

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 579.871.08+577.385.4.08

©Коллектив авторов

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ^2H -МЕЧЕННОГО L-ФЕНИЛАЛАНИНА РАЗНОГО УРОВНЯ ДЕЙТЕРИРОВАННОСТИ ФАКУЛЬТАТИВНОЙ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ *BREVIBACTERIUM METHYLICUM* С РМФ-ЦИКЛОМ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА

О.В. Мосин^{1*}, В.И. Швец¹, Д.А. Складнев², И. Игнатов³

¹Московский государственный университет

тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова,

117571, Москва, пр. Вернадского, 86; эл. почта: mosin-oleg@yandex.ru

²Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

³Научно-исследовательский центр медицинской биофизики,
Болгария, 1111, София, ул. Н. Коперника, 32

На примере *L*-фенилаланинсекретирующего штамма аэробных грамотрицательных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) циклу ассимиляции углерода, продолжены исследования по биотехнологическому использованию метилотрофных бактерий для препаративного микробного синтеза аминокислот для биомедицинской диагностики, меченных стабильными изотопами, в том числе дейтерием (^2H). Представлены данные по адаптации штамма *B. methylicum* к максимальной концентрации дейтерия в среде культивирования с 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2% [^2H]метанолом и биосинтезу дейтерий-меченного *L*-фенилаланина разного уровня дейтерированности. Исходный штамм адаптирован к $^2\text{H}_2\text{O}$ посредством посева клеток на твердые (2% агар) минимальные среды с увеличивающимся градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$: от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ и последующей селекции отдельных устойчивых к $^2\text{H}_2\text{O}$ колоний клеток, способных продуцировать *L*-фенилаланин. *L*-фенилаланин был выделен из культуральной жидкости экстракцией изопропанолом с последующей перекристаллизацией в этаноле (выход 0,65 г/л). Разработанный метод микробного синтеза позволяет получать дейтерий-меченный *L*-фенилаланин разного уровня дейтерированности в зависимости от концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде: от 17% (на среде с 24,5% $^2\text{H}_2\text{O}$) до 75% (на среде с 98% $^2\text{H}_2\text{O}$) дейтерия в молекуле, что подтверждено данными масс-спектрометрического анализа электронного удара (ЭУ) метиловых эфиров *N*-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных фенилаланина, выделенных из культуральной жидкости штамма-продуцента в различных экспериментальных условиях.

Ключевые слова: *Brevibacterium methylicum*, *L*-фенилаланин, биосинтез, тяжёлая вода, масс-спектрометрия ЭУ.

ВВЕДЕНИЕ

Метод мечения природных соединений стабильными изотопами водорода (^2H), углерода (^{13}C), азота (^{15}N) и кислорода (^{18}O) является ключевым направлением в различных биомедицинских исследованиях

с использованием молекул аминокислот и других биологически активных соединений (БАС) [1, 2]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов в клинической диагностике по сравнению с радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности

* - адресат для переписки

и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения, включая спектроскопию ЯМР [3], ИК [4] и масс-спектрометрию (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, что важно для медицинских исследований и клинической диагностики [6]. Аминокислоты, меченные стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , широко применяются как во врачебной практике и в медицинской диагностике, так и в биохимических исследованиях разнообразного характера, включая метаболизм [7], а также в химических синтезах целого ряда изотопно-меченных БАС 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 микробного синтеза [^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 15,517,3 г сух. биомассы на 1 г потреблённого субстрата) метилотрофные бактерии рассматриваются как дешёвые 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 штаммов-продуцентов аминокислот на средах, содержащих [^2H]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$ с последующим фракционированием КЖ с целью выделения аминокислот [11]. Ранее нами сообщалось о получении штамма аэробных грамотрицательных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* для микробного синтеза *L*-фенилаланина [12]. В отличие от традиционных штаммов-продуцентов *L*-фенилаланина, у которых нарушены активности префенатдегидратазы или дезоксиарабиногептулозофосфатсинтазы, уникальность выделенного нами штамма состоит в том, что для биосинтеза *L*-фенилаланина необходим *L*-лейцин.

Целью данной работы было изучение принципиальной возможности микробного синтеза дейтерированного *L*-фенилаланина с высокими уровнями изотопного обогащения за счёт выращивания штамма грамотрицательных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, продуцента *L*-фенилаланина на средах с различными концентрациями тяжёлой воды (от 24,5% до 98% $^2\text{H}_2\text{O}$).

МЕТОДИКА

Объектом исследования являлся *L*-лейцин-зависимый (потребность в лейцине 0,01 г/л) штамм аэробных грамотрицательных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) В 5652, 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% ^2H), ^2HCl (95,5% ^2H) и [^2H]метанол (97,5% ^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", ФРГ).

Условия адаптации и выращивания

Адаптацию штамма к дейтерию проводили рассевом до отдельных колоний и последующей селекцией на твёрдых (2%-ный агар) минимальных средах М9 с добавками 2%-ного 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.% $^2\text{H}_2\text{O}$, здесь и далее использованы % по объёму; 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 твёрдых 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°C 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 клетки отделяли центрифугированием 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 L-фенилаланина и сопутствующих аминокислот.

Синтез N-Dns-аминокислот

К 200 мг лиофилизованной КЖ в 5 мл 2 М NaHCO_3 ($2 \cdot 10^{-3}$ моль), pH 9-10 порциями при перемешивании добавляли 320 мг ($1,2 \cdot 10^{-3}$ моль) дансилхлорида в 5 мл

ацетона. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при 40°C в течение часа, затем подкисляли 2 М раствором HCl до pH 3,0 и экстрагировали этилацетатом (3 раза по 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до значения pH 7,0, сушили безводным Na_2SO_4 , растворитель удаляли при 10 мм. рт. ст.

Синтез метиловых эфиров N-Dns-аминокислот

К 20 мл 40%-ного КОН в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течение 15-20 мин. После интенсивного газовыделения эфирный слой отделяли и промывали ледяной водой до pH 7,0, сушили безводным Na_2SO_4 и обрабатывали им N-Dns-производные аминокислот в составе КЖ штамма продуцента.

Аналитическое и препаративное разделение метиловых эфиров N-Dns-аминокислот

Разделение метиловых эфиров N-Dns-аминокислот проводили методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer ("Knauer", ФРГ), снабжённым УФ-детектором и интегратором С-Р 3А ("Shimadzu", Япония). В качестве неподвижной фазы использовали Separon SGX C, 18,7 мкм, 150×3,3 мм ("Kova", Словакия). Элюирование проводили в системе растворителей: (А) – ацетонитрил – трифторуксусная кислота = 20 : 80, об.% и (В) – ацетонитрил = 100 об.%. Использовали градиентное элюирование: от 20% В до 100% В в течение 30 мин; при 100% В в течение 5 мин; от 100% В до 20% В в течение 2 мин; при 20% В в течение 10 мин.

Аналитическое определение L-фенилаланина

Определение L-фенилаланина проводили в пробах КЖ, объёмом 10 мкл на хроматографических пластинках (150×150 мм) с закреплённым слоем флуоресцентного носителя Silufol UV-254 (Чехия) в системах растворителей: n-бутанол : ледяная уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 5, об.% и изопропанол : аммиак = 7 : 3, об.%. Элюцию пятен проводили 0,1 М HCl после обработки 0,5%-ным раствором нингидрина в n-бутаноле. Поглощение элюатов определяли при $\lambda=540$ нм на приборе Beckman DU-6, используя стандартную калибровочную кривую.

Выделение *L*-фенилаланина

Биомассу *B. methylicum*, полученную после выращивания в максимально дейтерированной среде М9 с 2% [^3H]метанолом и 98% $^2\text{H}_2\text{O}$, отделяли от КЖ центрифугированием 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 ^3HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$ и выдерживали при 20°C в течение 4 ч. 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 *L*-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 $^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; масс-спектр ЭУ (70 эВ, 180-200°C): (M $^{+}$) m/z (I,%): 418 (35%), 250 (95%), 234 (21%), 170 (100%), 97 (62%).

Масс-спектры электронного удара (ЭУ)

Масс-спектры метиловых эфиров N-Dns-аминокислот получены на приборе “MB-80A” (“Hitachi”, Япония) с двойным фокусированием, снабжённым комбинированным вакуумным электронным катодным термоисточником (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, температура катодного источника 180-200°C). Расчёт уровней дейтерирования молекул фенилаланина и сопутствующих аминокислот, выделенных с $^2\text{H}_2\text{O}$ -содержащих сред, проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов M $^{+}$ производных аминокислот и контрольных аминокислот, полученных в обычной воде.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы статистического пакета STATISTICA 6, используя t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство распространённых в природе микроорганизмов, как известно, 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]. Как правило, эффективными микробными продуцентами *L*-фенилаланина являются мутанты, у которых отсутствует негативный контроль со стороны таких ключевых ферментов биосинтеза этой аминокислоты, как префенатдегидратаза и дезоксиарабиногептулозофосфатсинтетаза. Фенилаланин синтезируется в клетке из общих предшественников ароматических аминокислот – фосфоенолпирувата (PEP) и эритрозо-4-фосфата (E4P) через стадии образования шикимовой, хоризмовой и префеновой кислоты (рис. 1). Основными промежуточными продуктами катаболизма фенилаланина и метаболически связанного с ним тирозина у различных организмов выступают фумарат, пируват, сукцинат, ацетальдегид и др. [14].

Основным метаболическим превращением фенилаланина у животных и человека является ферментативное гидроксирование этой аминокислоты с образованием тирозина [15]. При наследственном заболевании фенилкетонурии превращение фенилаланина в тирозин нарушено, и в организме происходит накопление фенилаланина и его метаболитов (фенилпируват, фениллактат, фенилацетат, орто-гидроксифенилацетат), избыточное количество которых отрицательно сказывается на развитии нервной системы [16].

Определённый интерес в связи с этим представляет исследование способности продуцировать *L*-фенилаланин лейцинзависимым граммотрицательным факультативным метилотрофным мутантом *B. methylicum*, ассимилирующим метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) циклу 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* – 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. Скрининг нужных клонов проводили по признаку устойчивости к аналогу фенилаланина – мета-фторфенилаланину (50 мкг/мл). Выделенные на селективных средах аналогорезистентные 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.

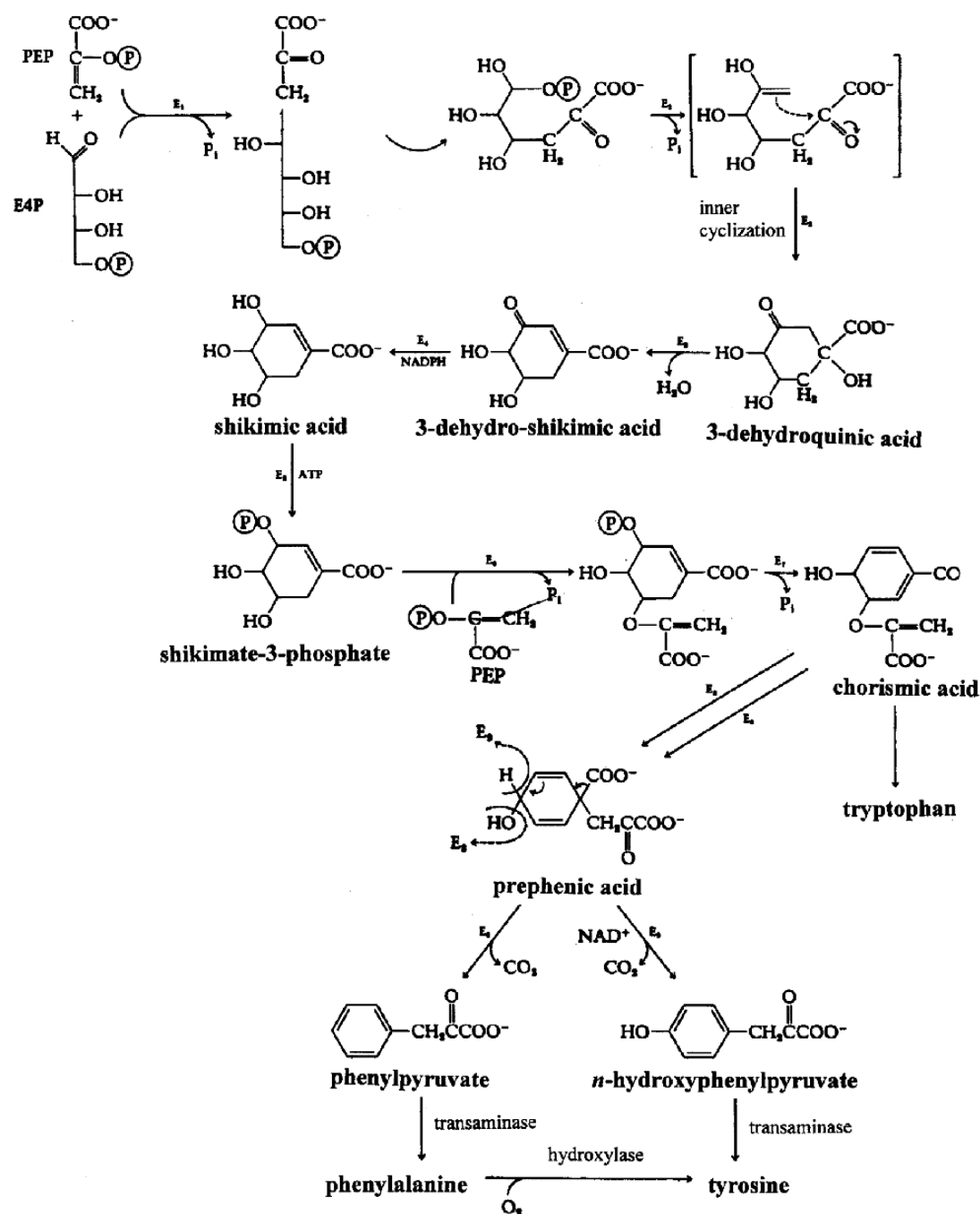


Рисунок 1. Биосинтез ароматических аминокислот - фенилаланина, тирозина и триптофана из общих предшественников фосфоенолпирувата (PEP) и эритрозо-4-фосфата (E4P) микробной клеткой (адаптировано из [14]).

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ³H-МЕЧЕННОГО L-ФЕНИЛАЛАНИНА В. METHYLICUM

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 ²H₂O и [²H]метанолом. Для адаптации клеток к ²H₂O использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации ²H₂O, 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 твёрдыми агаризованными средами М9 с 2%-ным агаром при ступенчатом увеличении концентрации тяжёлой воды в них (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98% ²H₂O) и последующей селекции устойчивых к ²H₂O колоний клеток, как показано в таблице 1. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации ²H₂O колонии переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98% ²H₂O. На конечном этапе на среде с 98% ²H₂O были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию ²H₂O (степень выживаемости клеток на конечной полностью дейтерированной среде составила 40%). Затем их переносили в жидкую минимальную среду М9, приготовленную на основе 98% ²H₂O и 2% [²H]метанола, и выращивали в течение 3-4 суток при 35°C.

Как показали эксперименты, замена протонированного метанола [²H]метанолом при одинаковых концентрациях ²H₂O 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 ²H₂O и [²H]метанолом. На контрольной протонированной среде М9 (1) 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 ²H₂O 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% ²H₂O и 2% [²H]метанолом (табл. 1, опыт 10). С увеличением концентрации ²H₂O 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 ²H₂O в ростовых средах постепенно увеличивается, достигая 4,9 ч на среде с 98% ²H₂O и 2% [²H]метанолом (табл. 1, опыт 10). В отличие от ²H₂O, [²H]метанол не вызывал существенного ингибирования роста и не оказывал влияния на выход микробной биомассы. Напротив, на максимально дейтерированной среде выход микробной биомассы был

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 ₂ O	² H ₂ O	метанол	[² H]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±1,89	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±0,91	94,4±1,74	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±1,83	2,8±0,30

Примечание. Данные опытов 1-10 приведены для *B. methylicum* при выращивании в водных средах, содержащих 2%-ный метанол/[²H]метанол и указанное количество (%) ²H₂O. Данные опыта 10' приведены для адаптированной к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерии *B. methylicum* при выращивании на водной среде, содержащей 2% [²H]метанол и 98% ²H₂O. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

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%, то есть незначительно (табл. 1, опыт 10^3).

За ходом адаптации, условия которой показаны в опыте 10^3 (табл. 1), наблюдали, исследуя 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 (рис. 2, контроль (а) получен в протонированной среде), а также по изменению продолжительности лаг-периода, времени генерации и выходов микробной биомассы (рис. 3). В отличие от адаптированного штамма (в), рост исходного штамма (б) в максимальной дейтерированной среде ингибировался дейтерием (рис. 2).

Во всех опытах выход микробной биомассы у адаптированного штамма (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 (рис. 3). 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 данный признак стабильно сохраняется при росте в $^2\text{H}_2\text{O}$, но “маскируется” при переносе клеток в протонированную среду. В целом, улучшенные ростовые характеристики адаптированного метилотрофа существенно упрощают схему получения дейтеробиомассы, 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°C.

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)

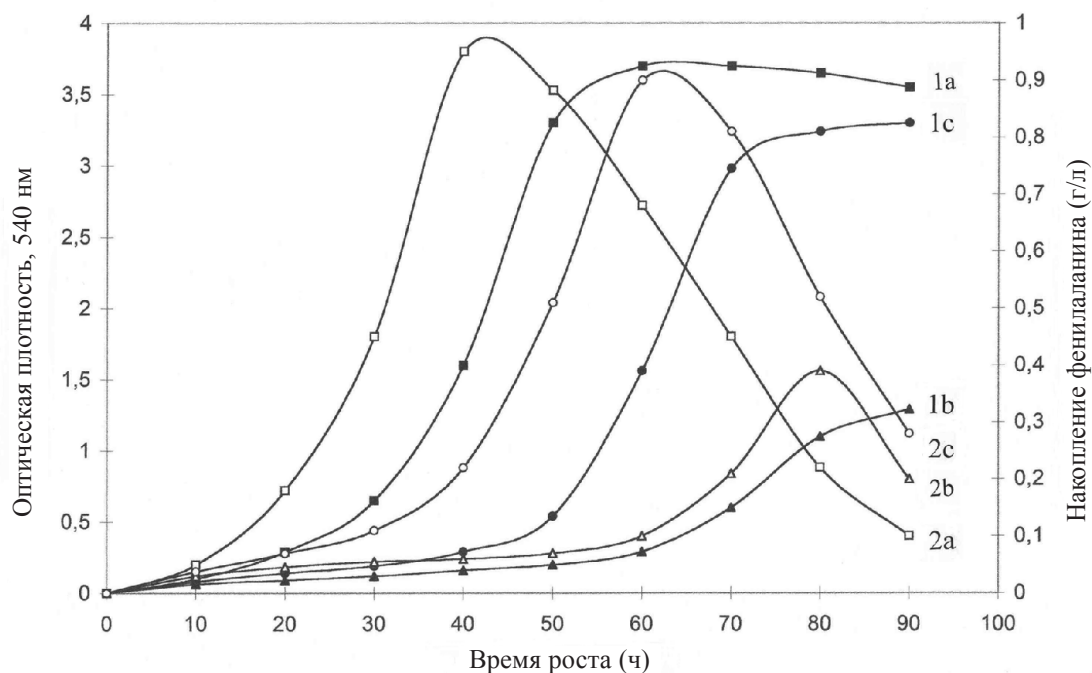


Рисунок 2. Динамики роста *B. methylicum* (1а, 1б, 1в) и накопления *L*-фенилаланина в КЖ (2а, 2б, 2в) на средах М9 с различным изотопным составом: а - исходный штамм на протонированной среде М9; б - неадаптированный штамм на полностью дейтерированной среде; в - адаптированный *B. methylicum* на полностью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

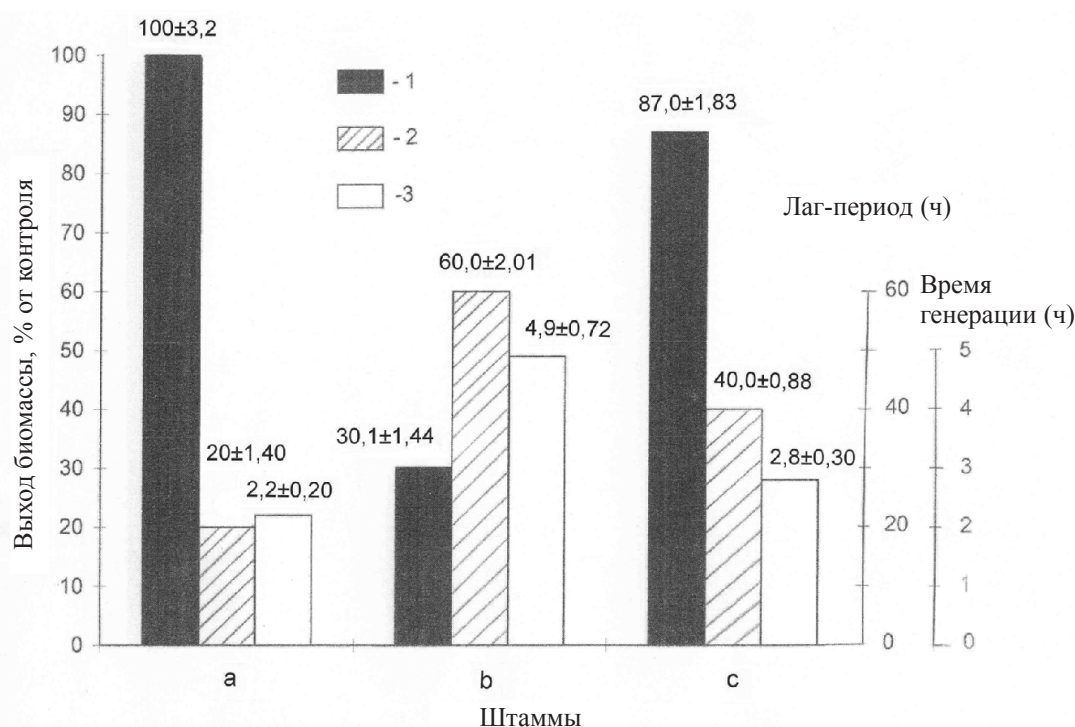


Рисунок 3. Выход биомассы *B. methylicum*, величина лаг-периода и время генерации в различных экспериментальных условиях: исходный штамм в протонированной среде М9 с обычной водой и метанолом (а); исходный штамм в максимально дейтерированной среде (б); адаптированный к дейтерию штамм в максимально дейтерированной среде М9 (в): 1 - выход биомассы, % от контроля; 2 - продолжительность лаг-периода, ч; 3 - время генерации, ч.

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. 3). ^3H фенилаланин в чистом виде был выделен экстракцией лиофилизированной при 10 мм. рт. ст. КЖ изопропанолом с последующей перекристаллизацией в этаноле.

Общей особенностью биосинтеза *L*-фенилаланина в средах $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ 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 микроскопического исследования растущей популяции микроорганизмов, характер динамики секреции *L*-фенилаланина 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 (поддержания рН на заданном уровне) 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 префеновой кислоты, которая через стадию образования фенилпирувата превращается в фенилаланин под действием клеточных трансаминаз. Данные по исследованию КЖ методом ТСХ показали, что кроме фенилаланина штамм *B. methylicum* синтезирует и накапливает в КЖ (на уровне 5-6 ммоль/л) метаболитически связанные аминокислоты (аланин, валин, лейцин/изолейцин), присутствие которых подтверждалось масс-спектрометрическим анализом ЭУ метиловых эфиров *N*-дансилхлоридных (Dns) производных аминокислот, выделенных из КЖ штамма-продуцента обращенно-фазовой ВЭЖХ.

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

N-Dns производные аминокислот получали прямой обработкой образцов лиофилизированной КЖ дансилхлоридом (DnsCl). Реакцию проводили в щелочной среде в присутствии 2 М NaHCO_3 (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, исключаящих изотопный (^1H - ^2H) обмен в ароматическом фрагменте молекулы фенилаланина.

В масс-спектре ЭУ метилового эфира N-Dns фенилаланина, показанного на рисунке 4, где использовали обычную воду и метанол, как правило, четко детектируется пик молекулярного иона метилового эфира N-Dns фенилаланина M^+ с m/z 412. Пик аминного фрагмента А с m/z 353 имеет невысокую интенсивность, а пик аминокислотного фрагмента В с m/z 381 крайне низкую или вообще отсутствует (рис. 4). Кроме отмеченных пиков, в масс-спектрах ЭУ метилового эфира N-Dns фенилаланина определяются пики с массовыми числами m/z 250, 234, 170, которые соответствуют дансильному фрагменту и продуктам его распада до N-диметиламинонафталина. Наряду с фенилаланином в масс-спектрах ЭУ метиловых эфиров N-Dns аминокислот в составе КЖ штамма продуцента определялись пики молекулярных ионов сопутствующих аминокислот – аланина (M^+ с m/z 336), валина (M^+ с m/z 364) и лейцина/изолейцина (M^+ с m/z 378), фрагментация которых методом масс-спектрометрии ЭУ позволит проводить масс-спектрометрический мониторинг [^2H]аминокислот в составе интактных КЖ штамма-продуцента, содержащих смеси аминокислот и других метаболитов среды до стадии их хроматографического разделения.

Контроль за включением дейтерия в молекулу фенилаланина за счёт конверсии дейтерометанола при росте бактерий

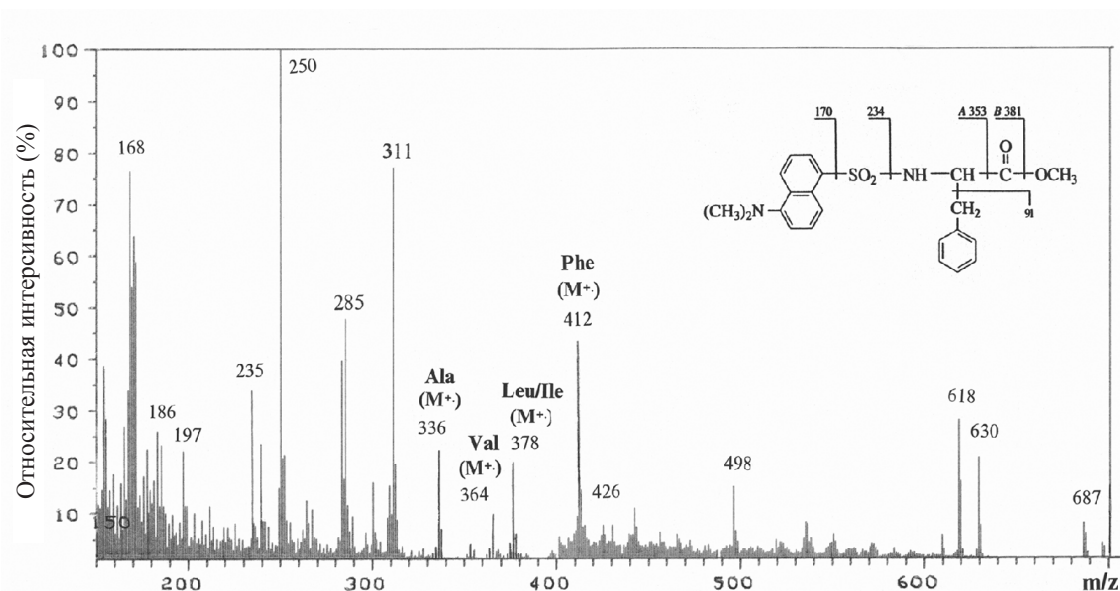


Рисунок 4. Масс-спектры ЭУ метиловых эфиров Dns-аминокислот и фрагментация метилового эфира N-Dns-фенилаланина из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном. Условия выращивания: 2%-ный метанол и H_2O . Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов (M^+) производных аминокислот. Интенсивность пиков приведена в %.

в среде, содержащей обычную воду и 2 об.% ^2H метанол (соответствуют опыту 2, табл. 1) показал незначительное количество дейтерия, поступающее в молекулу фенилаланина вместе с углеродом ^2H метанола. Уровень дейтерированности фенилаланина был вычислен по величине пика M^+ с m/z 413 за вычетом вклада пика примеси природного изотопа (не более 5%). Полученный результат объясняется разбавлением дейтериевой метки за счёт протекания биохимических процессов, связанных с распадом ^2H метанола при его ассимиляции клеткой, так и реакциями изотопного (H - ^2H) обмена и диссоциации в $^2\text{H}_2\text{O}$. Так, из четырёх атомов дейтерия в молекуле ^2H метанола, лишь один атом дейтерия при гидроксильной O^2H -группе самый подвижный и поэтому легко диссоциирует в водной среде с образованием $\text{C}^2\text{H}_3\text{OH}$. Три оставшихся атома дейтерия в молекуле $\text{C}^2\text{H}_3\text{OH}$ 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 фенилаланина подтверждает классическую схему ферментативного окисления метанола до формальдегида в клетках метилотрофов, который после этого ассимилируется у данного штамма метилотрофных бактерий РМФ-путём фиксации углерода.

Биосинтетический ^2H -меченый фенилаланин, полученный на средах с различной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$, представлял

собой смесь изотопнозамещённых форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещённых 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 расчёт проводился по усреднённой 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-аминокислот КЖ, полученной со среды, содержащей 49% $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 5) видно, что молекула фенилаланина содержит шесть изотопнозамещённых форм со средним значением величины пика молекулярного иона M^+ с m/z 414,2, который возрастает по сравнению с контрольными условиями (M^+ с m/z 412, рис. 4) на 2,2 единицы, то есть 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

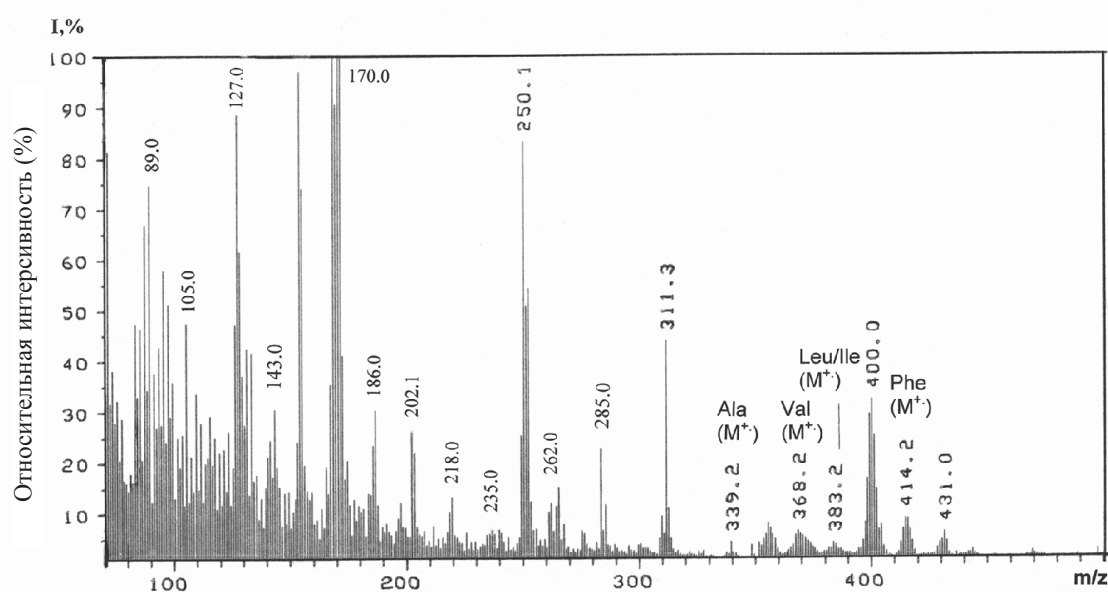


Рисунок 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2% ^2H метанол и 49,0% $^2\text{H}_2\text{O}$.

ростовой среды дансилхлоридом и диазометаном. Низкоинтенсивный пик с m/z 431,0, зафиксированный в масс-спектре ЭУ и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования фенилаланина по α -NH-(Dns)-группе. Пик с m/z 400 (рис. 5) отвечает продукту отщепления метильной CH_3 -группы от дейтерированного метилового эфира N-Dns фенилаланина.

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 фенилаланина включается четыре атома дейтерия (50% атомов водорода в молекуле), о чём свидетельствует присутствие в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-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-фенилаланина M^+ с m/z 416,1 (вместо M^+ с m/z 412 в контрольных условиях (рис. 4)). В молекулы сопутствующих аминокислот – аланина, валина и лейцина/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 счёт процесса биосинтеза *de novo*, то есть по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым относятся

протоны (дейтероны) при гетероатомах в NH_2 - и COOH - группах аминокислот, которые замещаются за счёт лёгкости диссоциации в H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$).

Во всех опытах наблюдалось пропорциональное возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулу фенилаланина и молекулы сопутствующих фенилаланину аминокислот при ступенчатом увеличении концентраций тяжёлой воды в ростовых средах (табл. 2). Как ожидалось, уровни включения дейтерия в молекулы метаболически близких аминокислот семейства пирувата – аланина, валина и 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).

В условиях ауксотрофности по лейцину, который добавляли в ростовые среды в протонированном виде, уровни включения дейтерия в молекулы аминокислот семейства пирувата, к которым относится аланин, валин и лейцин ниже, чем для фенилаланина (табл. 2). Отмеченная особенность отчётливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$. Этот результат подтверждает данные рисунка 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-фенилаланина M^+ с m/z 418 увеличивается по сравнению

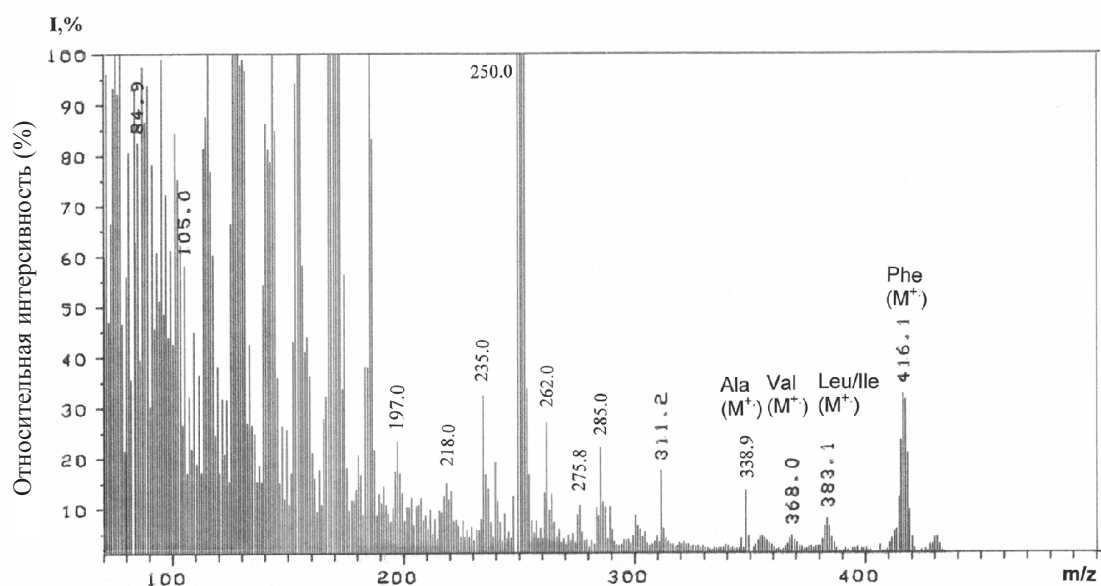


Рисунок 6. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2% [^2H]метанол и 73,5% $^2\text{H}_2\text{O}$.

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ^2H -МЕЧЕННОГО L-ФЕНИЛАЛАНИНА В. METHYLICUM

с контрольными условиями (M^+ с m/z 412, рис. 4) на шесть единиц, что соответствует замещению 75% атомов водорода на дейтерий от общего количества атомов водорода в молекуле фенилаланина. В отличие от фенилаланина уровни включения дейтерия в аланин составили 3 (55%), валин – 5 (62,5%), в лейцин/изолейцин – 5 (50%) атомов дейтерия. Таким образом, в отличие от фенилаланина, уровни включения дейтерия в сопутствующие фенилаланину 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 с m/z 432, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот КЖ, на рисунке 7 соответствует продукту дополнительного метилирования фенилаланина по $\alpha\text{-NH}_2$ -группе. Кроме этого, в масс-спектре ЭУ фиксируется пик

обогащённого дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы фенилаланина с m/z 97 (вместо m/z с 91 в контроле), что указывает на то, что местами локализации атомов дейтерия в молекуле фенилаланина являются положения C1-C6 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 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 по распределению атомов дейтерия в молекуле фенилаланина важен для его дальнейшего использования в медицинской диагностике, где необходимо использовать аминокислоты с высокими уровнями изотопного обогащения.

Таблица 2. Уровни включения дейтерия в молекулы секретируемых аминокислот *B. methylicum* (данные получены для метиловых эфиров N-Dns-аминокислот).

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

Примечание. При подсчёте уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH - и NH_2 -группах не учитывались из-за лёгкости изотопного (^1H - ^2H) обмена.

* - Данные по включению дейтерия приведены при выращивании *B. methylicum* на водных средах,

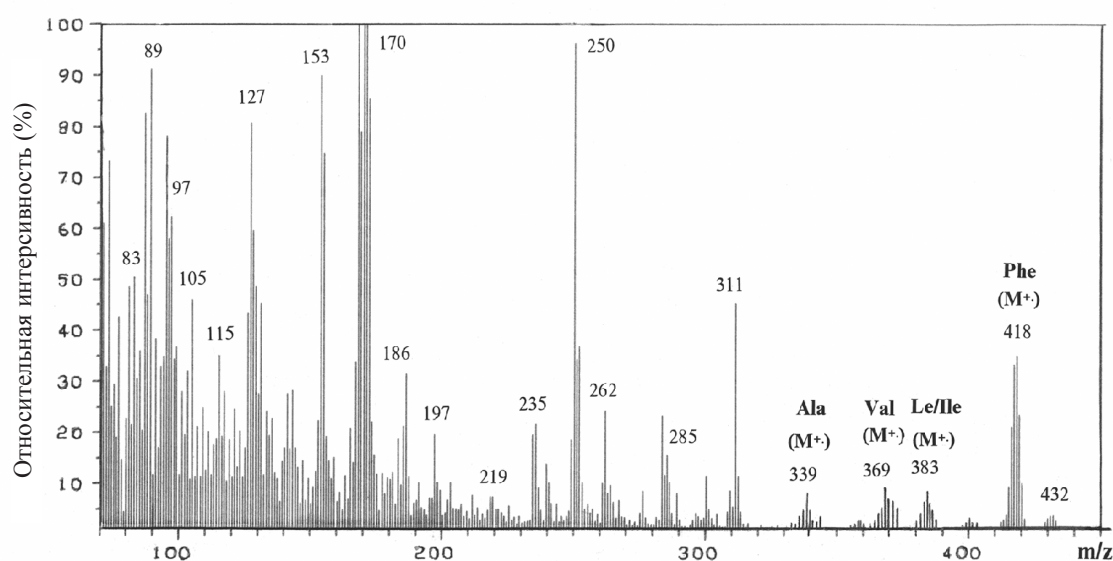


Рисунок 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот из КЖ *B. methylicum* выращивании в среде, содержащей 2% $[\text{H}]$ метанол и 98% $^2\text{H}_2\text{O}$.

Суммируя полученные данные по уровням включения дейтерия в молекулы фенилаланина и сопутствующих фенилаланину 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 $^2\text{H}_2\text{O}$ 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 меченого изолейцина *de novo*. Учитывая эти данные, следует подчеркнуть, что для достижения более высокого уровня дейтерированности конечного продукта необходимо контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов. В будущем планируется получать разработанным методом другие дейтерированные природные аминокислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате использованного в работе селекционного подхода удалось адаптировать *L*-фенилаланинпродуцирующий штамм аэробных грамотрицательных факультативных микроботрофных бактерий *B. methylicum* к высокому содержанию $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде для биосинтеза ^2H -фенилаланина различного уровня дейтерированности. Преимуществами данного штамма для микробного синтеза ^2H -фенилаланина являются улучшенные ростовые и биосинтетические характеристики на максимально дейтерированной среде в отличие от исходного неадаптированного штамма. За счёт использования адаптированного штамма *B. methylicum* удалось получить 0,65 г ^2H -фенилаланина из 1 л КЖ (фенилаланин был также выделен из КЖ *B. methylicum* методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на сорбенте Separon SGX C в системе растворителей: (А) – ацетонитрил-трифторуксусная кислота (20 : 80 об/об) и (В) – ацетонитрил (100 об.%), в виде метилового эфира *N*-Dns-фенилаланина со степенью хроматографической чистоты 97% и выходом 85%).

В заключение следует подчеркнуть, что более высокие уровни включения дейтерия в молекулу фенилаланина могут быть обеспечены за счёт замены протонированного лейцина, по которому обеспечивается ауксотрофность штамма, на его дейтерированный аналог, который можно выделять из гидролизатов суммарных белков биомассы данного штамма метилотрофных бактерий. Данные по использованию дейтерированной биомассы *B. methylicum* в качестве источника дейтерированных ростовых субстратов для биосинтеза других ^2H -природных соединений, в том числе аминокислот, углеводов и нуклеозидов будут представлены следующими исследованиями.

Настоящая работа выполнена при поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 32.

ЛИТЕРАТУРА

1. LeMaster D.M. (1990) Annu. Rev. Biophys. Chem., **19**, 243-266.
2. Vertes A. (2003) in: Elements and isotopes: formation, transformation, distribution (Vertes A. (ed.)) Kluwer Acad. Publ, Dordrecht, pp. 111–112.
3. Crespi H.L. (1986) Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins. in: Proceedings of the Second Inter. Symp. On Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds (Muccino R.R. (ed.)) Elsevier, NY, pp. 111-112.
4. MacCarthy P. (1985) J. Chem. Educ., **62**, 633-638.
5. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. (1996) Биоорган. хим., **22**, 856-869.
6. Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G. (1999) Can. J. Physiol. Pharmacol., **77**, 79–88.
7. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швец В.И. (1996) Биотехнология, №5, 25-34.
8. Мосин О.В. (1996) Исследование методов биотехнологического получения аминокислот, белков и нуклеозидов, меченных стабильными изотопами ^2H и ^{13}C с высокими уровнями изотопного обогащения. Автореф. дисс. канд. хим. наук. МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, с. 1-26.
9. Dewick P.M. (2009) in: Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach (Derwick P.M. (ed.)) 3-rd Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 137–186.
10. Karnaukhova E.N., Mosin O.V., Reshetova O.S. (1993) Amino Acids, **5**, 125.
11. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Юркевич А.М., Швец В.И. (1996) Биотехнология, №3, 3-12.

12. Мосин О.В., Карнаухова Е.Н., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Акимов О.Л. (1993) Биотехнология, №9, 16-20.
13. de Boer L., Harder W., Dijkhuizen L. (1988) Arch. Microbiol., **149**, 459-465.
14. Бохински Р. (1987) Современные воззрения в биохимии (пер. с англ.), Мир, Москва, с. 443-444.
15. Herrmann K.M., Weaver L.M. (1999) The Shikimate Pathway. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **50**, 473-503.
16. Rouse B., Azen B., Koch R., Matalon R., Hanley W., de la Cruz F., Trefz F., Friedman E., Shifrin H. (1997) Am. J. Med. Gen., **69**, 89-95.
17. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. (1998) Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, **62**, 225-229.
18. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И. (2000) Биотехнология, №10, 16-23.
19. Троценко Ю.А. (1987) Биохимия и физиология метилотрофных микроорганизмов. Сб. научн. стат. АН СССР, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пушкино, с. 15.

Поступила: 10. 05. 2012.

MICROBIC SYNTHESIS OF DEUTERIUM LABELLED *L*-PHENYLALANINE WITH DIFFERENT LEVELS OF ISOTOPIC ENRICHMENT BY FACULTATIVE METHYLOTROPHIC BACTERIUM *BREVIBACTERIUM METHYLICUM* WITH RMP ASSIMILATION OF CARBON

O.V. Mosin¹, V.I. Shvets¹, D.A. Skladnev², I. Ignatov³

¹Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Federation, pr. Vernadskogo, 86, Moscow, 119571 Russia; e-mail: mosin-oleg@yandex.ru

²Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1-st Dorozhnyi pr., 1, Moscow, 117545 Russia

³Scientific Research Center of Medical Biophysics, N. Kopernik st., 32, Sofia, 1111 Bulgaria

The preparative microbial synthesis of amino acids labelled with stable isotopes, including deuterium (^2H), suitable for biomedical applications by methylotrophic bacteria was studied using *L*-phenylalanine as example. This amino acid is secreted by Gram-negative aerobic facultative methylotrophic bacteria *Brevibacterium methylicum*, assimilating methanol via ribulose-5-monophosphate (RMP) cycle of assimilation of carbon. The data on adaptation of *L*-phenylalanine secreted by methylotrophic bacterium *B. methylicum* to the maximal concentration of deuterium in the growth medium with 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ and 2% [^2H]methanol, and biosynthesis of deuterium labelled *L*-phenylalanine With different levels of enrichment are presented. The strain was adapted by means of plating initial cells on firm (2% agarose) minimal growth media with an increasing gradient of $^2\text{H}_2\text{O}$ concentration from 0; 24.5; 49.0; 73.5 up to 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ followed by subsequent selection of separate colonies stable to the action of $^2\text{H}_2\text{O}$. These colonies were capable to produce *L*-phenylalanine. *L*-phenylalanine was extracted from growth medium by extraction with isopropanol with the subsequent cristallization in ethanol (output 0.65 g/l). The developed method of microbial synthesis allows to obtain deuterium labelled *L*-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment, depending on concentration of $^2\text{H}_2\text{O}$ in growth media, from 17% (on growth medium with 24,5% $^2\text{H}_2\text{O}$) up to 75% (on growth medium with 98% $^2\text{H}_2\text{O}$) of deuterium in the 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) phenylalanine in these experimental conditions.

Key words: *Brevibacterium methylicum*, *L*-phenylalanine, biosynthesis, heavy water, electron impact mass spectrometry.