

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Journal of Molecular Biotechnology
Has been issued since 2013.
ISSN: 2310-6255
Vol. 3, No. 1, pp. 25-40, 2014

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

www.ejournal8.com



UDC 579.871.08+577.385.4.08

Using of Facultative Methylophilic Bacterium *Brevibacterium Methylicum B-5652* With RMP-cycle of Carbon Assimilation for Microbiological Synthesis of [²H]phenylalanine With Different Levels of Deuterium Enrichment

¹ Oleg Mosin

² Ignat Ignatov

³ Dmitry Skladnev

⁴ Vitaly Shvets

¹ Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)
103316, Moscow, Talalikhina ulitza, 33
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

² The Scientific Research Center of Medical Biophysics (SRC MB), Bulgaria
Professor, D. Sc., director of SRC MB.
1111, Sofia, N. Kopernik street, 32
E-mail: mbioph@dir.bg

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

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

Abstract. With using of a strain of of *L*-phenylalanine secreted Gram-positive aerobic facultative methylophilic bacteria *Brevibacterium methylicum B-5652*, assimilating methanol via ribulose-5-monophosphate (RMP) cycle of carbon assimilation it was carried out the preparative microbiological synthesis of phenylalanine and metabolically related amino acids (alanine, valine, leucine/isoleucine in the amount of 5–6 mmol/l), labelled with deuterium (²H). The data on adaptation of *L*-phenylalanine secreted methylophilic bacterium *B. methylicum* to the maximal concentration of deuterium in minimal growth medium M9 with 98 % ²H₂O and 2 % [²H]methanol, and data on biosynthesis of deuterium labelled *L*-phenylalanine with different levels of enrichment are submitted. The developed method for biosynthesis allows to obtain [²H]phenylalanine with different levels of isotopic enrichment, depending on ²H₂O concentration in growth media M9, from 17 % (2 deuterium atoms) (on growth medium with 24,5 % ²H₂O) right up to 75 % (6 deuterium atoms) (on growth medium with 98 % ²H₂O) with introduction of deuterium to benzyl C₆H₅CH₂-fragment of molecule that is confirmed with the data of the electron impact (EI) mass-spectrometry analysis of methyl ethers of N-dimethylamino(naphthalene)-5-

sulfochloride (dansyl) derivatives of [^2H]phenylalanine, isolated from the liquid culture after its separation by RP HPLC.

Keywords: *Brevibacterium methylicum*; L-phenylalanine; biosynthesis; heavy water; electron impact mass spectrometry; RP HPLC.

Введение.

Синтез аминокислот, меченных стабильными изотопами водорода (^2H), углерода (^{13}C), азота (^{15}N) и кислорода (^{18}O) является ключевым звеном в различных биомедицинских и клинических исследованиях с их использованием [1, 2]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения – спектроскопией ^1H -ЯМР [3], ИК [4] и масс-спектрометрией (МС) [5]. Развитие этих методов детектирования стабильных изотопов за последние годы позволило значительно усовершенствовать проведение многочисленных биологических исследований с участием аминокислот *de novo*, а также изучать пути их метаболизма [6].

Аминокислоты, меченные стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , широко применяются как в медицинской диагностике, так и в биохимических исследованиях разнообразного характера, включая метаболизм [7], а также в химических синтезах целого ряда изотопно-меченных соединений на их основе, например, [^2H , ^{13}C]фенилаланин в синтезах пептидных гормонов и нейротрансмиттеров [8]. Изотопно-меченные аналоги L-фенилаланина находят всё большее применение в диагностических целях, например, для выявления наследственной фенилкетонурии и других заболеваний, связанных с нарушением метаболизма фенилаланина в организме, когда необходимо выяснить распределение дейтериевой метки в конечных продуктах метаболизма [9]. Поэтому важно разрабатывать новые биотехнологические подходы получения природных изотопно-меченных аналогов фенилаланина, в том числе дейтерированных. Преимущества биотехнологических методов синтеза изотопно-меченных аминокислот по сравнению с химическим синтезом заключаются в высоких выходах синтезируемых соединений и то, что они обладают природной L-конфигурацией.

Перспективными источниками для биосинтеза [^2H]аминокислот признаны метилотрофные бактерии, способные окислять метанол и другие одноуглеродные соединения, содержащие метильную CH_3 -группу до формальдегида по рибулозо-5-монофосфатному и сериновому путям ассимиляции углеродных субстратов [10]. Интерес к использованию метилотрофных бактерий в биотехнологии возрастает благодаря разработке новых перспективных технологий химического синтеза метанола. Благодаря 50 %-ному уровню биоконверсии метанола (при эффективности конверсии 15,5–17,3 г. сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) метилотрофные бактерии рассматриваются как дешевые источники дейтерированного белка и незаменимых аминокислот, а технологические затраты на их получение определяются, в основном, стоимостью $^2\text{H}_2\text{O}$ и [^2H]метанола. Традиционным подходом при этом является выращивание микробных штаммов-продуцентов аминокислот на средах, содержащих [^2H]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$ с последующим фракционированием КЖ с целью выделения [^2H]аминокислот [11]. Ранее нами сообщалось о получении штамма аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* для микробного синтеза L-фенилаланина [12]. В отличие от традиционных штаммов-продуцентов L-фенилаланина, у которых нарушены активности префенат-дегидратазы или 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат синтетазы, уникальность выделенного нами штамма состоит в том, что для биосинтеза L-фенилаланина необходим L-лейцин.

Целью данной работы было изучение биосинтеза дейтерированного L-фенилаланина с высокими уровнями изотопного обогащения за счет выращивания штамма грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* B-5652, продуцента L-фенилаланина на средах с различными концентрациями тяжелой воды (от 24,5 % до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$).

Материалы и методы.

Объектом исследования являлся *L*-лейцин-зависимый (потребность в лейцине 0,01 г/л) штамм аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* B-5652 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), продуцент *L*-фенилаланина (1 г/л), способный ассимилировать в качестве источника углерода метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) циклу фиксации углерода. Исходный штамм был получен из коллекции культур ВКПМ Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,9 ат.% ^2H), ^2HCl (95,5 ат.% ^2H) и ^2H метанол (97,5 ат.% ^2H), полученные из Российского научно-исследовательского центра “Изотоп” (Санкт-Петербург, РФ). 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 Brucker WM-250 (“Brucker Daltonics”, ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si). Для синтеза *N*-производных аминокислот использовали 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлорид (дансилхлорид) (“Sigma”, США), карбобензоксихлорид (химзавод им. П.Л. Войкова, РФ) и диазометан (CH_2N_2). Для синтеза CH_2N_2 использовали *N*-нитрозометилмочевину (“Merck”, Германия).

Адаптацию штамма к дейтерию проводили рассевом до отдельных колоний и последующей селекцией на твердых (2 % агар) минимальных средах М9 с добавками 2 % метанола или ^2H метанола, содержащих ступенчато-увеличивающиеся концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 об.%* $^2\text{H}_2\text{O}$) (количества компонентов приведены в г/л): KH_2PO_4 – 3; Na_2HPO_4 – 6; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1; *L*-лейцин – 0,01. Селекцию отдельных колоний проводили по признаку устойчивости к $^2\text{H}_2\text{O}$. За ходом адаптации наблюдали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с $^2\text{H}_2\text{O}$, а также по величине ОП суспензии клеток в жидких средах М9 аналогичного состава, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при $\lambda = 620$ нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Адаптированный к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамм *B. methylicum* выращивали в жидкой максимально дейтерированной среде М9 с 2 % ^2H метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ при 35 °С в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере Biorad (100 об/мин) (“Biorad Labs”, Польша). После 3–4 суток выращивания дейтерированные клетки отделяли на центрифуге Т-24 (“Heraeus Sepatech”, ФРГ) (10000 об/мин, 15 мин), КЖ лиофилизировали в вакууме при 10 мм рт. ст. и использовали для выделения ^2H фенилаланина и сопутствующих ^2H аминокислот.

Для выделения ^2H фенилаланина из КЖ дейтеро-биомассу *B. methylicum*, полученную после выращивания в максимально дейтерированной среде М9 с 2 % ^2H метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$, отделяли от КЖ на центрифуге Т-24 (“Heraeus Sepatech”, ФРГ) при 10000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант лиофилизировали в вакууме при 10 мм рт. ст. К 5 г полученного сухого остатка супернатанта добавляли 30 мг изопропанола, реакционную смесь подкисляли до pH = 2,0 с помощью 5 н. раствора ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$) и выдерживали при 20 °С в течение 4 часов. После отделения неорганических солей центрифугированием (10000 об/мин, 10 мин), супернатант упаривали в роторном вакуумном испарителе РВО-10 (Венгрия) при 10 мм рт. ст. Полученный ^2H фенилаланин (выход 0,65 г/л) перекристаллизовывали из этанола. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 35^{\circ}$ (в этаноле). УФ-спектр (0,1 н. HCl): $\lambda_{\text{max}} = 257,5$ нм, $1,97 \cdot 10^2$ М⁻¹·см⁻¹; масс-спектр ЭУ метилового эфира *N*-Dns- ^2H фенилаланина (70 эВ, 180–200 °С): $[(\text{M}^+) m/z (I, \%)]$: 418 (35 %), 250 (95 %), 234 (21 %), 170 (100 %), 97 (62 %).

Для синтеза *N*-Dns- ^2H аминокислот к 200 мг лиофилизованной КЖ в 5 мл 2 М NaHCO_3 ($2 \cdot 10^{-3}$ моль), pH = 9–10 дробными порциями при перемешивании добавляли 320 мг ($1,2 \cdot 10^{-3}$ моль) дансилхлорида в 5 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при 40 °С в течение часа, затем подкисляли 2 М HCl до pH = 3,0 и

* Здесь и далее использованы % по объему.

экстрагировали этилацетатом (3 раза по 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до pH = 7,0, сушили безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли при 10 мм рт. ст.

Для синтеза метиловых эфиров N-Dns-[²H]аминокислот к 20 мл 40 % KOH в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течение 15–20 мин. После интенсивного газовойделения эфирный слой отделяли и промывали ледяной водой до pH = 7,0, сушили безводным Na₂SO₄ и обрабатывали им N-Dns-[²H]производные аминокислот в составе КЖ штамма продуцента.

Аналитическое и препаративное разделение метиловых эфиров N-Dns-[²H]аминокислот проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer (“Knauer”, ФРГ), снабженным УФ-детектором и интегратором C-R 3A (“Shimadzu”, Япония). В качестве неподвижной фазы использовали Separon SGX, 18,7 мкм, 150×3,3 мм (“Kova”, Словакия). Элюирование проводили в системе растворителей: (А) – ацетонитрил – трифторуксусная кислота (20 : 80, %) и (Б) – ацетонитрил (100 %). Использовали градиентное элюирование: от 20 % А до 100 % Б в течение 30 мин; при 100 % Б 5 мин; от 100 % Б до 20 % А 2 мин; при 20 % Б 10 мин.

Аналитическое определение L-фенилаланина проводили в пробах КЖ, объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150×150 мм) с закрепленным слоем флуоресцентного носителя Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) в системах растворителей: *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5, %) и изопропанол – аммиак (7 : 3, %). Элюцию пятен проводили 0,1 н. HCl после обработки 0,5 %-м раствором нингидрина в *n*-бутаноле. Поглощение элюатов определяли при λ = 540 нм на приборе Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

Масс-спектры электронного удара (ЭУ) метиловых эфиров N-Dns-[²H]аминокислот получены на приборе “MB-80A” (“Hitachi”, Япония) с двойным фокусированием, снабженным комбинированным вакуумным электронным катодным термоисточником (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, температура катодного источника 180–200 °С). Расчет уровней дейтерированности молекул фенилаланина и сопутствующих аминокислот, выделенных с ²H₂O-содержащих сред, проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов M⁺ производных [²H]аминокислот и контрольных аминокислот, полученных в обычной воде.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы статистического пакета STATISTICA 6, используя критерий t-Стьюдента (при p < 0,05).

Результаты и обсуждение.

Как известно, большинство распространенных в природе микроорганизмов не могут служить хорошими продуцентами ароматических аминокислот, вследствие наличия эффективных механизмов регуляции биосинтеза этих соединений в клетке, хотя эта способность проявляется у ряда их мутантных форм [13]. Эффективными микробными продуцентами L-фенилаланина являются, как правило, мутанты, у которых отсутствует негативный контроль со стороны таких ключевых ферментов биосинтеза этой аминокислоты, как префенат-дегидратаза (EC 4.2.1.51) хоризматмутаза (EC 5.4.99.5) и 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат синтетаза (**EC 2.5.1.54**) [14–16].

Определенный интерес в связи с этим представляет исследование способности продуцировать L-фенилаланин лейцинзависимым грамположительным факультативным метилотрофным мутантом *B. methylicum*, ассимилирующим метанол по NAD⁺ зависимому метанол дегидрогеназному (EC 1.6.99.3) варианту рибулозо-5-монофосфатного (PMФ) цикла фиксации углерода – достаточно удобным, хотя и малоизученным объектом для биотехнологического использования. Поэтому начальный этап биохимических исследований со штаммом метилотрофных бактерий *B. methylicum* был связан с получением ауксотрофных мутантов, для которых в большинстве случаев характерны ограниченный спектр мутантных фенотипов и, кроме того, довольно высокий уровень реверсий [17]. Исходный L-лейцинзависимый штамм *B. methylicum* B-5652, продуцент L-фенилаланина был отобран селекцией в лаборатории генетики метилотрофов “ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов” на предыдущем этапе исследований после обработки родительского штамма нитрозогуанидином. Отбор колоний проводили по

признаку устойчивости к аналогу фенилаланина – *мета*-фторфенилаланину (50 мкг/мл). Выделенные на селективных средах аналого-резистентные мутанты конвертировали метанол и накапливали до 1 г/л *L*-фенилаланина в КЖ. Сравнительные анализы (ТСХ, МС, ЯМР) показали, что *L*-фенилаланин, продуцируемый данным штаммом метилотрофных бактерий полностью идентичен природному *L*-фенилаланину.

С целью увеличения эффективности изотопного мечения *L*-фенилаланина и интенсификации бактериального роста на полностью дейтерированной среде полученный мутант *B. methylicum* был адаптирован к росту и биосинтезу в полностью дейтерированных средах М9 с $^2\text{H}_2\text{O}$ и [^2H]метанолом. Для адаптации клеток к $^2\text{H}_2\text{O}$ использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$, поскольку предполагалось, что постепенное привыкание бактерии к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на ростовые и физиологические параметры.

Адаптация заключалась в рассеве исходного штамма до отдельных колоний на чашках Петри с твердыми агаризованными средами М9 с 2 % агаром при ступенчатом увеличении концентрации тяжелой воды в них (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$) и последующей селекции устойчивых к $^2\text{H}_2\text{O}$ колоний клеток, как показано в таблице 1. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ колонии переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. На конечном этапе на среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию $^2\text{H}_2\text{O}$ (степень выживаемости клеток на конечной полностью дейтерированной среде М9 составила 40 %). Затем их переносили в жидкую минимальную среду М9, приготовленную на основе 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанола, и выращивали в течение 3–4 сут при 35 °С.

Таблица 1

Условия адаптации, изотопный состав ростовых сред и характеристики роста *B. methylicum**

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лаг-период, ч	Выход микробной биомассы, г/л	Время генерации, ч
	H_2O	$^2\text{H}_2\text{O}$	метанол	[^2H]метанол			
1	98,0	0	2	0	20±1,40	200,2±3,20	2,2±0,20
2	98,0	0	0	2	30±1,44	184,6±2,78	2,4±0,23
3	73,5	24,5	2	0	32±0,91	181,2±2,89	2,4±0,25
4	73,5	24,5	0	2	34±0,89	171,8±1,81	2,6±0,23
5	49,0	49,0	2	0	40±0,90	140,2±1,96	3,0±0,32
6	49,0	49,0	0	2	44±1,38	121,1±1,83	3,2±0,36
7	24,5	73,5	2	0	45±1,41	112,8±1,19	3,5±0,27
8	24,5	73,5	0	2	49±1,91	94,4±2,74	3,8±0,25
9	0	98,0	2	0	58±1,94	65,8±1,13	4,4±0,70
10	0	98,0	0	2	60±2,01	60,2±1,44	4,9±0,72
10'	0	98,0	0	2	40±0,88	174,0±4,83	2,8±0,30

* Данные опытов 1–10 приведены для *B. methylicum* при выращивании на средах М9, содержащих 2 % метанол/[^2H]метанол и указанное количество (%) $^2\text{H}_2\text{O}$. Данные опыта 10' приведены для адаптированной к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерии *B. methylicum* при выращивании на среде М9, содержащей 2 % [^2H]метанол и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

Как показали эксперименты, замена протонированного метанола [^2H]метанолом при одинаковых концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах приводила к небольшим уменьшениям ростовых характеристик штамма (табл. 1, опыты 2, 4, 6, 8 и 10). Поэтому в дальнейших опытах использовали среды с $^2\text{H}_2\text{O}$ и [^2H]метанолом. На контрольной протонированной среде М9 с водой и метанолом продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации *B. methylicum* составили 20 ч и 2,2 ч, а выход микробной биомассы 200,2 г с 1 л КЖ (табл. 1, опыт 1). В промежуточных опытах (2–10) ростовые параметры изменялись

пропорционально концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в средах. Выявленная закономерность заключалась в увеличении продолжительности лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы с фиксированием самых низких значений этих параметров в максимально дейтерированной среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом (табл. 1, опыт 10). С увеличением концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах до 98 % продолжительность лаг-периода увеличивалась до 60 ч (табл. 1, опыт 10). Отмечено, что длительность времени клеточной генерации с увеличением концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах постепенно увеличивается, достигая 4,9 ч на среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом (табл. 1, опыт 10). В отличие от $^2\text{H}_2\text{O}$, [^2H]метанол не вызывал существенного ингибирования роста и не оказывал влияния на выход микробной биомассы. Напротив, на максимально дейтерированной среде выход микробной биомассы был снижен в 3,3 раза по сравнению с контролем. Важно то, что выход микробной биомассы и уровень накопления *L*-фенилаланина в КЖ при росте адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ микроорганизма в максимально дейтерированной среде изменяются по сравнению с контрольными условиями на 13 % и 5 %, т. е. незначительно (табл. 1, опыт 10').

За ходом процесса клеточной адаптации, условия которой показаны в опыте 10' (табл. 1), наблюдали, исследуя выходы микробной биомассы, продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации (рис. 1). Как видно на рис. 1 выход микробной биомассы у адаптированного штамма *B. methylicum* (в) уменьшался на 13 % по сравнению с контрольными условиями (а) при увеличении времени генерации до 2,8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч. Адаптированный штамм *B. methylicum* возвращался к нормальному росту при переносе в протонированную среду после некоторого лаг-периода, что доказывает фенотипическую природу феномена адаптации, что наблюдалось для других адаптированных нами штаммов метилотрофных бактерий – представителей различных таксономических групп [18]. Эффект реверсии роста в протонированной/дейтерированной средах доказывает, что адаптация к $^2\text{H}_2\text{O}$ является фенотипическим феноменом, хотя не исключается, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же **фенотипического признака** в средах различного изотопного состава. В целом, улучшенные ростовые характеристики адаптированного метилотрофа существенно упрощают схему получения дейтеро-биомассы, оптимальным условиям которой удовлетворяет максимально дейтерированная среда М9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом с инкубационным периодом 3–4 сут при 35 °С.

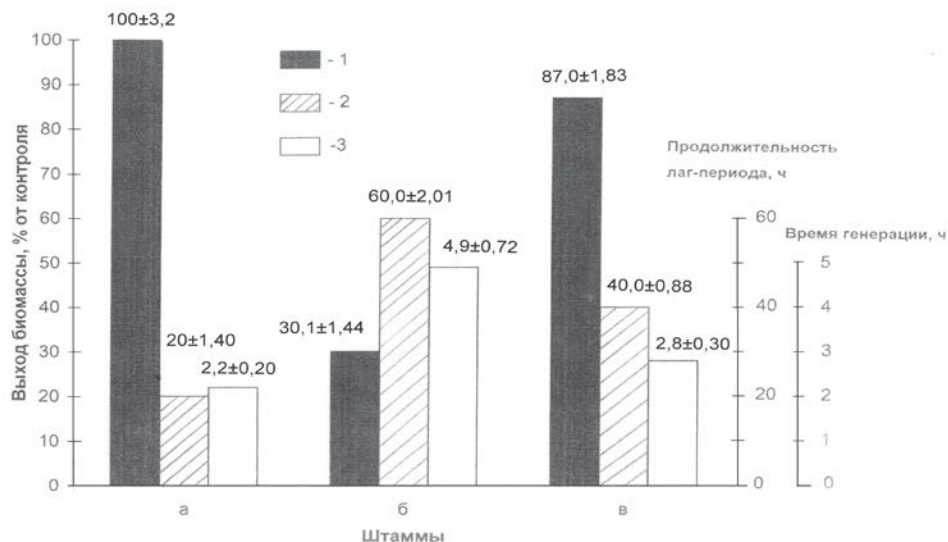


Рис. 1. Выход микробной биомассы *B. methylicum*, величина лаг-периода и время генерации в различных экспериментальных условиях: исходный штамм в протонированной среде М9 с водой и метанолом (а); исходный штамм в максимально дейтерированной среде М9 (б); адаптированный к дейтерию штамм в максимально дейтерированной среде М9 (в):

1 – выход биомассы, % от контроля;

2 – продолжительность лаг-периода, ч; 3 – время генерации, ч.

Динамики роста (1а, 1б, 1в) и накопления *L*-фенилаланина в КЖ (2а, 2б, 2в) исходным (б) и адаптированным к дейтерию (в) штаммом *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9 показаны на рис. 2 относительно контроля (а), полученного в протонированной среде М9. Важной особенностью адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* является то, что он сохранил способность синтезировать и экзогенно продуцировать *L*-фенилаланин в ростовую среду в количестве 0,8 г/л (рис. 2в). В отличие от адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма (в), выход *L*-фенилаланина исходным штаммом *B. methylicum* (б) в максимально дейтерированной среде составил 0,3 г/л, что в 2,6 раза ниже, чем при использовании адаптированного штамма (в) в максимально дейтерированной среде при незначительном уменьшении ростовых характеристик (рис. 2). На рис. 2 видно, что в отличие от адаптированного штамма (в), рост исходного штамма *B. methylicum* (б) в максимальной дейтерированной среде ингибировался дейтерием.

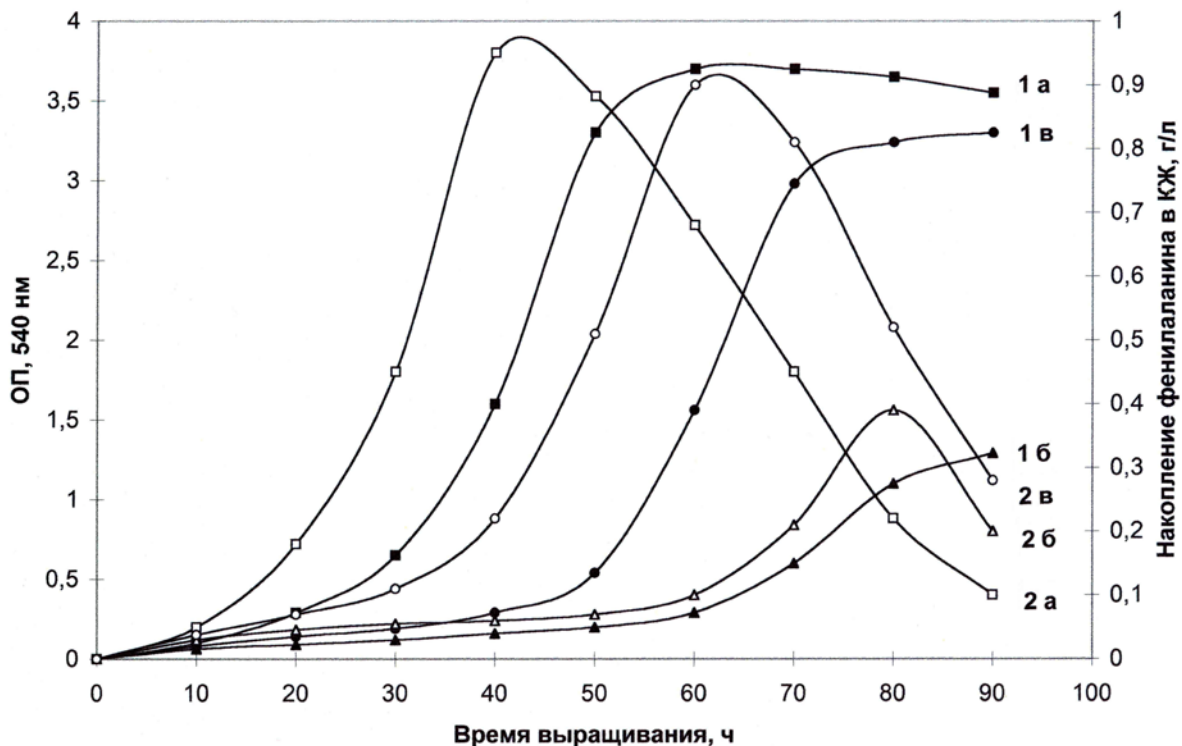


Рис. 2. Динамики роста *B. methylicum* (1а, 1б, 1в) и накопления *L*-фенилаланина в КЖ (2а, 2б, 2в) на средах М9 с различным изотопным составом: а – исходный штамм на протонированной среде М9; в – адаптированный *B. methylicum* на полностью дейтерированной среде М9; б – неадаптированный штамм на полностью дейтерированной среде М9

Общей особенностью биосинтеза *L*-фенилаланина в $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ -средах было увеличение его продукции на ранней фазе экспоненциального роста *B. methylicum*, когда выход микробной биомассы был незначителен (рис. 2а–в). Во всех опытах наблюдалось ингибирование биосинтеза *L*-фенилаланина на поздней фазе экспоненциального роста и снижение его концентрации в ростовых средах. Согласно данным по микроскопическому исследованию растущей популяции микроорганизмов, характер динамики накопления *L*-фенилаланина в КЖ не коррелировал с качественными изменениями ростовых характеристик на различных стадиях роста, что являлось подтверждением морфологической однородности микробной популяции. Скорее всего, накопленный в процессе роста *L*-фенилаланин ингибировал ферменты собственного пути биосинтеза. Кроме того, при выращивании штамма продуцента без рН-статирования может происходить обратное превращение секретируемого *L*-фенилаланина в интермедиаторные соединения его биосинтеза, что отмечено в других работах [19]. Обсуждая механизм биосинтеза

фенилаланина, следует отметить, что он синтезируется в клетках микроорганизмов из общих предшественников ароматических аминокислот – фосфоенолпирувата (PEP) и эритрозо-4-фосфата (E4P) через стадии образования префеновой кислоты, которая через стадию образования фенилпирувата превращается в фенилаланин под действием клеточных трансаминаз [20].

[²H]фенилаланин в чистом виде был выделен экстракцией лиофилизованной при 10 мм рт. ст. КЖ изопропанолом с последующей перекристаллизацией в этаноле ([²H]фенилаланин был также выделен из КЖ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со степенью хроматографической чистоты 97 % и выходом 85 %). Данные по исследованию КЖ методом ТСХ показали, что кроме фенилаланина штамм *B. methylicum* синтезирует и накапливает в КЖ (на уровне 5–6 ммоль/л) метаболически связанные аминокислоты (аланин, валин, лейцин/изолейцин), присутствие которых подтверждалось масс-спектрометрическим анализом ЭУ метиловых эфиров N-дансилхлоридных (Dns) производных аминокислот, выделенных из КЖ штамма-производителя обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Чувствительность масс-спектрометрии ЭУ при анализе дейтерированных соединений составляет 10^{-9} – 10^{-11} моль вещества в пробе, что существенно выше, чем при использовании ИК- и ЯМР-спектроскопии. Данный метод в сочетании с обращенно-фазовой ВЭЖХ хорошо зарекомендовал себя для исследования уровней изотопного обогащения молекул аминокислот в составе их мультикомпонентных смесей, каковыми являются образцы лиофилизованной КЖ, полученные с дейтерированных сред, и может быть использован для анализа аминокислот любых природных объектов.

N-Dns производные аминокислот получали прямой обработкой образцов лиофилизованной КЖ дансилхлоридом (DnsCl). Реакцию замещения аминокислот по аминогруппе DnsCl проводили в щелочной среде в присутствии 2 М NaHCO₃ (pH = 9–10) в водно-органическом растворителе (ацетон) в соотношении дансилхлорид-аминокислота, равным 2 : 1, мас.%. Летучесть N-Dns-производных аминокислот при масс-спектрометрическом анализе повышали за счет дополнительной дериватизации по карбоксильной группе (этерификации) диазометаном. Выбор диазометана как этерифицирующего реагента был обусловлен необходимостью проведения реакции этерификации в мягких условиях, исключающих изотопный (¹H–²H) обмен в ароматическом фрагменте молекулы фенилаланина.

В масс-спектре ЭУ метилового эфира N-Dns-фенилаланина, показанного на рис. 4, где использовали обычную воду и метанол, как правило, четко детектируется пик молекулярного иона метилового эфира N-Dns-фенилаланина ($m/z = 412$). Пик аминного фрагмента А ($m/z = 353$) имеет невысокую интенсивность, а пик аминокислотного фрагмента В ($m/z = 381$) – крайне низкую или вообще отсутствует (рис. 4). Кроме вышеобозначенных пиков, в масс-спектрах ЭУ метилового эфира N-Dns-фенилаланина фиксируются пики с массовыми числами $m/z = 250, 234, 170$, которые соответствуют дансильному фрагменту и продуктам его распада до N-диметиламинафталина. Наряду с фенилаланином и его дейтерированным аналогом в масс-спектрах ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот в составе КЖ штамма производителя фиксировались пики молекулярных ионов (M⁺) сопутствующих аминокислот – аланина ($m/z = 336$), валина ($m/z = 364$) и лейцина/изолейцина ($m/z = 378$), фрагментация которых методом масс-спектрометрии ЭУ позволят проводить масс-спектрометрический мониторинг аминокислот в составе интанктных КЖ штамма-производителя, содержащих смеси аминокислот и других метаболитов среды до стадии их хроматографического разделения.

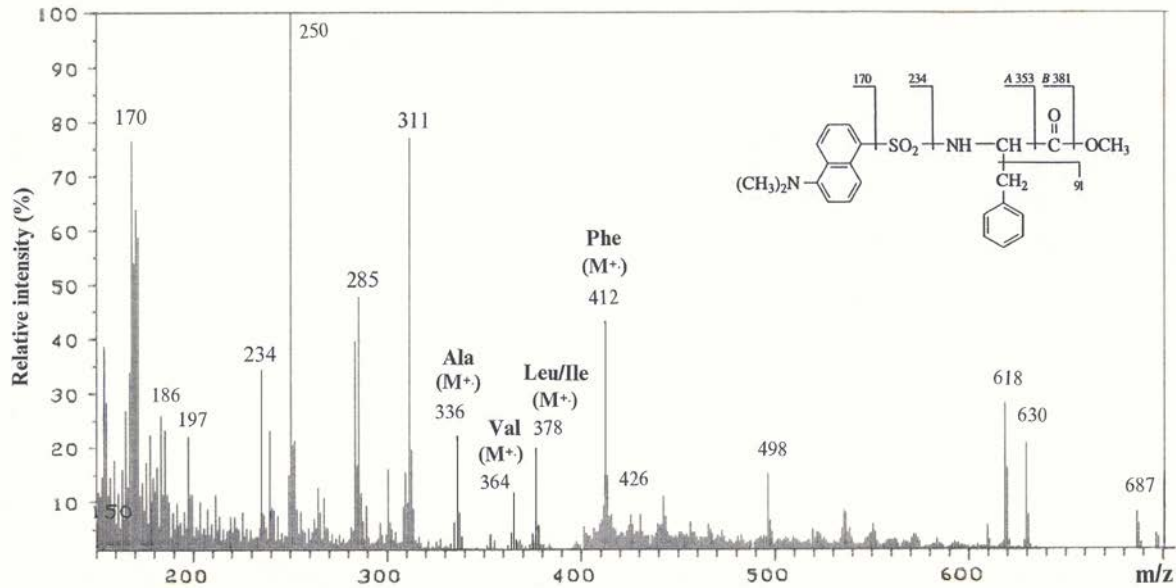


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном и фрагментация метилового эфира N-Dns-фенилаланина методом ЭУ. Условия выращивания: 2 % метанол и H₂O (контрольные условия). Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов (M⁺) метиловых эфиров N-Dns-аминокислот. Интенсивность пиков приведена в %.

Контроль за включением дейтерия в молекулу [²H]фенилаланина за счет конверсии дейтерометанола при росте бактерий в среде, содержащей обычную воду и 2 % [²H]метанол (соответствуют опыту 2, табл. 1) показал незначительное количество дейтерия, поступающее в молекулу фенилаланина вместе с углеродом C²H₃O²H. Уровень дейтерированности фенилаланина был вычислен по величине пика M⁺ ($m/z = 413$) за вычетом вклада пика примеси природного изотопа дейтерия (не более 5 %). Полученный результат объясняется разбавлением дейтериевой метки за счёт протекания биохимических процессов, связанных с распадом C²H₃O²H при его ассимиляции клеткой, так и реакциями изотопного (¹H–²H) обмена и диссоциации в ²H₂O. Так, из четырех атомов дейтерия в молекуле C²H₃O²H, лишь один атом дейтерия при гидроксильной O²H-группе самый подвижный и поэтому легко диссоциирует в водной среде с образованием C²H₃OH. Три оставшихся атома дейтерия в молекуле C²H₃OH входят в цикл ферментативного окисления метанола, который приводит к потере дейтериевой метки за счёт образования соединений более окисленных, чем метанол. В частности, такое включение дейтерия в молекулу [²H]фенилаланина подтверждает классическую схему ферментативного окисления метанола до формальдегида в клетках метилотрофов, который после этого ассимилируется у данного штамма метилотрофных бактерий РМФ-путем фиксации углерода.

Биосинтетически синтезированный [²H]фенилаланин, полученный на средах с различной концентрацией ²H₂O, представлял собой смесь изотопнозамещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пик молекулярного иона фенилаланина (M⁺) полиморфно расщеплялся на отдельные кластеры с примесью молекул со статистическим набором массовых чисел m/z с различным вкладом в суммарный уровень дейтерированности молекулы. Его расчет проводился по усредненной величине наиболее интенсивного пика молекулярного иона (M⁺) (пик с наибольшим вкладом в уровень дейтерированности), зарегистрированным в данных условиях масс-спектрометром. Так, из масс-спектра ЭУ метиловых эфиров Dns-[²H]аминокислот КЖ, полученной со среды, содержащей 49 % ²H₂O (рис. 5) видно, что молекула [²H]фенилаланина содержит шесть изотопнозамещенных форм со средним значением величины пика молекулярного иона (M⁺) с $m/z = 414$, который возрастает по сравнению с контрольными условиями (рис. 4, (M⁺) с $m/z = 412$) на 2 единицы, т. е. 27,5 % от общего количества атомов водорода в молекуле замещены на дейтерий. Уровни включения

дейтерия в молекулы сопутствующих фенилаланину аминокислот – аланина, валина и лейцина/изолейцина, рассчитанные по разнице величин пиков молекулярных ионов дейтерированных и протонированных производных, составили 3 (50 %), 4 (50 %) и 5 (50 %) атомов дейтерия соответственно. Область масс-спектра ЭУ со значениями m/z 90–300 соответствует продуктам дериватизации метаболитов ростовой среды дансилхлоридом и диазометаном. Низкоинтенсивный пик $m/z = 431$, зафиксированный в масс-спектре ЭУ и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования $[^2\text{H}]$ фенилаланина по α -NH-(Dns)-группе. Пик $m/z = 400$ (рис. 5) отвечает продукту отщепления метильной CH_3 -группы от дейтерированного метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина.

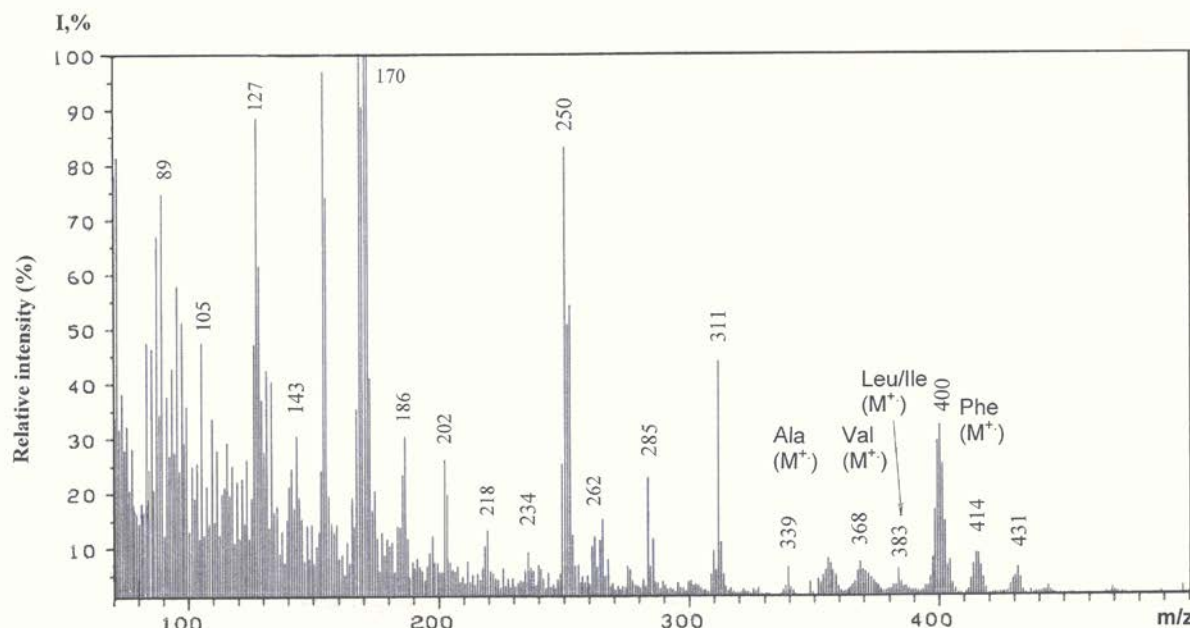


Рис. 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % $[^2\text{H}]$ метанол и 49,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$.

Аналогичный результат по специфическому увеличению уровней включения дейтерия в молекулу фенилаланина наблюдался во всех опытах, где использовали увеличивающиеся концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде. При выращивании *B. methylicum* в среде, содержащей 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ в молекулу $[^2\text{H}]$ фенилаланина включается четыре атома дейтерия (50 % атомов водорода в молекуле), о чем свидетельствует присутствие в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина из образца КЖ *B. methylicum*, полученной на среде с 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 6) пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина (M^+ , $m/z = 416$) (вместо M^+ , $m/z = 412$ в контрольных условиях (рис. 4)). В молекулы сопутствующих $[^2\text{H}]$ аминокислот – $[^2\text{H}]$ аланина, $[^2\text{H}]$ валина и $[^2\text{H}]$ лейцина/ $[^2\text{H}]$ изолейцина в этих условиях включились три (55 %), четыре (50 %) и пять (50 %) атомов дейтерия соответственно. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу 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 $[^2\text{H}]$ аминокислот, которые замещаются за счёт лёгкости диссоциации в H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$).

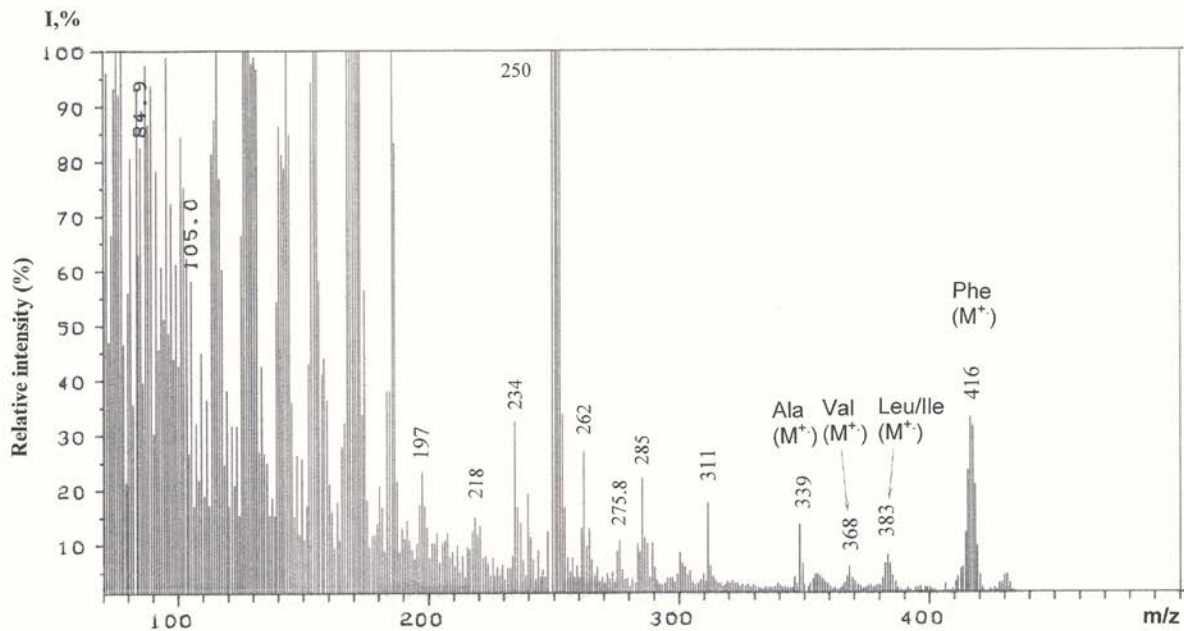


Рис. 6. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$.

Во всех опытах наблюдалось пропорциональное возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулу [^2H]фенилаланина и молекулы сопутствующих [^2H]фенилаланину [^2H]аминокислот при ступенчатом увеличении концентраций тяжелой воды в ростовых средах (табл. 2). Как ожидалось, уровни включения дейтерия в молекулы метаболически близких [^2H]аминокислот семейства пирувата – [^2H]аланина, [^2H]валина и [^2H]лейцина при одинаковых концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах коррелируют между собой. Такой результат зафиксирован во всех изотопных экспериментах с $^2\text{H}_2\text{O}$ (табл. 2).

Таблица 2

Уровни включения дейтерия (%) в молекулы секретируемых [^2H]аминокислот *B. methylicum (данные получены для метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот)**

[^2H]аминокислота	Содержание $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде, об.%**			
	24,5	49,0	73,5	98,0
Аланин	24,0±0,70	50,0±0,89	55,0±0,83	55,0±1,13
Валин	20,0±0,72	50,0±0,88	50,0±0,72	62,5±1,40
Лейцин/изолейцин	20,0±0,90	50,0±1,38	50,0±1,37	50,0±1,25
Фенилаланин	17,0±1,13	27,5±0,88	50,0±1,12	75,0±1,40

* При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH - и NH_2 -группах аминокислот не учитывались из-за легкости изотопного (^1H – ^2H) обмена.

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

В условиях ауксотрофности по лейцину, который добавляли в ростовые среды в протонированном виде, уровни включения дейтерия в молекулы [^2H]аминокислот семейства пирувата, к которым относится аланин, валин и лейцин ниже, чем для фенилаланина (табл. 2). Отмеченная особенность отчетливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$. Данный результат подтвердил рис. 7, где показан масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот при выращивании бактерий *B. methylicum* в среде с 2 % [^2H]метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. Величина пика молекулярного иона метилового эфира

N-Dns-[^2H]фенилаланина (M^+ , $m/z = 418$) увеличивается по сравнению с контрольными условиями (M^+ , $m/z = 412$, рис. 4) на шесть единиц, что соответствует замещению 75 % атомов водорода на дейтерий от общего количества атомов водорода в молекуле [^2H]фенилаланина. В отличие от [^2H]фенилаланина уровни включения дейтерия в [^2H]аланин составили 3 (55 %), [^2H]валин – 5 (62,5 %), в [^2H]лейцин/[^2H]изолейцин – 5 (50 %) атомов дейтерия. Таким образом, в отличие от [^2H]фенилаланина, уровни включения дейтерия в сопутствующие [^2H]фенилаланину [^2H]аминокислоты – аланин, валин и лейцин/изолейцин сохраняют стабильное постоянство в широком интервале концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$: от 49 % до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (табл. 2). Пик $m/z = 432$, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот КЖ на рис. 7 соответствует продукту дополнительного метилирования [^2H]фенилаланина по $\alpha\text{-NH}_2$ -группе. Кроме этого, в масс-спектре ЭУ фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [^2H]фенилаланина с $m/z = 97$ (вместо $m/z = 91$ в контроле), что указывает на то, что местами локализации 6 атомов дейтерия в молекуле [^2H]фенилаланина являются положения С1–С6 ароматических протонов в бензильном $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагменте. Из масс-спектрометрических данных следует, что при других концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ дейтерий также включается в ароматическое кольцо [^2H]фенилаланина, так как метаболизм адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений в $^2\text{H}_2\text{O}$. Полученный результат важен для его дальнейшего использования в медицинской диагностике, где необходимо использовать [^2H]аминокислоты с высокими уровнями изотопного обогащения.

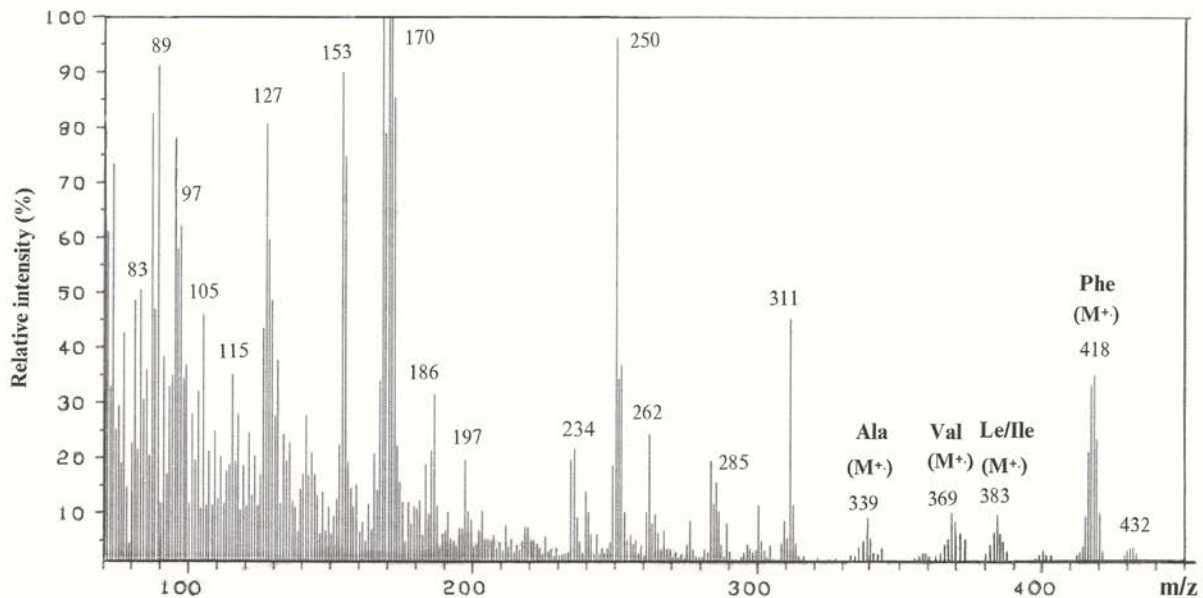


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (максимально дейтерированная среда).

Суммируя полученные данные по уровням включения дейтерия в молекулы [^2H]фенилаланина и сопутствующих [^2H]фенилаланину [^2H]аминокислот, можно сделать вывод о сохранении минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом лейцина и метаболически родственных с ним аминокислот семейства пирувата – аланина и валина, уровни дейтерированности которых в пределах одинаковых концентраций H_2O находятся в корреляции (фенилаланин относится к семейству ароматических аминокислот, синтезируемых из шикимовой кислоты). Другим объяснением наблюдаемого эффекта, если принять во внимание происхождение лейцина и изолейцина по различным путям биосинтеза (изолейцин принадлежит к семейству аспартата), может быть ассимиляция клеткой немеченого лейцина из ростовой среды на фоне биосинтеза [^2H]изолейцина *de novo*. Учитывая эти данные, следует подчеркнуть, что для достижения более высокого

уровня дейтерированности конечного продукта биосинтеза необходимо контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов.

Заклучение.

В результате использованного в работе селекционного подхода удалось адаптировать *L*-фенилаланин продуцирующий штамм аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* к высокому содержанию $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде для препаративного микробиологического синтеза [^2H]фенилаланина различного уровня дейтерированности, включая максимально дейтерированный [^2H]фенилаланин. Преимуществами данного штамма для синтеза [^2H]фенилаланина являются его улучшенные ростовые и биосинтетические характеристики на максимально дейтерированной среде. За счет его использования удалось выделить 0,65 г чистого [^2H]фенилаланина (75 % ^2H) из 1 л максимально дейтерированной среды.

Примечания:

1. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / D.M. LeMaster // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1990. Vol. 19, № 2. P. 243–266.

2. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1999. Vol. 77, № 2. P. 79–88.

3. Crespi H.L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins // in: *Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds: Proceedings of 2nd International Symposium* / Ed. R.R. Muccino. Kansas City, Missouri, USA., 3–6 September 1985. Amsterbam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier, 1986. P 111–112.

4. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment / P. MacCarthy // *J. Chem. Educ.* 1986. Vol. 62, № 7. P. 633–638.

5. Мосин О.В. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот бактериальных объектов / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, В.И. Швец // *Биоорг. Хим.* 1996. Т. 22, № 10–11. С. 856–869.

6. Ignatov I. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Bacillus subtilis* in heavy water as model system / I. Ignatov, O.V. Mosin // *Journal of Natural Sciences Research.* 2013. Vol. 83, № 8. P. 132–139.

7. Складнев Д.А. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых ^2H - и ^{13}C -аминокислот / Д.А. Складнев, О.В. Мосин, Т.А. Егорова, С.В. Еремин, В.И. Швец // *Биотехнология.* 1996. № 5. С. 25–34.

8. Мосин О.В. Изучение методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C и ^{15}N с высокими степенями изотопного обогащения: автореф. дисс. ...канд. хим. наук: Москва, МГАТХТ им. М.В. Ломоносова, 1996. 26 с.

9. Dewick P.M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach / Ed. P.M. Dewick. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 161 p.

10. Karnaukhova E.N. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* / E.N. Karnaukhova, O.V. Mosin, O.S. Reshetova // *Amino Acids.* 1993. Vol. 5, № 1. P. 125.

11. Мосин О.В. Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* при росте на средах, содержащих тяжелую воду и дейтерометанол / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, А.М. Юркевич, В.И. Швец // *Биотехнология.* 1996. № 3. С. 3–12.

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

13. Mosin O.V. 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* / O.V. Mosin, I. Ignatov // *International Journal of Biomedicine.* 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.

14. de Boer L. Phenylalanine and tyrosine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia sp.* 239 / L. de Boer, W. Harder, L. Dijkhuizen // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 149. P. 459–465.
15. Herrmann K.M. The shikimate pathway / K.M. Herrmann, L.M. Weaver // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1999. Vol. 50. P. 473–503.
16. Wendisch V.F. Amino acid biosynthesis – pathways, regulation and metabolic engineering / Ed. F. Volker. Helderberg: Springer Verlag. 2007. P. 237–240.
17. Abou-Zeid A. Biosynthesis of L-phenylalanine and L-tyrosine in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica* / A. Abou-Zeid, G. Euverink, G.I. Hessels, R.A. Jensen, L. Dijkhuizen // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 4. P. 1298–302.
18. Mosin O.V. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 1998. Vol. 62, № 2. P. 225–229.
19. Мосин О.В., Игнатов И. Изотопные эффекты дейтерия в клетках бактерий и микроводорослей при росте на тяжелой воде (D_2O) / О.В. Мосин, И. Игнатов // Вода: Химия и Экология. 2012. № 3. С. 83–94.
20. Maksimova N.P. Regulation of phenylalanine biosynthesis in the obligate methylotroph *Methylobacillus M75* / N.P. Maksimova, E.V. Dobrozhinetskaia, Yu.K. Fomichev // Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 1990. № 10. P. 28–30.

References:

1. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / D.M. LeMaster // Annu. Rev. Biophys. Chem. 1990. Vol. 19, № 2. P. 243–266.
2. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. Vol. 77, № 2. P. 79–88.
3. Crespi H.L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins // in: Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds: Proceedings of 2nd International Symposium / Ed. R.R. Muccino. Kansas City, Missouri, USA., 3–6 September 1985. Amsterbam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier, 1986. P 111–112.
4. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment / P. MacCarthy // J. Chem. Educ. 1986. Vol. 62, № 7. P. 633–638.
5. Mosin O.V. Mass-spectrometric determination of levels of enrichment of ^2H and ^{13}C in molecules of amino acids of various bacterial objects / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, V.I. Shvets // Bioorganic Chemistry. 1996. Vol. 22, № 10–11. P 856–869.
6. Ignatov I. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Bacillus subtilis* in heavy water as model system / I. Ignatov, O.V. Mosin // Journal of Natural Sciences Research. 2013. Vol. 83, № 8. P. 132–139.
8. Mosin O.V. Studying of methods of biotechnological preparation of proteins, amino acids and nucleosides, labeled with stable isotopes ^2H , ^{13}C and ^{15}N with high levels of isotopic enrichment: autoref. disser. thesis Ph D: Moscow, M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology. 1996. 26 p.
9. Dewick P.M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach / Ed. P.M. Dewick. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 161 p.
10. Karnaukhova E.N. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* / E.N. Karnaukhova, O.V. Mosin, O.S. Reshetova // Amino Acids. 1993. Vol. 5, № 1. P. 125.
11. Mosin O.V. Studying of biosynthesis of amino acids by the strain of *Brevibacterium methylicum* at growth on media, containing heavy water and deuteromethanol / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, A.M. Yurkevich, V.I. Shvets // Biotechnologija. 1996. № 3. P. 3–12.
12. Mosin O.V. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultive methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. Vol. 7, № 3. P. 249-260.
13. Mosin O.V. 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* / O.V. Mosin, I. Ignatov // International Journal of Biomedicine. 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.

14. de Boer L. Phenylalanine and tyrosine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia* sp. 239 / L. de Boer, W. Harder, L. Dijkhuizen // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 149. P. 459–465.

15. Herrmann K.M. The shikimate pathway / K.M. Herrmann, L.M. Weaver // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1999. Vol. 50. P. 473–503.

16. Wendisch V.F. Amino acid biosynthesis – pathways, regulation and metabolic engineering / Ed. F. Volker. Helderberg: Springer Verlag. 2007. P. 237–240.

17. Abou-Zeid A. Biosynthesis of L-phenylalanine and L-tyrosine in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica* / A. Abou-Zeid, G. Euverink, G.I. Hessels, R.A. Jensen, L. Dijkhuizen // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 4. P. 1298–302.

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

19. Mosin O.V. Isotope effects of deuterium in bacterial and microalgae cells at growth on heavy water (D₂O) / O.V. Mosin, I. Ignatov // Water: Chemistry and Ecology. 2012, № 3. P. 83–94.

20. Maksimova N.P. Regulation of phenylalanine biosynthesis in the obligate methylotroph *Methylobacillus M75* / N.P. Maksimova, E.V. Dobrozhinetskaia, Yu.K. Fomichev // Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 1990. № 10. P. 28–30.

УДК 579.871.08+577.385.4.08

Использование факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* B-5652 с РМФ-циклом ассимиляции углерода для микробиологического синтеза [²H]фенилаланина разного уровня дейтерированности

¹ Олег Викторович Мосин

² Игнат Игнатов

³ Дмитрий Анатольевич Складнев

⁴ Виталий Иванович Швец

¹ Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация

Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук

103316, Москва, ул. Талалихина, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

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

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

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

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

Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник ГосНИИГенетика

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1.

E-mail: genetika@genetika.ru

⁴ Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация

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

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

Аннотация. С использованием штамма аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* B-5652,

ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) циклу ассимиляции углерода осуществлен препаративный микробиологический синтез фенилаланина и метаболически связанных с ним аминокислот (аланин, валин, лейцин/изолейцин в количестве 5–6 ммоль/л), меченных дейтерием (^2H). Представлены данные по адаптации штамма *B. methylicum* к максимальной концентрации дейтерия в среде культивирования М9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом и биосинтезу [^2H]фенилаланина разного уровня дейтерированности. Разработанный метод микробиологического синтеза позволяет получать [^2H]фенилаланин разного уровня дейтерированности в зависимости от концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах М9: от 17 % (2 атома дейтерия) (на среде с 24,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$) до 75 % (6 атомов дейтерия) (на среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$) с включением дейтерия в бензильный $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмент молекулы, что подтверждено данными масс-спектрометрического анализа электронного удара (ЭУ) метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных [^2H]фенилаланина, выделенных из КЖ штамма-продуцента после разделения методом ОФ ВЭЖХ.

Ключевые слова: *Brevibacterium methylicum*; L-фенилаланин; биосинтез; тяжелая вода; масс-спектрометрия ЭУ; ОФ ВЭЖХ.