00 С). 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 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 2НСl (3% фенола в 2Н2О) или 2 М Ва(ОН)2 (1100С, 24 ч) [41].

*N-Dns-аминокислоты***.** К 4-5 мг лиофилизованных препаратов культуральной жидкости и белковых гидролизатов в 1 мл 2 М NaHCO3 рН 9-10 порциями при перемешивании добавляли 25.6 мг дансилхлорида в 2 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при перемешивании при 400 С, затем подкисляли 2 М HСl до рН 3.0 и экстрагировали этилацетатом (3 x 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до значения рН 7.0, сушили безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли при 10 мм. рт. ст.

*Метиловые эфиры N-Dns-аминокислот*. Для получения диазометана к 20 мл 40% КОН в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г влажной нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течении 15-20 мин. После окончания интенсивного газовыделения эфирный слой отделяли, промывали ледяной водой до рН 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 00С 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 00С, перемешивали 3 ч, подкисляли 2 М HCl до рН 3 и продукты экстрагировали этилацетатом (3 x 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до рН 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 (Б) для метиловых эфиров N-Dns-аминокислот.

N-Cbz-аминокислоты детектировали по поглощению при 254 нм. Метиловые 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 обращённо-фазовой ВЭЖХ [31].

*Метиловые эфиры N-Dns-аминокислот* разделяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженным насосомKnauer, УФ-детектором 2563 и интегратором С-R 3A (Shimadzu, Япония). Использовали неподвижную фазу: Separon SGX C18; 18.7 мкм; 150 x 3.3 мм (Kova, Чехо-Словакия); система растворителей: (А) - ацетонитрил-трифторуксусная кислота, (20:80 об/об) и (В) - ацетонитрил. Использовали градиентное элюирование: от 0 до 20% В 5 мин, 20 до 100% В 30 мин, 100% В 5 мин, от 100 до 0% В 2 мин, 0% В 10 мин.

*Ионнообменную хроматографию* белковых гидролизатов осуществляли на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230x 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, объёмом 10 мкл после её обработки нингидрином.

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

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.**

1. *Beaufrere B., Fournier V., Salle B., Putet G.* // American Journal of Physiology. 1992. V. 263. ¹. 1. P. 214-220.

2. *McIntosh L. P., Dahlquist F. W.* // Quarterly Reviews of Biophysics. 1990. V. 23. P. 1-38.

3. *Young V. R., Tu Y. M., Krempf M.* //New techniques in nutritional research/ Ed. Whitehead R. G. New York. Academic Press. 1990. V. 9. P. 17-72.

4. *Fesic S. W. & Zuiderweg E. R.* // Quarterly Reviews of Biophysics. 1990. V. 23. ¹ 2. P. 97-131.

5. *Haris P. I., Robillard G. T., Vandijk A. A., Chapman D.* // Biochemistry. 1992. V. 31. ¹ 27. P. 6279-6284.

6. *Rothschild K. J., Braiman M. S., Yi-Wu He., Marti T. and Khorana H. G.* // J. of Biological Chemistry. 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. Magn. Reson. 1986. V. 2. P. 210-216.

12. *Hruby V. J.* // J. Synth. and Appl. Isot. Labelled Compounds. 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. Labelled Compd. 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. ¹ 9. P. 304-313.

17. *McIntosh L. P., Griffey R. H., Muchmore D. C., Nielson C. P., Redfield A. G., Dahlquist F. W.* // Proc. Natn. 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. ¹ 2. 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.* // Applied and Environmental Microbiology. 1993. P. 1099-1103.

21. *LeMaster D. M., Cronan J. E.* // Journal of Biological Chemistry. 1982. V. 257. ¹ 3. P. 1224-1230.

22. *LeMaster D. M.* // Quarterly Reviews of Biophysics. 1990. V. 23. P. 133-174.

23. *Мосин О. В., Карнаухова Е. Н., Пшеничникова А. Б., Складнев Д. А., Акимова О. Л.* // Биотехнология. 1993. N. 9. С. 16-20.

24. *Егорова Т. А., Мосин О. В., Ерёмин С. В., Карнаухова Е. Н., Звонкова Е. Н., Швец В. И.* // Биотехнология. 1993. N. 8. С. 45-50.

25. *Мосин О. В., Складнев Д. А., Егорова Т. А., Юркевич А. М., Швец В. И.* // Биотехнология. 1996. ¹ 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.* // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. ¹ 2. 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., Филлипович Е. И., Митрофанова Т. К., Мягкова 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.* // Journal of Chromatography 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. et Biophys. Acta. 1976. V. 446. P. 479-585.

35. *Matthews H. R., Kathleen S., Matthews K. and Stanley J.* // Biochim. et Biophys. Acta. 1977. V. 497. P. 1-13.

36. *Miller J. H.* // Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1976. P. 393.

37. *Oesterhelt D., Hess B.* // Eur. J. Biochem. 1973. V.37. ¹.1. P. 316-326.

38. *Tokunada F., Ebrey T.* // Biochemistry. 1978. V.17. ¹.10. P. 1915-1922..

39. *Oesterhelt D., Stoeckenius W.* // Methods Enzymol. 1974. V. 31. P. 660-668.

40. *Bligh E. G., Dyer W. J.* // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. ¹. 8. P. 911-918.

41. *Мосин О. В., Егорова Т. А., Чеботаев Д. В., Складнев Д. А., Юркевич А. М., Швец В. И.* // Биотехнология. 1996. ¹ 4. С. 27-32.

***MASS-SPECTROMETRY EVALUATION OF 2H AND 13C ENRICHMENT LEVELS OF AMINO ACIDS, OBTAINED FROM BACTERIAL OBJECTS***

***O.V.MOSIN***

***M. V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, 117571***

***The high-sensitive method of electron impact mass-spectroscopy was employed for evaluation of 2H and 13C enrichment levels of secreted amino acids of methylotrophic bacteria Brevibacterium methylicum and Methylobacillus flagellatum, and amino acid resigues of total protein obtained from media contaning as a sourse of stable isotopes (2H)methanol, (13C)methanol and 2H2O. The incorporation of L-[2,3,4,5,6-2Н]phenylalanine, L-[3,5-2Н]tyrosine and L-[2,4,5,6,7-2Н]tryptopan in bacteriorhodopsin synthesised in membrane of halophilic bacterium Halobacterium halobium ET 1001 was also made. For mass-spectrometric analysis the multicomponential mixures of amino acids, derived from cultural media and protein hydrolysates after hydrolysis in 6 M 2HСl (3% phenol) and 2 M Ва(OH)2 were modified to N-benzyloxycarbonyl-derivatives of amino acids as well in methyl esters of N-dansyl-derivatives of amino acids which were preparative separated using a method of reverse-phase high column liquid chromatography (HCLP). [2H]- and [13C]amino acids obtained represented the mixures differing in quantities of isotopes incorporated into molecule. The levels of 2H and 13С enrichment of secreted amino acids and amino acid resigues of protein were found to vary from 10% to L-leucine/isoleucine up to 97.5% for L-alanine depending on concentration of labelled substrates.***