

ЕҢБЕК ҚЫЗЫЛ ТУ ОРДЕНДІ
«Ә. Б. БЕКТҰРОВ АТЫНДАҒЫ
ХИМИЯ ҒЫЛЫМДАРЫ ИНСТИТУТЫ»
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ХИМИЯ ЖУРНАЛЫ

ХИМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ КАЗАХСТАНА

CHEMICAL JOURNAL of KAZAKHSTAN

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
«ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКИХ НАУК
им. А. Б. БЕКТУРОВА»

4 (72)

ОКТАБРЬ – ДЕКАБРЬ 2020 г.
ИЗДАЕТСЯ С ОКТАБРЯ 2003 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ
2020

С. ТҮРҒАНБАЙ, А. Н. САБИТОВ, А. С. КҰРМАНБЕКОВ

«Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы» АҚ, Алматы,
Қазақстан Республикасы

^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O ТҰРАҚТЫ ИЗОТОПТАРЫМЕН ТАҢБАЛАНҒАН АҚУЫЗДАР МЕН АМИНҚЫШҚЫЛДАРЫН АЛУ ЖОЛДАРЫ

Аннотация. Ақуыздар мен аминқышқылдарын тұрақты изотоптармен таңбалау үрдісі олардың радиоактивті аналогымен салыстырғанда радиациялық қауіпсіздігімен және жоғары дәлдігімен молекулада оқшаулау ендігін анықтай алу мүмкіндігімен ерекшеленеді. сондықтан тұрақты изотоптармен (^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O және басқа) молекуланы таңбалау әдісі қазіргі таңда биохимиялық және түрлі табиғи қосылыстардың құрылым-функционалдық зерттеулері кезінде, әсіресе ақуыздар мен аминқышқылдарын зерттеуде маңызды болып табылады. Сонымен қатар изотоппен таңбаланған биологиялық белсенді қосылыстар (ББК) түрлі профилде метаболиттік және биохимиялық зерттеулерде, түрлі ауруларды медициналық диагностикалауда, әртүрлі изотоппен таңбаланған қосылыстарды химиялық синтездеу кезінде таптырмас құрал. Бұл әдеби шолуда ^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O тұрақты изотоптарымен таңбаланған амин қышқылдары мен ақуыздарды синтездеудің заманауи биотехнологиялық және химиялық ферментативті әдістеріне жалпы шолу жасалған. Әртүрлі әдістердің изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарды синтездеудің мүмкіндіктері қарастырылған. Әдеби шолуда ядролық магниттік-резонанстық спектроскопияны (ЯМР), инфрақызыл (ИК) және лазерлік спектроскопияны, сондай-ақ масса-спектрометриясын қолдана отырып, әртүрлі биохимиялық зерттеулерде синтезделген қосылыстарды дайындау және пайдалану туралы мәліметтер ұсынылған.

Түйін сөздер: тұрақты изотоптар, изотоптармен таңбалау, аминқышқылдары, ақуыздар, микроорганизмдер.

Кіріспе. Тұрақты изотоптармен (^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O және басқа) молекуланы таңбалау әдісі қазіргі таңда биохимиялық және түрлі табиғи қосылыстардың құрылым-функционалдық зерттеулері кезінде, әсіресе ақуыздар мен аминқышқылдарын зерттеуде маңызды болып табылады. Изотоппен селективтіден униформдыға дейінгі таңбалау дәрежесінің әртүрлілігіне негізделген әдіспен алынған бұл изотоппен таңбаланған биологиялық белсенді қосылыстар (ББК) түрлі профилде метаболиттік және биохимиялық зерттеулерде, түрлі ауруларды медициналық диагностикалауда [1], әртүрлі изотоппен таңбаланған қосылыстарды өз негізінде химиялық синтездеу кезінде таптырмас құрал. Мысалы, [^2H]- және [^{13}C] фенилаланин мен [^2H]- және [^{13}C] тирозин изотоппен таңбаланған пептидті гормондар мен нейропептидтердің аналогтарын синтездеуде қолданылған [2].

Тұрақты изотоптармен таңбалау үрдісі олардың радиоактивті аналогымен салыстырғанда радиациялық қауіпсіз және жоғары дәлдік әдісімен молекулада оқшаулау ендігін анықтай алу мүмкіндігімен ерекшеленеді: ядролық магнитті резонанс (ЯМР) спектроскопиясы, инфрақызыл (ИК) және

лазерлі спектроскопия, масс-спектрометрия. Стабилді изотоптардың мұндай детекция әдістерінің дамуы соңғы уақытта көптеген *de novo* биологиялық зерттеулерінің тиімділігін жоғарылатты, сонымен қатар молекулалы дәрежедегі жасушалы ББҚ-дың әрекет ету механизмі мен құрылымын зерттеуге мүмкіндік берді [3-4].

Сондықтан тұрақты изотоптармен таңбаланған аминқышқылдармен ақуыздарды алу жолдарын жасау заманауи биотехнология үшін актуалды мәселе. Бірақ, ББҚ молекулаларына тұрақты изотоптарды енгізуде қолданылатын түрлі әдістер әдетте, атомдардың санымен ажыратылатын, тұрақты изотоптарға ауыстырылған молекулалардың қоспасынан тұрады. Сондықтан генді-инженерлік, биотехнологиялық пен химия-ферментативті тәсіл және т.с.с амалына негізделген изотоппен таңбаланған ББҚ алудың жаңа тәсілдемесін жасап, оларды түрлі салада қолдану қажет.

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарын қолдану көп жағдайда қолжетімсіздігімен және әртүрлі табиғи көздерден бөлінетін, ең таза изотоптардың қымбатшылдығымен сипатталады. Тұрақты изотоптардың табиғи таралуы дейтерий үшін 0,0015% дан (элементтің жалпы көлеміне қатысты) ^{13}C көміртегінің изотопы үшін 1,11% дейін түрленеді, бірақ, үлгілерде изотоптардың төмендігіне қарамастан, соңғы уақыттағы байыту және тұрақты изотоптарды тазарту әдістері тазалығы жоғары дәрежедегі байытылған субстраттарды алуға мүмкіндік береді.

Изотоппен таңбаланған ББҚ-ға әлемдік қызығушылықтың артуына қарамастан, отандық әдебиеттерде бұл маңызды қосылыстардың алу әдістеріне арналған аздаған ғана ақпараттар бар. Бұл мақаланың мақсаты тұрақты ^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O изотоптарымен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарының биотехнологиялық алыну әдістерін толығырақ түсіндіру.

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарын химиялық алу әдістері

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдарының химиялық синтезі. Изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарын алудың жалпы стратегиясы 1-суретте көрсетілген. Изотоппен байытылған аминқышқылдарын алудың синтетикалық әдістері, ережеге сәйкес, аминқышқылдарының түрленген классикалық синтезі болып есептеледі, және ондағы карбоксилдеу, аминдеу, қалыпқа келу, гидридтеу немесе гидролиздеу сатылары изотоптарының тазалық дәрежелері сәйкесінше болатын, ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O тұрақты изотоптарын құрайтын байытылған реагенттерді қолдану арқылы жүргізіледі. Көп жағдайда, $[^2\text{H}]$ -, $[^{15}\text{N}]$ - және $[^{18}\text{O}]$ аминқышқылдарын $^2\text{H}_2\text{O}$; $^2\text{H}_2$; ^2HCl ; LiAl^2H_4 ; V^{22}H_6 ; $^{15}\text{NH}_3$; $\text{Na}^{15}\text{NH}_2$; $^{15}\text{NH}_2\text{Cl}$; $^{18}\text{H}_2\text{O}$ және т.б. қолданады.

Көптеген зерттеулер үшін $[^{13}\text{C}]$ аминқышқылды маңызды рөл атқарады, оларды сәйкес органикалық қосылыстарды карбоксилдеу арқылы көміртегі-сутегі немесе көміртегі-металл байланысы $^{13}\text{CO}_2$ және $\text{Ni}(^{13}\text{CO})_4$ көмегімен келесі гидролиздеу арқылы алуға болады. Молекулаларының әртүрлі орналасуы бойынша ^{13}C көміртегінің изотобымен, карбоксилді COOH - пен C_α - орналасуын қоса отырып байытылған $[^{13}\text{C}]$ аминқышқылды алудың перспек-



1-сурет – Изотоппен таңбаланған аминқышқылдар мен ақуыздарды алу тәсілдері

тивті синтетикалық жолы [5] жұмыста көрсетілген, сонымен қатар [^{13}C] аминқышқылдарының стереоселективті синтезі [6] сипатталған. Осыған қарамастан, химиялық синтездер көбінесе көпсатылы, бағалы реагенттерді және байытылған субстраттарды көп шығындайды, нәтижесінде D- және L- формалы аминқышқылының қоспасы болып табылатын өнімге алып келеді, оларды бөлу үшін арнайы әдістер қажет етіледі. Әдістің кемшілігі [^{13}C] аминқышқылын синтезге алып келетіндігі болып табылады, онда ^{13}C көміртегінің атомы молекуланың карбоксилді COOH - орналасуы бойынша шектеледі. Соңғысында, биологиялық зерттеулер кезінде организмде орын алатын көптеген ферментативті декарбоксилдену реакциясының есебінен [^{13}C] аминқышқылының ақпараттары шектеледі. Одан бөлек, қазіргі уақытқа дейін ^{13}C изотобын аминқышқылы молекуласының бүйірлік көмертегі атомарының орналасуына, химиялық синтездің әрбір сатысының жеке дамуына қол жеткізе алатындай енгізудің қажетті әдісі жоқ десе де болады. Соңғы кездегі жасалған ^{13}C -ті аминқышқылдарына енгізудің синтетикалық әдістері, ережеге сай, аминқышқылдары молекуласындағы көміртегі атомдарының, метиониннің метилді CH_3 тобы, имидазолды сақинадағы C_2 орналасуындағы гистидин молекулалары, сонымен қатар аспарагин және глутамин қышқылдары топтарындағы карбоксилді COOH -та көміртек атомдарының орналасуы секілді орналасуларды қозғайды [7,8].

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдарының толығырақ синтезі химиялық және ферментативті тәсілдің жиынтығын қолданумен байланысты болды. Мысалы, L-[4- ^{13}C] валин, L-[3- ^{13}C] триптофан және басқа L-[^{13}C] аминқышқылдары ферменттер құрылғысының көмегімен синтезделген [9].

Аминқышқылдар мен ақуыздар молекуласындағы изотопты (^1H - ^2H)- және (^{16}O - ^{18}O)- орын ауысулар. [^2H] аминқышқылдарын қондырғымен алудың тиімді тәсілі фенилаланин мен тирозиннің бензолды сақинасындағы, триптофанның индольды және гистидиннің имидазолды сақинасында дейтерийге жеңіл ауыса алатын арнайы ароматты протондардың селективті алмасуы болып табылады. Олар жеке аминқышқылдары, сонымен қатар ақуыздағы аминқышқылдарының қалдықтары құрамында да кездеседі.

Изотопты (^1H - ^2H)- ауысу реакциясы электрофильді ауысу механизмі бойынша жүреді және тек арнайы, ароматты аминқышқылдарындағы ауысуға сезімтал протондарды тиек етеді. Мұндай әдіспен граммды мөлшерде L-[2,3,4,5,6- ^2H] фенилаланин 85% $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ 50 $^\circ\text{C}$ -де, L-[3,5- ^2H] тирозин 6 % $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ ерітіндінің төмен қайнауында, L-[2,4,5,6,7- ^2H] триптофан 75% [^2H] трипторуксусты қышқылда 25 $^\circ\text{C}$ кезінде және L-[2- ^2H] гистидин 6% NaO^2H 80 $^\circ\text{C}$ кезінде алуға болады.

Изотопты ауысудың көмегімен [^{18}O] аминқышқылын да алуға болады. Ол үшін карбоксилді COOH -тобының аминқышқылдары молекуласындағы оттегінің атомдары бойынша таңба көзі ретінде H_2^{18}O қолданылатын изотопты (^{16}O - ^{18}O) – ауысудың реакциясын қолданады [10]. Бұл әдістің қолданылуы мұндай тәсілмен алынған [^{18}O] аминқышқылының бағасының жоғары болуымен шектеледі. Бірақ, [^{18}O] синтезделген аминқышқылын қолдану арқылы көптеген биомедициналық зерттеулер арқылы өзін толығымен ақтайды, себебі, олардың дейтерленген баламаларына қарағанда кері изотопты ауысуға тұрақты болады. Мысалы, [^{18}O] аминқышқылдары қан плазмасында тұрақты түрде инъекциядан кейін біраз күн бойы өмір сүре алды: [^{18}O] тирозин мен басқа да [^{18}O] аминқышқылдарының молекуласындағы карбоксилді орналасуының кері (^{16}O - ^{18}O) изотопты ауысуы тек қоректі ортада қан клеткаларын ұзақ инкубациялау нәтижесінде көріне бастайды.

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарды алудың биотехнологиялық әдістері

Тұрақты изотоптардан тұратын ортада микроағзаларды өсіру. Көптеген мақсаттарда, ең алдымен ақуыздарды құрылымдық зерттеу кезінде биотехнологияда изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуыздарын алуда химиялық синтезге альтернативті жол ұсынады, ол синтезделуші өнімдердің жоғары өндірілуіне, қосылыс молекулаларына изотоптардың тиімді енгізілуіне, және ең бастысы, түпкі өнімнің табиғи конфигурациясының (стереоселективтілігін) сақталуына әкеледі. Әдіс қоректі ортада түрлі субстраттардан тұратын, құрамында ^2H , ^{13}C , ^{15}N , және ^{18}O тұрақты изотоптары бар органикалық және бейорганикалық болып табылатын, қажетті беттік активті қосылыстардың штамм-продуценттерін алумен түсіндіріледі [11,12].

Изотоппен таңбаланған ақуыздар мен аминқышқылдарын биотехнологиялық алу кезінде тұрақты изотоптардан тұратын ортада тұрақты өсе алатын микроағзалардың және қажетті беттік активті қосылыс өнімдерінің дұрыс таңдалауына үлкен мән берген жөн. Көптеген изотоппен таңбаланған ақуыздарды алу үшін қолжетімді объектерге микробалдырлар жатқызылды, олар

табиғатта көптүрлілігімен және әр түрінен таңдауға мүмкіндігінің жоғарылығымен, ақуыздардың эндогенді жинақталуына бейімділігімен ерекшеленеді. Сонымен қатар, микробалдырлардың байытылған биомасса компоненттерін комплексті қолдану [^2H] аминқышқылдарын және $^2\text{H}_2\text{O}$ -ортада өсірілген қосынды ақуыздардың гидролизаттарымен гетеро байытылған биомассаны бөліп алуға болады [13]. Микроағзалардың басқа дәстүрлі штаммдары да изотоппен таңбаланған ақуыздар мен аминқышқылдарын алуда эффективті қолданылады. Осылайша изотоппен белгіленген қосылыстар үшін қолданылатын микроағзаларға қойылатын талаптарға тұрақты изотоптардан тұратын ортада тұрақты өсуі мен генді-инженерлік, сонымен қатар мутагенез бен селекцияны қолдану арқылы жоғарылатуға болатын, қажетті беттік активті қосылыс өнімдерінің жоғары деңгейі жатады. Бұл берілген шарттарды қанағаттандыра алатын жаңа бактериалды штамм-продуценттерді құрастырудың және олардың ары қарай сипаттамаларын зерттеудің алғышарттарын жасайды. Биотехнологиялық тәсіл эконимикалық тиімді және жоғары стереоселективтілік пен синтезделуші қосылыстарды максималды дәрежеде изотоппен байыту керек болған жағдайда ауыстыруға келмейді.

Изотоппен белгіленген қосылыстарды биотехнологиялық алу кезінде көптеген тәсілдерді қолданады, олардың бірі клеткалы беттік активті қосылыстарды молекуласының барлық көміртекті қаңқасы бойынша тұрақты изотоптармен униформды таңбалауға негізделген. Оған изотопты тазалығы жоғары дәрежедегі байытылған субстраттардан тұратын ортада микроағзаларды өсіру және кейінгі биомасса компоненттерін түрлі табиғи қосылыстардың класына бөлу есебінен жетуге болады. Осылайша, ^{13}C изотобын молекула қаңқасы бойымен изотопты енгізудің униформды сипаты бар аминқышқылдарын көп жағдайда қарапайым көміртекті субстраттардың орнына тек олардың төменмолекулалы балама түрін, мысалы $^{13}\text{CO}_2$ құрайтын, өсу ортасында микроағзаларды автотрофты өсіру кезінде алады. Мұндай әдіспен микробалдырлармен синтезделген көптеген ақуыздар алынған: *Anabaena* [14,15] – дан ферридоксин, *Rhodospirillum* – нан цитохром C-553, цитохром C₂, және *Anabaena 7120*-нан флаводоксин және де келесі ЯМР зерттеулер үшін қолданылған. Молекулада атомдары неғұрлым көбірек болатын олардың тұрақты изотоптарына ауыстырылған болуы шарт ЯМР спектроскопия әдісімен ақуыздарды құрылымдық зерттеуде униформды байытылған [^{13}C] аминқышқылдарын алудың биосинтетикалық тәсілдері керекті көлемдегі байытылған [^{13}C] өнімдерді салыстырмалы түрде төмен бағада алуға септігін тигізеді [16]. [^{15}N] аминқышқылдарын ұқсас жолмен K^{15}NO_3 және басқа да ^{15}N тұздарды құрайтын сулы ортада микроағзаларды өсіру есебінен алады, сол секілді дейтериймен жоғары байытылған аминқышқылдарын қарапайым судың орнына 99,9% $^2\text{H}_2\text{O}$ құрайтын өсіру орталарында алуға болады [17]. Бірақ, бұл кезде $^2\text{H}_2\text{O}$ -ға клеткалық адаптациямен байланысты эффектерді ескеру керек. $^2\text{H}_2\text{O}$ клетканы уландырады, олардың өсуіне және көптеген микроағзалардың дамуына маңызды функцияларды шектейді.

Бірақ, кері биостатикалық эффектіне қарамастан $^2\text{H}_2\text{O}$ ауыр судың концентрациясы максималды болатын ортада бактериялардың түрлі таксономикалық тууы өсу мен биосинтезге мейлінше жеңіл бейімделген, сол уақытта жоғары өсімдіктердің клеткалары $^2\text{H}_2\text{O}$ -ның 60%, ал жануарлардың клеткалары шамамен 30% ұстап тұра алады [18]. Физиология мен генетика көзқарасымен $^2\text{H}_2\text{O}$ -ға клетканың бейімделуі комплекті феномен болып табылады және ферментативті реакциялардың активтілігін өзгеруіне әкеледі, ол құрылымына және синтездеуші ББК функциясына, биосинтез процесстеріне және метоболизм мен тіпті клетка морфологиясына да жанама әсер етеді. Осыған байланысты, дейтериймен жоғары байытылған ББК алу үшін клетканың $^2\text{H}_2\text{O}$ физиологиялық бейімделуінің әдістерін табу өте актуалды [19]. $^2\text{H}_2\text{O}$ -ға биологиялық объекттердің бейімделуін зерттеу протий/дейтерий изотопты жұбына аномальды жоғары болып табылатын, химиялық изотопты эффектерді ескеруі қажет. Бұл ретте біріншілік әне екіншілік изотоптық эффектерді бөліп қарастырады. Біріншілік изотопты эффектерге $^2\text{H}_2\text{O}$ жүретін, k_H/k_{2H} қатынасымен өлшенетін химиялық реакциялардың жылдамдық тұрақтысының өзгерісін жатқызған жөн. Бұл қатынас дейтерийдің қатысуымен болатын әртүрлі байланыстар үшін өзгеріп отырады және 7 ден 10 бірлікке дейін түрленуі мүмкін. Екіншілік изотопты эффектерге химиялық реакцияның жылдамдық тұрақтысының еріткіш ретінде (жоғары аққыштығы мен тұтқырлығы, тығыздығы, диффузия коэффициенті және т.б.) $^2\text{H}_2\text{O}$ әсеріне негізделген өзгерісін жатқызамыз. Одан бөлек, $^2\text{H}_2\text{O}$ ауаның, ортаның бейорганикалық тұздарының, тазарту кезінде және т.б дымқыл буын белсенді жұтатын гидроскопиялық қосынды екенін ұмытпау керек және солай болғандықтан $^2\text{H}_2\text{O}$ ортада бактерияларды өсірумен байланысты этаптарды сусыз реагенттерді, $^2\text{H}_2\text{O}$ -да алдын ала кристалданған бейорганикалық тұздарды қолданып герметикалық ортада жүргізген жөн. [^{18}O] аминқышқылдарын судың басқа изотопты баламасын - H_2^{18}O құрайтын ортада микроағзаларды өсіру есебінен алуға болады. H_2^{18}O -ға клеткалардың бейімделуі бұл жағдайда шектелмеген. Бірақ, H_2^{18}O кей жағдайларда ең алдымен, оттектің изотопты қосылыстарының жоғары бағалануы себебінен изотопты таңбаның көзі ретінде қолданылады [20].

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдар мен ақуыздарды алуда ауксотрофты мутанттар бактериясын қолдану. Кейбір изотоппен таңбаланған аминқышқылдар мен ақуыздарды алуда микроағзалардың ауксотрофты түрін қолдану биотехнологияда көп қолданылатын тәсілдердің бірі, тіпті қазір оны жеке бағыт ретінде қарастырады. Өсіруші ортаға сәйкес аминқышқылының штамм ауксотрофенді болатын, соның әсерінен тиісінше немесе de novo негізгілердің биосинтетикалық циклы арқылы ақуызда нативті аминқышқылын ауыстыра алатын, байытылған баламасын немесе оның негізін құраушысын енгізу нәтижесінде ақуыздарды байыту селективтілігі артады. Осындай ұқсас принцип аминқышқылдарының изотоппен таңбаланған баламасын алуда да қолданылады. Осы кезде ауксотрофты штаммдар метаногенді және метилотрофты бактериялармен қоса, түрлі микроағзалардың таксономикалық топта-

рына жатуы мүмкін, олардың изотоппен таңбаланған аминқышқылын алуда биотехнологиялық потенциалы жалпыға мәлім. Осылайша, энергияны газды (H_2-CO_2) қосындысының ассимиляциясы есебінен алатын [21], облигатты анаэробтар тобына жататын метаногенді бактерияларды көбінесе [^{13}C] аминқышқылын алуда қолданады. Айта кететіні ^{13}C аминқышқылын байыту эффективтілігіне CO_2 -ден ацетил- CoA синтездей алмайтын, соның нәтижесінде өсуі үшін экзогенді ацетат қажет ететін, метагенді бактериялардың ацетатқа тәуелді мутанттарын алу және қолдану арқылы қол жеткізуге болады [22]. Сондықтан, бұл бактерияларды өсіруді құрамында олардың [^{13}C] балаларымен ауыса алатын, (H_2-CO_2)-мен қоса ацетаттың қосындысы бар, өсіру орталарында жүргізіледі. Ережеге сай, ($H_2-^{13}CO_2$) және [^{13}C] ацетат ортасында мұндай метанотрофтардың өсуі кезінде аминқышқылдары молекуласында көміртекті қаңқасы бойынша ^{13}C енгізудің униформды сипатына, сонымен қатар ассимиляцияның соңғы өнімі көміртегі-метанға экзогенді $^{13}CO_2$ қосу дәрежесінің күрт төмендеуіне жетуге болады [23]. Берілген жағдайда синтездеуші [^{13}C] аминқышқылдарының молекуласында белгі араласуының процессінен толығымен құтылуға болады. Аминқышқылы молекуласын ^{13}C изотоппен белгіленбеген (H_2-CO_2) қоспасын және [^{13}C] ацетат немесе ($H_2-^{13}CO_2$) қоспасының құрамындағы $^{13}CO_2$ және белгіленбеген ацетаттан тұратын, өсіру орталарын қолдану есебінен селективті алмастыру арқылы жетуге болады [45]. Бұл ретте $^{13}CO_2$ қымбаттылығы мен оның компрессиясымен байланысты ыңғайсыздығының әсерінен [^{13}C] аминқышқылын алу көбінесе бірінші нұсқа бойынша, яғни, (H_2-CO_2) және [^{13}C] ацетат қолдану арқылы алынады [24]. Бірақ, жұмыста айтылғандай бұл ацетатассимилирлеуші метаногендерге, мысалы *Methanospirillum hungatei* *GPI* оптималды өсуіне қажетті ацетаттың концентрациясының белгілі мөлшері қажет. Соның нәтижесінде, бұл бактерияларды қолданудың кемшіліктеріне изотопты белгінің көп шығындалатыны жатады. Изотоппен таңбаланған аминқышқылдарын биотехнологиялық алу кезінде метаногенді бактериялар үшін сипаттаушы болып табылса да, белгілі *E. coli* көп ерекшеленетін олардың клеткадағы биосинтез жолын ескерген дұрыс. *M. hungatei* *GPI* бактериясының ацетаты бойынша көміртегі мен энергия көзі ретінде (H_2-CO_2) мен [$1,2-^{13}C$] ацетат құрайтын, ауксотрофты ортада өсіру кезінде алынған [^{13}C] аминқышқылының биосинтез ақпараттары төменде көрсетілген.

[^{13}C] аланин. ^{13}C көміртегінің аланин молекуласына енгізілуі ацетил-CoA пируватке дейін карбоксилдеу реакциясы әсерінен жүреді. Мұндай биосинтездің жолы басқа да таксономикалық туулар мен метаногенді бактериялардың түріне де қолданылады.

[^{13}C] серин және [^{13}C] глицин. ^{13}C изотоптың серин мен глицин молекулаларында таралу сипаты пируваттың фосфопируватқа көміртегі ассимиляциясының гликогенді жол бойынша 3-фосфоенолпируват түзе отырып, бірен-саран фосфорлануымен түсіндіріледі. Бұған дәлел ретінде басқа метаногендердің, мысалы, *Methanobacterium thermoautotrophicum* клеткалы

экстрактарында табылған, фосфоенолпируватсинтетаз-ферменттердің, энлаз және 2-фосфоглицератмутааздың белсенділік дәрежелері қызмет етеді.

[¹³C] аспарагин қышқылы, [¹³C] треонин және [¹³C] метионин. ¹³C-белгінің С₁- ацетаттан және С₂- ацетаттың көміртекті атомы мен СО₂ аминқышқылының карбоксилді тобына ¹³C изотоптың қосылуынан туатын, аспараттың көміртегі-карбоксилді тобының атомы бойынша енгізілуі аспараттың бұл бактерияда биосинтезі үшкарбонды қышқыл циклы арқылы пируваттың оксалоацетатқа дейінгі карбоксилденуі нәтижесінде өткендегі дәлел болды. Треонин мен метионинге белгінің орналасуы аспараттан бұл аминқышқылдарның биосинтезделуі жолымен сәйкес жүрді. Метилді топтағы көміртегі атомы-метионин молекулалары СО₂ шығады.

[¹³C] лизин. ¹³C белгісінің лизин молекуласында таралуы лизиннің пируваттан аспаратқа бактериялар үшін әдеттегі диаминпемелинді жолмен синтезделетіндігін дәлелдеді.

[¹³C] глутамин қышқылы, [¹³C] аргинин және [¹³C] пролин. Глутаминды қышқыл молекуласында изотопты таңба С және молекуланың көміртекті молекуласында С орналасуда детектрленді. Карбоксилді СООН- топта және α- орналасуда көміртегі атомдары глутамин қышқылдарының молекулалары СО₂-ден шығады. Бұл нәтиже үшкарбонды қышқыл кетоглутараттың пайда болуына әкелетіндігіне дәлел. Аргинин мен пролин молекулаларында ¹³C таңбасы глутаминді қышқылға ұқсас таралады.

[¹³C] лейцин, [¹³C] валин және [¹³C] изолейцин. Лейцин мен валин молекулаларына ¹³C изотопты енгізу сипаты олардың ацетолактатадан түзілетініне куә, сол уақытта треониннен бұл аминқышқылының күтілетін синтезделу жолынан изолейцин биосинтезі ерекшеленеді. *M. Hungatei* клеткасында изолейцин ацетаттан түзіледі. Изолейцин биосинтезінің балама жолы спирохетте, *Serratia marcescens* лейцинассимерлеуші мутантынан және треонин-дезаминаз гені ақау болып табылатын, *Saccharomyces cerevisiae* мутантынан табылған.

[¹³C] фенилаланин және [¹³C] тирозин. Фенилаланин және тирозин молекулаларындағы байытылған көміртегі позициялары толығымен бактерияларға дәтүрлі аминқышқылдарының шикиматты және хоризмотты қышқылдан биосинтезімен сәйкес келеді.

[¹³C] гистидин. Гистидиннің имидазольды сақинасында С орналасуында көміртегі атомы СО₂ –ден шығады. Гистидиннің имилазольды сақинасындағы С қалыптағы көміртекті атом С₂- ацетаттың көмегімен ¹³C-қа алмастырылған.

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдары мен ақуызардың басқа перспективті көздері ретінде метанолдың химиялық синтезіне жүргізілетін жаңа технологияларға қызығушықтың артуынан туған, таксономикалық аспектісінде оң және теріс грам бактериялар мен дрождар болатын, метиолтрофты микроағзалар танылған. Бұл бактериялар ең алдымен микробты ақуыз бен аминқышқылының арзандығымен зерттеушілердің назарын аударды. Бакте-

риалды метоболизмнің жолдарын тану аминқышқылдары молекуласына изотопты таңбаның бағытталған енгізілуін орындауға мүмкіндік береді [25].

Метилотрофты бактерияларыдың ауксотрофты штаммдары [^2H] – және [^{13}C] аминқышқылдарын алуда тиімді қолданыла бастады. Бұл мақсатта арзан төменмолекулалы (^{13}C) метанол, (^2H) метанол байытылған субстраттарының және метилотроф клеткаларында қымбат байытылған ББК $^2\text{H}_2\text{O}$ -ның биологиялық конверсиясын жасаған тиімді. Онда дәстүрлі тәсіл болып аминқышқылдарының сәйкесінше сутегі, көміртегі, азот стабилді изотоптарынан тұратын, штамм-продуценттерін өсіру болып қала береді. [26]. Жұмыстарда [^{13}C] аминқышқылының (молекуладағы стабилді изотоптарды енгізу дәрежелері L-[^{13}C] лейцин үшін 30%- дан, ал L-[^{13}C] фенилаланин үшін 90% дейін тербеледі) L-изолейцині бойынша ауксотрофты *Methylobacillus flagellatum* бактериясын қолдану есебінен алу жолдарын қарастырады.

(^{13}C) метанол $^2\text{H}_2\text{O}$ салыстырғанда метилотрофтардың биосинтетикалық және өсуші сипатына айтарлықтай биостатикалық эффектінің жоқ екенін ескеру қажет, сондықтан берілген тәсіл екі еселенген изотопты таңбасы бар (мысалы, [^{13}C] изотопты өсу ортасында $^2\text{H}_2\text{O}$ максималды концентрацияда молекулаға енгізу) синтезделуші ББК молекуласына енгізу үшін қолданған тиімді. [27] Жұмыста [^2H]- және [^{13}C] аминқышқылдары (^{13}C) метанол, (^2H) метанол және $^2\text{H}_2\text{O}$ минималды ортада факультативті метилотрофты *Brevibacterium methylicum* бактериясы L-лейцин бойынша ауксотрофты штаммының өсуі және *Methylobacillus flagellatum* облигатты метилотрофты бактериясының L-изолейцин бойынша өсуі кезінде және изотоппен түрлі қанығу дәрежесінде алынады. Изотоппен таңбалау дәрежесі әртүрлі [^2H]- және [^{13}C] аминқышқылдары сәйкес изотоппен таңбаланған ортада бактерияларды алғаннан кейін, дәстүрлі сұйықтықтардан және биомасса ақуыздарының гидролизінен бөлінеді. Биосинтетикалық алынған [^2H]- және [^{13}C] аминқышқылдары ^2H - және ^{13}C -ке алмасқан көміртегі мен сутегі атомының көлемі әртүрлі, молекулалары изотоппен байытылған қоспа болып табылады. Осылайша таралу молекулаға изотоптың жалпы енгізілуімен, сонымен қоса оларды алу жолына тәуелді болады. Секреттелуші аминқышқылдары мен *B. Methylicum* және *M. Flagettatum* биомассасының аминқышқылды қалдық қосынды ақуыздарының молекуласына стабилді изотоптарды енгізудің қосынды дәрежесінің мәліметтері кестеде көрсетілген. Бұл зерттеулер лейцин бойынша ауксотрофтылық шартында лейцинді изотоппен таңбалау дәрежесі, сонымен қатар онымен метаболитті байланысты аминқышқыл дәрежесі басқа аминқышқылдарына қарағанда төмен, ол шамамен *de novo* аминқышқылдары биосинтез ақпаратымен байланысты метоболизмнің минорлы жолдарының сақталуы есебінен болуы мүмкін. Сонымен, 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ құрайтын ортада *B. Methylicum* және байытылмаған L-лейцинді өсіру кезінде дәстүрлі сұйықтықтардың жеке аминқышқылдарына дейтерийді енгізу дәрежелері лейцин/изолейцин үшін 51% құраса, валин үшін 58,8% болды, сол уақытта изотопты енгізу дәрежесі аланин үшін 77,5% , ал фенилаланин үшін 75% құрады (кесте).

Секрециялық аминқышқылдар (секретиремые аминокислоты) мен *B. Methylicum** және *M. Flagettatum*** биомассасының аминқышқылды қалдық қосынды ақуыздарының молекуласына тұрақты изотоптарды енгізудің қосынды дәрежесінің мәліметтері

Аминқышқылдар	Өсу ортасындағы $^2\text{H}_2\text{O}$ концентрациясы, %				1% $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ ДС ақуыз
	24,5ДС# ақуыз	49,0 ДС ақуыз	73,5 ДС ақуыз	98,0 ДС ақуыз	
Глицин	- 15,0	- 35,0	- 50,0	- 90,0	60,0 90,0
Аланин	24,0 20,0	37,5 45,0	62,5 62,5	77,5 97,5	35,0 95,0
Валин	20,0 15,0	46,3 36,3	43,8 50,0	58,8 50,0	50,0 50,0
Лейцин/изолейцин	15,0 10,0	47,0 42,0	46,0 45,0	51,0 49,0	38,0 49,0
Фенилаланин	15,0 24,5	27,5 37,5	51,2 50,0	75,0 95,0	95,0 80,5
Тирозин	- 20,0	- 25,6	- 68,8	- 92,8	- 53,5
Серин	- 15,0	- 36,7	- 47,6	- 86,6	- 73,3
Аспарагин қышқылы	- 20,0	- 36,7	- 60,0	- 66,6	- 33,3
Глутамин қышқылы	- 20,0	- 40,0	- 53,4	- 70,0	- 40,0
Лизин	- 10,0	- 35,3	- 40,0	- 58,9	- 54,4

* Аминқышқылы молекуласына дейтерийді енгізу 2% CO_3OH және 24,5; 49,0; 73,5; 98,0% $^2\text{H}_2\text{O}$ құрайтын ортадаөсетін *B. Methylicum* үшін берілген
 ** ^{13}C енгізу ақпараттары 1% $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ қарапайым суды құрайтын ортада өсірілген *M. Flagettatum* үшін берілген
 # ДС терминімен өсу орталарынан клетканы бөліп алудан кейінгі бөлінетін, дәстүрлі сұйықтықтар белгіленген.

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдар мен ақуыздарды алудың генді-инженерлік әдісі. Тұрақты изотоптармен таңбаланған жеке ақуыздарды биосинтетикалық алу жолын биосинтезге жауапты, қажетті гендердің экспрессия векторын қолдана отырып жүргізген ыңғайлы. Бұл мақсаттарда плазмидті ДНҚ негізіндегі *E. coli* бактериясының экспрессия векторы абзалырақ, мысалы құрамында pHSe_5 плазида болатын, T_4 лизоцим экспрессия векторы [28]. Бұл векторды қолдану нәтижесінде азот ^{15}N және көміртегі ^{13}C тұрақты изотоптарымен селективті таңбаланған T_4 –лизоцимнің миллиграмдық мөлшері алынған. Берілген жағдайда тұрақты изотоптарды енгізу [^2H]– немесе

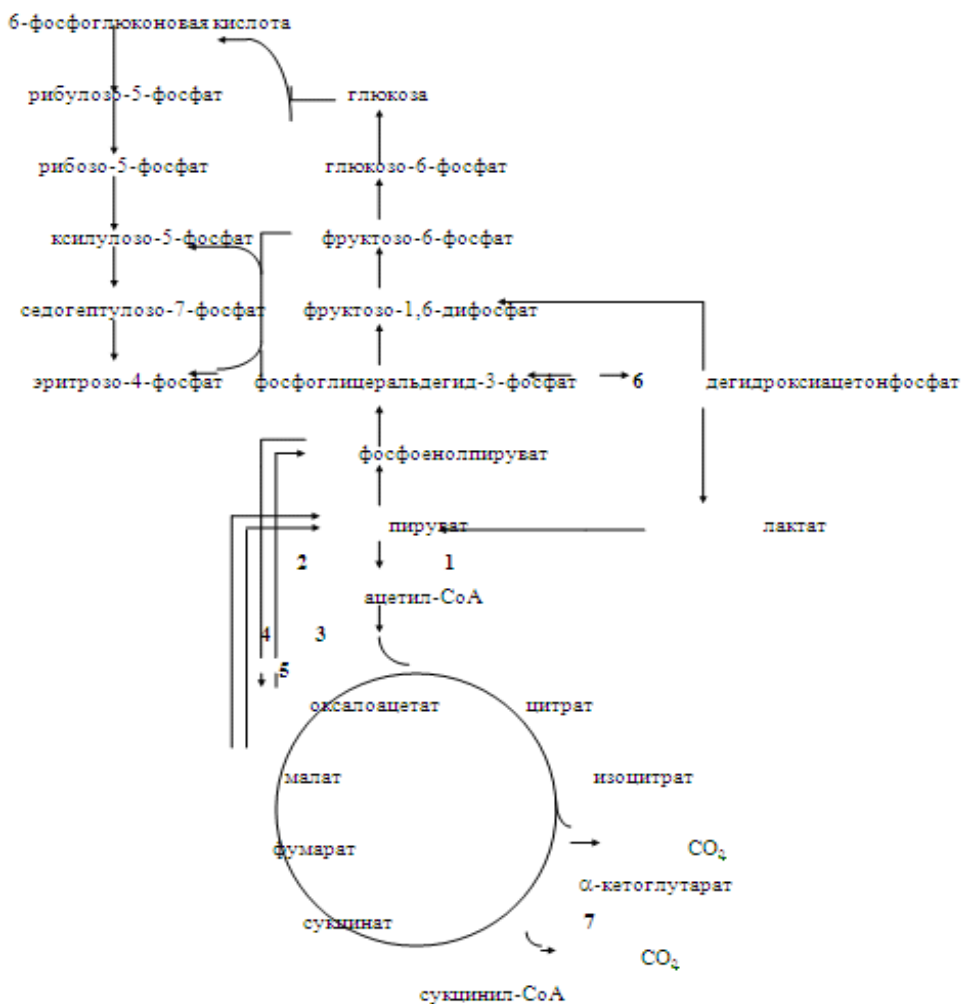
[^{13}C] аминқышқылдарынан тұратын ортада *E. coli* генді конструкторының өсуі есебінен жүзеге асырылды. Әдіс сонымен қоса жеке байытылған ақуыздарды алуға да қолданылады, олардың экспрессиясы *E. coli*-дан басқа жүйеде болады, мысалы жәндіктер немесе сүтқоректілер клеткасының негізіндегі экспрессия жүйесінде [60]. Ақуыздар жоғары шығыста экспресстелетін, басқа микробты жүйелер ақуыздың изотоппен таңбаланған ұқсас түрін алуға мүмкіндік береді. Оларға ең алдымен дрожж, бактерия және бактериофаг секілді жақсы зерттелген объекттер жатады. Сонымен, жоғарыда айтылған микробты объекттерді экспрессия векторы ретінде қолдану арқылы жеке дара таза [^{15}N] ақуыздардың препаратты мөлшері алынды: стафилокок нуклеазасы, интерлейкин 1, фаг P₂₂C₂ ақуыз репрессоры, тиредоксин *E. coli*, гемоглобин, α -протеаза, субтилизин ингибиторы, фаг репрессоры, N-gas P₂₁ адамның өсу факторының ақуызы [29,30].

Келесі жұмыста *Methylobacillus flagellatum* метилотрофты бактериясының облигатты штаммы негізіндегі экспрессия векторларын қолдану арқылы жеке дара [^2H] ақуыздарды алу тәсілі көрсетілген [31]. Бұл тәсіл бойынша метилотрофтарда зерттелуші ақуыздың құрылымды генін клондайды. Мұндай әдіспен, мысалы метилотроф клеткаларында жақсы экспресстелетін [^2H], немесе басқа да ақуыз зерттеушілерін қызықтыратын интерферондар алуға болады. Әдіс сонымен қатар аминқышқылы мен ақуыз молекулаларына басқа стабилді изотоптарды енгізуге мүмкіндік береді, мысалы ^{13}C . Осыған орай берілген әдіспен алынған [^{13}C] аминқышқылын ЯМР зерттеулерде қолданудың аминқышқылдарының жоғары дәрежеде изотоппен байытылмауы басты кемшіліктерінің бірі екенін атап өткен жөн, оның салдарынан молекудағы көміртегінің жақын атомдары арасындағы ^{12}C - ^{13}C – спиндік әрекеттесу есебінен ЯМР спектрлерін күрделендіреді [32]. Молекуладағы жақын орналасқан көміртегі атомдарының мультиквантты резонансы ЯМР спектрлерінің интерпретациясы үшін кедергі болатындықтан, таңба араластыру процесін шектейтін, [^{13}C] аминқышқылын алудың жетілдірілген әдістерін қолдану қажет.

Осындай жолмен соңғы уақыттарда бактериялардың жаңа штаммдары құрастырылған, олар бұл аминқышқылдарының негізін қалаушыларының шектелген ортасында метоболизм гені бойымен мутацияны тасымалдайды [33]. Бұл сондай немесе басқа да байытылған субстраттардан тұратын ортада микроағзалардың өсуі кезінде берілген бактериялардың мутантты штаммдарында *de novo* аминқышқылдарының биосинтезін баяулату есебінен таңба араласуынан құтқарады. Метоболизм гені бойынша арнайы мутацияларды таңдау барысында осындай генетикалық құралған жүйенің қалыпты жұмыс жасауы үшін қажетті минимум екі шартын қанағаттандыру қажет, біріншіден, таңба деградациясын мейлінше төмендету немесе *de novo* негізін қалаушылардың байытылмаған клетка сыртындағы араластыру процесі және екіншіден, биосинтездің түйіндес жолдарынан түзілетін бірдей интермедианттар биосинтезі әсерінен молекуланың байытылған көміртекті қаңқасын құрастыру процесін минимумға жеткізу. Берілген стратегия [34] жұмыста ұсынылған, онда геномды делеция тасымалдаушы, гликолиз процесінде және

үшкарбонды қышқыл циклында интермедиаторлар арасына көміртегі атомдарының алмасуын болдырмайтын, *E. coli DL10* және *E. coli DL11* бактерияларының екі генді құрастырылған штаммын алу жолдары қарастырылған.

Берілген штаммдарды қолдану арқылы изотопты қанығу дәрежесі 95% жететін [¹³C] аминқышқылының препаратты мөлшері алынды. Гликолиз және үшкарбонды қышқыл циклында метаболизм геніндегі мутацияны 2-суреттен көре аламыз. Екі *E. Coli* бактериясының құралған штаммдары геномдарында мутация құраған, олар метоболизмнің негізгі жолдарындағы жеті ферменттің генін қозғайды.



2-сурет – Гликолиз және үшкарбонды қышқыл цикл метаболизмі геніндегі мутациялар (ЛеМастер Д. М., 1982 бойынша)

Ферменттердің белгіленуі: 1 - пируватдегидрогеназ; 2 - фосфоенолпируваткарбоксилаз; 3 - фосфоенолпируваткарбоксикиназ; 4 - NAD-малатдегидрогеназ; 5 - NADP-малатдегидрогеназ; 6 - триозофосфатизомераз; 7 - α-кетоглутаратдегидрогеназ.

E. coli DL10 штаммының ферменттері (1-5) мутация есебінен әсерсіздендірілді, соның әсерінен ол көміртегі мен энергия көзі ретінде өсу ортасынан сукцинат пен ацетатты ассимиляциялады, ал [1-¹³C] лактатты өсу ортасына клетканың метаболитті қажеттіліктерін өтеу үшін және ¹³C- таңбаны гликолиз процесі кезінде синтезделетін аминқышқылының молекуласына енгізу үшін қосты.

E. coli DL11 бактериясының штаммы көміртегі ассимиляциясының гликолитті жолы бойымен байытылмаған глюкозаны көміртегі мен энергия көзі ретінде бұрғылай алды, сонымен қатар [1,4-¹³C] сукцинат және [1-¹³C] ацетатты өсіру ортасына үшкарбонды қышқыл циклы бойынша түзілетін [¹³C] аминқышқылының биосинтезін ынталандыру үшін қосылды. Бұл мәселеде үшкарбонды қышқыл циклында таңбаның деградация процесін төмендету үшін, бактериалды генге α - кетоглутаратдегидрагеназ генімен байланысқан қосымша мутация енгізу қажет болды.

Изотоппен таңбаланған аминқышқылдарын алудың химия-ферментативті әдісі. Изотоппен таңбаланған аминқышқылдарын алудың келесі тәсіліне синтетикалық және ферментативті реакциялар жиынтығына негізделген, химия- ферментативті әдіс жатады. Ол үшін тазаланған ферменттер мен олардың экстракттарының, клеткасыз ферментативті жүйенің, сонымен қоса иммобилизденген ферменттердің құрылғыларын қолдану экономикалық тиімді. Ферментативті реакцияларды иммобилизденген ферменттерде жүргізеді, мысалы, NADH көмегімен [²H] аланин алу кезіндегі аланиндегидрогеназ, [²H] фенилаланин және [²H] тирозин алу кезіндегі триптофанситаз, сахарозада иммобилизденген фенилаланинаммонийлиаз бен фенилаланингидроксилаз, [²H] триптофан алу кезіндегі глутаматдегидрогеназ, [²H] глутамин қышқылын алу кезіндегі аспартазалар, [²H] аспарагин қышқылын және [²H] серин алу кезіндегі серингидроксиметилаз жатады [25,26].

Ферментативті әдіс оптикалық белсенді аминқышқылдарын жоғары субстратты ферменттердің өзгешелігі мен аминқышқылының молекуласының тұрақты изотоптарын селективті енгізу мүмкіндігінің арқасында препаратты лабораториялық және өндірістік алу үшін бұрыннан қолданылады. Ферментативті жүйені қолданудың негізгі аспектісіне прохиральды субстраттарда ассиметриялық байланыстың түзілудің каталитикалық реакциясы және аминқышқылы рацематтарының ферментативті бөлінуі болып табылады.

Рацематтардың прохиральды сорбенттерде хроматографикалық бөлінуіне келер болсақ, олар бөлу үшін аса ыңғайлы емес және ең жақсы дегеннің өзінде бір оптикалық антипод түрінде жартыдан көп байытылған өнімді ала алады. Ферментативті саты көбіне аминқышқылдарының байытылған аналогтарының химиялық синтезін аяқтайды, және бұл мақсатта таза ферменттерді қолдану секілді, интактты клеткаларды немесе олардың экстракттарын қолдану сондай- ақ тиімді болып келеді. Бірақ, ферменттердің субстратты спецификалығы, олардың шектеулі қолжетімділігі, бөлінуінің қиындығы мен тазарту бұл мақсатта қолдану мүмкіншіліктерін шектейді. Осыған қарама-

тан, ферментативті синтез жоғарыда қамтылған мәселені жеңеді, таза ферменттердің төмен шығысы химия-ферментативті реакциялардың қолданылуын шектейді. Осылайша, $[^{15}\text{N}]$ аланин алу үшін жасалған ферментативті процесс көптеген спецификалық ферменттер мен байытылған субстраттардың комплексті қолданылуын қосады, және тек 1г өнім шығара алады [36]. Бір жағынан, генді инженерия әдісі препаратты көлемде көптеген ферментті препараттарды алуға мүмкіндік береді.

$[^{15}\text{N}]$ аминқышқылын алу тәсілдері $[^{15}\text{N}]$ аммонийлі және $[^{15}\text{N}]$ нитратты тұздарды ^{15}N -таңбасының көзі ретінде қолдануымен байланысты, сол уақытта ферментативті әдіс молекулаға ^{15}N изотобының жоғары дәрежесі қажет жағдайда, ең алдымен α -кетотуынды аминқышқылдарын аминирлеу есебінен $[^{15}\text{N}]$ аспарагин және глутамин қышқылын алуда тиімрек [37].

$[^{15}\text{N}]$ - таңбасын аминқышқылы молекуласына енгізудің жүргізілген тәсілдері $^{15}\text{NH}_3$ газды толықтырумен, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ тасығышының келесі активацияланумен клетканың иммобилизденуі, немесе өсу ортасында аминқышқылы $[^{15}\text{N}]$ негізін қалаушыларының концентрациясын оңтайландырумен байланысты [75,76]. Жоғарыда көрсетілген тәсілдер арқылы ^{15}N изотопты енгізілу дәрежесі 95% асатын, $[^{15}\text{N}]$ аспарагин қышқылын және $[^{15}\text{N}]$ аланин алынды. *E.coli* иммобилизденген клеткасы аспартаза көзі ретінде қолданылды, ол $[^{15}\text{N}]$ фумарлы қышқылын және $[^{15}\text{N}]$ фумаратты $[^{15}\text{N}]$ аспарагин қышқылына алмасуына бөгет жасайды, сол кезде $[^{15}\text{N}]$ аспарагин қышқылынан $[^{15}\text{N}]$ аланин алу үшін аспартаз-4-декарбоксилаза көзі ретінде *Pseudomonas decahee* бактериясын қолданылды. $[^{15}\text{N}]$ глутамин қышқылын $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ бар болған кезде аминқышқылы туыстары көмегімен *Brevibacterium lactofermentum* бактериясын ферменттеу процесі есебінен алды [38].

^{13}C изотобын аминқышқылы молекуласына енгізу үшін $[^{13}\text{C}]$ глюкозаны қолдана отырып, ұқсас тәсілмен алуға болады, бірақ, ферментативті реакция жүргізу кезінде жоғары дәрежеде байытылған $[^{13}\text{C}]$ глюкозаның көп мөлшері қажет, сондықтан әдіс $[^{13}\text{C}]$ аминқышқылдарын алуда тым қымбатқа түседі. Одан басқа, глюкозаның көп бөлігі (70% дейін) клетканы демалдыру процесіне шығындалады, сондықтан ББҚ молекуласын $[^{13}\text{C}]$ глюккозаны ферментативті тотықтыру арқылы көміртегі изотоптарымен таңбалау тиімсіз. Осылайша, $[^{13}\text{C}]$ глюкоза арқылы ферментативті алынған, $[^{13}\text{C}]$ глутаматты изотопты таңбалау дәрежесі 50% аспайды.

Сонымен қатар аминқышқылдарын алудың химия-ферментативті және биотехнологиялық тәсілдерін комбинациясын қолдану тиімді болып табылады. [39] Жұмыстарда триптофанның ^{13}C , ^2H , ^{15}N изотоптарымен молекуланың индольды сақинасы бойынша спецификалық изотоппен таңбаланған, оннан көп ұқсас түрлерін алу жолдары қарастырылған. Индолдардың моноизотоппен қаныққан туындылары әне олардың 4, 5 және 7- гидрокситуындылары *E.coli* бактериясының генетикалық құрастырылған штаммы көмегімен, триптофанның байытылған аналогына ферментативті алмасқан [40].

Қорытынды. Қорытындылай келе, тұрақты изотоптармен таңбаланған ББҚ алу жолдарының замануи әдебиеттерде көп берілуіне қарамастан, қазіргі

кезде сондай немесе басқа универсалды тәсіл арқылы таңбаланған²H, ¹³C, ¹⁵N және ¹⁸O ақуыздар мен аминқышқылдарын алуға болатын әдістер жоқтың қасы, бірақ түрлі жолдармен таңбаланған төменмолекулалы реагенттерді (субстраттар) қолдану арқылы изотоппен байытылған аминқышқылын алу үшін химия-ферментативті әдіс, сол химия-биохимиялық реакцияны қолдануға мүмкіндік береді. Тұрақты изотоптармен жоғары дәрежеде таңбаланған аминқышқылы мен ақуыздарды алуда биотехнологиялық тәсілдерді қолданған тиімді, ББҚ молекуласына тұрақты изотоптарды селективті енгізуге синтетикалық және ферментативті реакциялардың жиынтығын қолдану арқылы жетуге болады. ББҚ алу тәсілін таңдау зерттеу мақсаттарымен анықталады.

ӘДЕБИЕТ

- [1] Stryer L. Biochemistry. 3rd. W.H. Freeman, and Company. – New York, NY, USA, 1989.
- [2] Blaskovich M.A. Handbook on Syntheses of Amino Acids. General Routes to Amino Acids // Oxford University Press. – New York, 2010.
- [3] Hayashi T., Hamachi I. Traceless affinity labeling of endogenous proteins for functional analysis in living cells // *Acc. Chem. Res.* – 2012. – Vol. 45. – P. 1460-1469.
- [4] Bertini I., Felli I.C., Gonnelli L., Kumar M.V., Pierattelli R. ¹³C Direct-detection biomolecular NMR Spectroscopy in living cells // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2011. – Vol. 50. – P. 2339-2341.
- [5] Westler W.M., Stockman B.J. Correlation of carbon-13 and nitrogen-15 chemical shifts in selectively and uniformly labeled proteins by heteronuclear two-dimensional NMR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – P. 6256-6258.
- [6] Kainosho M., Torizawa T. Optimal isotope labeling for NMR protein structure determinations // *Nature.* – 2006. – Vol. 440. – P. 52-57.
- [7] Takeda M., Ikeya T. Automated structure determination of proteins with the SAIL-FLYA NMR method // *Nat. Protoc.* – 2007. – Vol. 2. – P. 2896-2902.
- [8] Guo C. High resolution measurement of methyl ¹³C(m)-¹³C and ¹H(m)-¹³C(m) residual dipolar couplings in large proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – P. 13984-13987.
- [9] Otten R., Chu B. Comprehensive and cost-effective NMR Spectroscopy of methyl groups in large proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – P. 2952-2960.
- [10] Ayala I., Hamelin O. An optimized isotopic labelling strategy of isoleucine-γ2 methyl groups for solution NMR studies of high molecular weight proteins // *Chem. Commun.* – 2012. – Vol. 48. – P. 1434-1436.
- [11] Pandey M.K., Vivekanandan S., Ahuja S. Determination of ¹⁵N chemical shift anisotropy from a membrane-bound protein by NMR Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – Vol. 116. – P. 7181-7189.
- [12] Elavarasi S.B., Kumari A., Dorai K. Using the Chemical Shift Anisotropy Tensor of Carbonyl Backbone Nuclei as a Probe of Secondary Structure in Proteins // *J. Phys. Chem. A.* – 2010. – Vol. 114. – P. 5830-5837.
- [13] Zhu J., Ye E., Terskikh V., Wu G. Solid-state ¹⁷O-NMR spectroscopy of large protein-ligand complexes // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2010. – Vol. 49. – P. 8399-8402.
- [14] Yu W., Dawson P.E., Zimmermann J. Carbon-deuterium bonds as probes of protein thermal unfolding // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – Vol. 116. – P. 6397-6403.
- [15] Torizawa T., Shimizu M. Efficient production of isotopically labeled proteins by cell-free synthesis: A practical protocol // *J. Biomol. NMR.* – 2004. – Vol. 30. – P. 311-325.
- [16] Kent S.B.H. Total chemical synthesis of proteins // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – Vol. 38. – P. 338-351.

[17] Metanis N., Keinan E., Dawson P.E. Traceless ligation of cysteine peptides using selective deselenization // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2010. – Vol. 49. – P. 7049-7053.

[18] Durek T., Alewood P.F. Preformed selenoesters enable rapid native chemical ligation at intractable sites // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2011. – Vol. 50. – P. 12042-12045.

[19] Shang S., Tan Z., Danishefsky S.J. Application of the logic of cysteine-free native chemical ligation to the synthesis of Human Parathyroid Hormone (hPTH) Proc // *Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 5986-5989.

[20] Reid C.M., Sutherland A. Synthesis of isotopically labeled α -amino Acids. In: Hughes A.B., editor. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Origins and Synthesis of Amino Acid.* – Vol. 1. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. – Weinheim, Germany, 2009. – P. 473-494.

[21] Corey E.J., Kürti L. *Enantioselective Chemical Synthesis.* 1st. Direct Book Publishing, LLC. – Dallas, TX, USA, 2010.

[22] Winkler F.J., Kühnl K., Medina R. Principles and results of stable isotope labelling of L- α -Aminoacids by combined chemical and enzymatic methods // *Isot. Environ. Health Stud.* – 1995. – Vol. 31. – P. 161-190.

[23] Sonke T., Kaptein B., Schoemaker H.E. Use of enzymes in the synthesis of amino acids. In: Hughes A.B., editor. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Origins and Synthesis of Amino Acid.* Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. – Weinheim, Germany, 2009. – P. 79-117.

[24] Chen Y., Goldberg S.L., Hanson R.L., Parker W.L. Enzymatic preparation of an (*S*)-amino acid from a racemic amino acid. *Org // Process Res. Dev.* – 2011. – Vol. 15. – P. 241-248.

[25] Kürti L., Czakó B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis.* Elsevier Academic Press; Amsterdam, The Netherlands: 2005.

[26] Vachal P., Jacobsen E.N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the Strecker Reaction // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124. – P. 10012-10014.

[27] Pellissier H. Recent developments in dynamic kinetic resolution // *Tetrahedron.* – 2011. – Vol. 67. – P. 3769-3802.

[28] Cappon J.J., Witters K.D., Baart J. Synthesis of L-histidine specifically labelled with stable isotopes // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* – 1994. – Vol. 113. – P. 318-328.

[29] Liu P., Yang X., Birman V.B., Houk K.N. Origin of enantioselectivity in benzotetramisole-catalyzed dynamic kinetic resolution of azlactones // *Org. Lett.* – 2012. – Vol. 14. – P. 3288-3291.

[30] Smolka MB, Zhou H, Purkayastha S, et al. Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis // *Anal Biochem.* – 2001. – Vol. 297. – P. 25-31.

[31] Cahill M.A., Wozny W., Schwall G., et al. Analysis of relative isotopologue abundances for quantitative profiling of complex protein mixtures labelled with the acrylamide / d3-acrylamide alkylation tag system // *Rapid Commun Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1283-90.

[32] Reynolds K.J., Yao X., Fenselau C. Proteolytic ^{18}O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent // *J. Proteome Res.* – 2002. – Vol. 1. – P. 27-33.

[33] Yao X., Freas A., Ramirez J., et al. Proteolytic ^{18}O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus // *Anal Chem.* – 2001. – Vol. 73. – P. 2836-42.

[34] Jin Z., Knierman M.D., Patrick J.S., et al. Evaluation of a stable isotope labeled whole protein for absolute protein quantitation using lc/ms/ms and multiple reaction monitoring // In: *Program and Abstract of the 54th ASMS Conference.* – Seattle, WA, 2006.

[35] Beynon R.J., Pratt J.M. Metabolic labeling of proteins for proteomics // *Mol Cell Proteomics.* – 2005. – Vol. 4. – P. 857-72.

[36] Staunton D., Schlinkert R., Zanetti G., et al. Cell-free expression and selective isotope labeling in protein NMR // *Magn Reson Chem.* – 2006. – Vol. 44. – P. 2-9.

[37] Anderson N.L., Hunter C.L., Becker G.W., et al. Developing peptide MRM-based assays for cardiovascular biomarker proteins in plasma using a hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer // In: Proceedings of the American Society for Mass Spectrometry, 53rd Annual ASMS Meeting, June 2005, San Antonio, TX, USA.

[38] Anderson L., Hunter C.L. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins // Mol Cell Proteomics. – 2006. – Vol. 5. – P. 573–88.

[39] Jin Z., Patrick J., Zhen Y., et al. Evaluation of a stable isotope labeled whole protein for absolute protein quantitation using LC/MS/MS and multiple reaction monitoring // In: Proceedings of the American Society for Mass Spectrometry, 54th Annual ASMS Meeting, June 2006, Seattle, WA, USA.

[40] Janecki D., Bemis K.G., Tegler T.J., et al. A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme // Anal Biochem. – 2007. – Vol. 369. – P. 18-26.

Резюме

С. Турганбай, А. Н. Сабитов, А. С. Курманбеков

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ, МЕЧЕННЫХ СТАБИЛЬНЫМИ ИЗОТОПАМИ ^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O

Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения. Именно поэтому разработка путей получения аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами, является актуальной задачей для современной биотехнологии. Эти изотопномеченные биологически активные соединения (БАС), полученные данным методом с различными уровнями изотопного обогащения, от селективно до равномерно меченых, являются удобными инструментами для разнопрофильных метаболических и биохимических исследований медицинской диагностики различных заболеваний химических синтезов разнообразных изотопномеченных соединений на их основе. Данный обзор охватывает современные биотехнологические и ферментативные методы синтеза аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O . Рассмотрены новые перспективы применения описанных методик синтеза аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами. В частности, содержатся примеры использования методов ядерного магнитного резонанса, инфракрасной и лазерной спектроскопии, а также масс-спектрологии в процессе биохимического синтеза вышеуказанных соединений и данные по дальнейшему применению полученных веществ.

Ключевые слова: меченые стабильные изотопы, аминокислоты, белки, микроорганизмы.

Summary

S. Turganbay, A. N. Sabitov, A. S. Kurmanbekov

METHODS OF PRODUCTION OF AMINO ACIDS AND PROTEINS, LABELED WITH STABLE ISOTOPES ^{2}N , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O

The tendencies towards the preferred use of stable isotopes in comparison with their radioactive counterparts are due to the absence of radiation hazard and the possibility of determining the localization of the label in the molecule by high-resolution methods. That is why the development of ways to obtain amino acids and proteins labeled with stable isotopes is an urgent task for modern biotechnology. These isotopically labeled biologically active compounds (BACs) obtained by this method with different levels of isotopic enrichment, from selectively to uniformly labeled, are convenient tools for various metabolic and biochemical studies of medical diagnostics of various diseases of chemical syntheses of various isotopically labeled compounds based on them. This review covers modern biotechnological and enzymatic methods for the synthesis of amino acids and proteins, stable isotopes ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O . New perspectives for the application of described methods of amino acid synthesis and proteins, stable stable isotopes were considered. In particular, there are examples of the use of methods of nuclear magnetic resonance, infrared and laser spectroscopy, as well as mass spectroscopy in the process of biochemical synthesis of the above-mentioned compounds and the further information provided.

Keywords: sword stable isotope, amino acids, proteins, microorganisms.