

УДК 579.871.08

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ [<sup>2</sup>H]ИНОЗИНА ВЫСОКОГО УРОВНЯ ДЕЙТЕРИРОВАННОСТИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ХЕМОГЕТЕРОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ *Bacillus subtilis*

© 2013 г. О. В. Мосин\*, В. И. Швец\*, Д. А. Складнев\*\*, И. Игнатов\*\*\*

\*Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 117571  
e-mail: mosin-oleg@yandex.ru

\*\*Государственный научно-исследовательский центр генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 113545  
e-mail: genetika@genetika.ru

\*\*\*Научно-исследовательский центр медицинской биофизики, София 1111  
e-mail: mbioph@dir.bg

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Осуществлен микробиологический синтез <sup>2</sup>H-меченого пуринового рибонуклеозида инозина (выход 3.9 г/л культуральной жидкости, КЖ) с использованием адаптированного к дейтерию штамма грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* в тяжеловодородной среде высокого уровня дейтерированности (99.8 атом. % <sup>2</sup>H) с 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* как источника <sup>2</sup>H-меченых ростовых субстратов, полученной в минимальной среде M9 с 98%-ной <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и 2%-ным [<sup>2</sup>H]метанолом. Фракционирование инозина из КЖ штамма-производителя производили адсорбцией (десорбцией) на поверхности активированного угля, экстракцией 0.3 М NH<sub>4</sub>-формиатным буфером (pH 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80%-ном этаноле и колоночной ИОХ на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0.3 М NH<sub>4</sub>-формиатным буфером с 0.045 М NH<sub>4</sub>Cl. Уровень дейтерированности инозина, исследованный методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), составил 5 атомов дейтерия (62.5% <sup>2</sup>H) с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атома дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

DOI: 10.7868/S0555109913030136

Природные нуклеозиды, меченные дейтерием (<sup>2</sup>H), представляют значительный научно-практический интерес для прикладной биохимии и микробиологии, многочисленных биохимических и диагностических целей [1], структурно-функциональных исследований [2], а также для изучения клеточного метаболизма [3]. Тенденция к их предпочтительному использованию обусловлена отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле спектроскопией <sup>1</sup>НЯМР [4], ИК- и лазерной спектроскопией [5], а также масс-спектрометрией [6]. Развитие технической и компьютерной оснащенности современных аналитических методов за последние годы позволило существенно повысить эффективность проведения биологических исследований *de novo*, а также изучать структуру и функции нуклеозидов и их аналогов на молекулярном уровне [7]. В частности, дейтерированные рибонуклеозиды и их аналоги применяются в матричных синтезах молекул дейтерированных РНК для изучения их пространственной структуры и конформационных изменений [8].

Важным фактором в исследованиях с дейтерированными нуклеозидами и их аналогами является их доступность. <sup>2</sup>H-меченые нуклеозиды могут быть синтезированы с использованием химических [9], ферментативных [10] и микробиологических методов [11]. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и <sup>2</sup>H-меченых субстратов и приводят к конечному продукту, представляющему собой рацемическую смесь D- и L-форм, для разделения которых требуются специальные методы [12]. Более тонкие химические технологии синтеза [<sup>2</sup>H]нуклеозидов связаны с комбинацией химических [13] и ферментативных [14] подходов.

Для многих научно-прикладных целей микробиология предлагает альтернативный микробиологический метод синтеза [<sup>2</sup>H]нуклеозидов, который характеризуется высокими выходами синтезируемых продуктов, эффективным включением дейтерия в молекулы и сохранению природной конфигурации синтезируемых соединений [15]. Традиционным подходом при этом является выращивание штаммов-производителей в средах с максимальными концентрациями <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и дейтериро-

ванных субстратов [16]. Однако основным препятствием практической реализации этого метода является недостаток  $^2\text{H}$ -меченых ростовых субстратов высокого уровня дейтерированности. Прежде всего это связано с ограниченной доступностью и дороговизной высокоочищенного дейтерия, выделяемого из природных источников. Природная распространенность дейтерия составляет 0.015 атом. %, однако несмотря на невысокое содержание дейтерия в пробах, разработанные в последние годы методы обогащения и очистки дейтерия позволяют получать  $^2\text{H}$ -меченые субстраты высокого уровня изотопной чистоты [17].

Начиная с первых экспериментов по выращиванию природных объектов в тяжелой воде, в нашей стране разрабатываются подходы с использованием гидролизатов дейтерированной биомассы бактерий и микроводорослей как ростовых субстратов для биосинтеза штаммов-продуцентов [18]. Эксперименты обнаружили бактериостатический эффект  $^2\text{H}_2\text{O}$ , заключающийся в ингибировании жизненно-важных функций клетки, оказываемой 50%-ным  $^2\text{H}_2\text{O}$  на растительные клетки [19] и 80–90%-ным  $^2\text{H}_2\text{O}$  на клетки простейших и бактерий [20]. Попытки использовать для синтеза в  $^2\text{H}_2\text{O}$  природных объектов различной таксономической принадлежности, включая бактерии, микроводоросли и дрожжи [21], не получили широкого распространения в биотехнологии из-за трудности биосинтеза, использования комплексных ростовых сред, сложности технологической схемы и т.п. Поэтому целый ряд практических вопросов биосинтеза природных дейтерированных соединений в  $^2\text{H}_2\text{O}$  остается неизученным.

Более перспективны технологические схемы синтеза с использованием в качестве дейтерированных ростовых субстратов биомассы метилотрофных бактерий, ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) и сериновому пути фиксации углерода, интерес к которым возрастает благодаря интенсивному развитию технологии химического синтеза метанола [22, 23]. Усваиваемость метилотрофной биомассы клетками простейших организмов и эукариот составляет 85–98%, а их производительность, измеренная по уровню биоконверсии метанола в клеточные компоненты, достигает 50–60% [24]. Как было показано нами ранее, метилотрофные бактерии — неприхотливые объекты, растут на минимальных средах с 2–4% [ $^2\text{H}$ ]метанола, в которых другие бактерии не размножаются, и достаточно легко адаптируются к максимальным концентрациям  $^2\text{H}_2\text{O}$ , что существенно для биосинтеза дейтерированных природных соединений [25, 26].

Большой научно-практический интерес к использованию дейтерированной биомассы мети-

лотрофных бактерий для биосинтеза рибонуклеозидов определил направление исследования.

Цель работы — изучение принципиальной возможности микробиологического синтеза [ $^2\text{H}$ ]инозина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* за счет использования в качестве источника дейтерированных субстратов 99.8%-ной  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2%-ного гидролизата дейтеро-биомассы факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, полученной со среды с максимальным содержанием дейтерия.

## МЕТОДИКА

**Объект исследования.** Объектом исследования являлся полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу (потребность 10 мг/л) штамм спорообразующих аэробных грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 — продуцент инозина, полученный из коллекции культур ГОСНИИ Генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов. Исходный штамм был предварительно адаптирован к дейтерию рассевом до отдельных колоний на 2%-ном агаре со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации  $^2\text{H}_2\text{O}$  и последующей селекции по признаку устойчивости к  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Для приготовления ростовых сред использовали  $^2\text{H}_2\text{O}$  (99.8 атом. %  $^2\text{H}$ ),  $^2\text{HCl}$  (95.5 атом. %  $^2\text{H}$ ) и [ $^2\text{H}$ ]метанол (97.5 атом. %  $^2\text{H}$ ) (ЗАО “Изотоп”, Санкт-Петербург, Россия). Неорганические соли и D, L-глюкозу (“Reanal”, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ,  $^2\text{H}_2\text{O}$  дистиллировали над  $\text{KMnO}_4$  с последующим контролем изотопной чистоты  $^1\text{H}$ ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (“Bruker Daltonics”, ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт  $\text{Me}_4\text{Si}$ ). Согласно данным  $^1\text{H}$ ЯМР, уровень дейтерированности ростовой среды был ниже на 8–10 атом. % изотопной чистоты исходной  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

**Биосинтетический [ $^2\text{H}$ ]инозин.** [ $^2\text{H}$ ]инозин получен с выходом 3.9 г/л на тяжеловодородной (ТВ) среде (89–90% атом.  $^2\text{H}$ ). В качестве источника  $^2\text{H}$ -меченых ростовых субстратов использовали 2%-ный гидролизат дейтерированной биомассы метанолассимилирующего штамма факультативных грамотрицательных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, полученного селекцией в условиях многоступенчатой адаптации на твердой (2%-ный агар) минимальной среде М9 ((г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 3,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 6,  $\text{NaCl}$  — 0.5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1) с 2%-ным [ $^2\text{H}$ ]метанолом и ступенчато увеличивающимся

градиентом концентрации тяжелой воды (от 0, 24.5, 73.5 до 98% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O). Сырую метилотрофную биомассу (выход 200 г/л среды) суспендировали в 100 мл 0.5 н. <sup>2</sup>HCl (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O), автоклавировали 30–40 мин при 0.8 атм. Полученную суспензию нейтрализовали 0.2 н. KOH (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O), до pH 7.0, после чего использовали в качестве источника ростовых субстратов при выращивании штамма-продуцента инозина. Для этого посевной материал в количестве 5–6 мас. % переносили в ТВ-среду с <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (мас. %): глюкоза – 12, гидролизат дейтеробиомассы *B. methylicum* – 2, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1, CaCO<sub>3</sub> – 2, аденин – 0.01, урацил – 0.01. В качестве контроля использовали протонированную среду с 2%-ным белково-витаминным концентратом (ББК) дрожжей. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера на 500 мл со 100 мл среды в течение 3–4 сут при 32°C в условиях интенсивной аэрации на орбитальной качалке S-380 (“Biorad Labs”, Венгрия). Бактериальный рост контролировали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных (2%-ный агар) сред, а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при λ = 540 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень биоконверсии углеродного субстрата определяли, используя глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4).

**Аналитическое определение инозина.** Определение проводили в пробах КЖ, объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150 × 150 мм) с закрепленным слоем флуоресцирующего носителя Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) с использованием стандартного набора рибонуклеозидов фирмы “Beckman-Spinco” (США) в системе растворителей: н-бутанол–уксусная кислота–вода (2 : 1 : 1, об. %). Элюцию пятен проводили 0.1 н. HCl. УФ-поглощение элюатов определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

**Выделение [<sup>2</sup>H]инозина.** Пробы КЖ разделяли на центрифуге Т-26 (“Carl Zeiss”, ФРГ) при 2000 g, 10 мин, концентрировали при 10 мм рт. ст. в роторном испарителе РВО-6 (“Microtechna”, Венгрия) до объема, в два раза меньше исходного, добавляли ацетон при 0°C (3 × 5 мл). Смесь выдерживали ~10 ч при 4°C, осадок отделяли центрифугированием при 1200 g, 5 мин. К супернатанту добавляли 10 г активированного угля, выдерживали 24 ч при 4°C. Водную фракцию отделяли фильтрованием, к твердой фазе добавляли 20 мл 50%-ного этанола в 25%-ном аммиаке (1 : 1, об. %), нагревали при 60°C с обратным водяным холодильником. Через 2–3 ч смесь фильтровали и упарива-

ли при 10 мм рт. ст. Продукт экстрагировали 0.3 М NH<sub>4</sub>-формиатным буфером (pH 8.9), промывали ацетоном (2 × 10 мл), сушили над безводным CaCl<sub>2</sub>. Инозин перекристаллизовывали из 80%-ного этанола ([α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +1.61°, выход 3.1 г/л, 80%). Конечная очистка инозина производилась методом ИОХ на откалиброванной колонке (150 × 10 мм) с катионообменной смолой AG50WX 4 (“Pharmacia”, США). Колонку уравнивали 0.3 М NH<sub>4</sub>-формиатным буфером (pH 8.9) с 0.045 М NH<sub>4</sub>Cl и элюировали тем же буфером в условиях изократической элюции (хроматографическая чистота 92%). Элюат подвергали лиофильной сушке и хранили в запаянных ампулах при –4°C.

**[<sup>2</sup>H]инозин.** Выход 3.1 г/л (80%); T<sub>пл.</sub> = 68–70°C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +1.61° (этанол); R<sub>f</sub> = 0.5; pK<sub>a</sub> = 1.2 (фосфатный буфер, pH 6.87). УФ-спектр (0.1 н. HCl): (λ<sub>макс</sub> = 249 нм, ε<sub>249</sub> = 7100 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>); масс-спектр БА (глицериновая матрица Cs<sup>+</sup>, ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0.6–0.8 мА): [M + H]<sup>+</sup> m/z (I, %): 273, 20% (4 атом. <sup>2</sup>H); 274, 38% (5 атом. <sup>2</sup>H); 275, 28% (6 атом. <sup>2</sup>H); 276, 14% (7 атом. <sup>2</sup>H), [A + H]<sup>+</sup> 136, 46%; [B + H]<sup>+</sup> 138, 55%; [B – HCN]<sup>+</sup> 111, 49%; [B – HCN]<sup>+</sup> 84, 43%.

**Гидролиз белков биомассы.** К 10 мг сухой биомассы после обработки смесью хлороформ–метанол–ацетон (2 : 1 : 1, об. %) добавляли 5 мл 6 н. <sup>2</sup>HCl (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O). Ампулы выдерживали при 110°C в течение ~24 ч. После этого реакцию массу суспендировали в горячей <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, фильтровали. Гидролизат упаривали при 10 мм рт. ст. Остатки <sup>2</sup>HCl удаляли путем выдерживания в эксикаторе над твердым NaOH.

**Гидролиз внутриклеточных полисахаридов.** 50 мг сухой биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл дист. H<sub>2</sub>O и 1.6 мл 25%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) и кипятили с обратным водяным холодильником в течение ~90 мин. После охлаждения реакцию смесь суспендировали в одном объеме горячей дист. H<sub>2</sub>O и нейтрализовали 2 н. Ba(OH)<sub>2</sub> (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) до pH 7.0. Выпавший осадок BaSO<sub>4</sub> отделяли центрифугированием (1500 g, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали при 10 мм рт. ст.

**УФ-спектры.** Регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в диапазоне длин волн λ = 220–280 нм.

**Аминокислотный анализ.** Анализ гидролизатов биомассы проводили на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Netheler-Hinz”, ФРГ) (230 × 3.2); неподвижная фаза – сульфированная стирольная (7.25% сшивки) смола UR-30 (“Beckman-Spinco”, США); диаметр гранул 25 мкм; элюент 0.2 н. Na-цитратный буфер

(рН 2.5); рабочее давление 50–60 атм; скорость подачи элюента 18.5 мл/ч; нингидрина 9.25 мл/ч; детекция при  $\lambda = 570$  нм и  $\lambda = 440$  нм (для пролина).

**Анализ углеводов.** Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer Smartline (“Knauer”, ФРГ), снабженном насосом Gilson (“Gilson Inc.”, ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 (“Water Associates”, ФРГ); неподвижная фаза: Ultrasorb CN; габаритные размеры колонки 250 × 10 мм; диаметр гранул 10 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил–вода (75 : 25, об. %); скорость подачи 0.6 мл/мин.

**Масс-спектры ББА.** Получены на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ (“Fisons VG Analytical”, США), снабженным цезиевым источником Cs<sup>+</sup> на глицериновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0.6–0.8 мА.

**Масс-спектры электронного удара (ЭУ).** Получены на приборе MB-80A (“Hitachi”, Япония) с двойным фокусированием (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, температура катодного источника 180–200°C) после модификации аминокислот в метиловые эфиры N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот по разработанной ранее методике [27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение <sup>2</sup>H-меченой биомассы *B. methylicum*.

В качестве продуцента инозина использовали мутантный полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 (предварительно адаптированный к дейтерию селекцией до отдельных колоний), который из-за нарушения метаболических путей регуляции биосинтеза пуриновых рибонуклеозидов синтезирует в стандартных условиях выращивания (БВК-среда, поздний экспоненциальный рост, 32°C) 17–20 г инозина на 1 л КЖ [28]. Максимальный выход инозина достигался при использовании протонированной среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии глюкозу (не менее 12 мас. %), а в качестве источника ростовых факторов и аминного азота – 2%-ный БВК дрожжей. При проведении биосинтеза требовалось заменить протонированные ростовые субстраты их дейтерированными аналогами, а также использовать <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O высокого уровня изотопной чистоты. Для решения поставленной задачи использовали автолизированную биомассу адаптированного к дейтерию грамотрицательного штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, ассимилирующего метанол по рибулозо-5-монофосфатному циклу фиксации углерода, который благодаря 50–60%-ному уровню биоконверсии метанола (при эффектив-

ности конверсии 15.5–17.3 г сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) и устойчивому росту в минимальной дейтерированной среде М9 с <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и [<sup>2</sup>H]метанолом оказался очень удобным источником для наработки дейтеро-биомассы, а затраты на биоконверсию определяются, в основном, стоимостью <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и [<sup>2</sup>H]метанола [29]. Проведение адаптации для *B. methylicum* определялось необходимостью улучшения ростовых характеристик штамма и достижения высокого выхода микробной биомассы в максимально дейтерированной среде М9. Для этого использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O в ростовых средах М9 (от 24.5, 49.0, 73.5 до 98% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O<sup>1</sup>) в присутствии 2%-ного метанола и его дейтерированного аналога, так как предполагалось, что постепенное привыкание клеток к <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O будет оказывать благоприятный эффект на ростовые параметры штамма.

Для изучения влияния уровня дейтерированности источника углерода на ростовые параметры штамма в опытах (1, 3, 5, 7, 9) использовали протонированный метанол, а в опытах (2, 4, 6, 8, 10) [<sup>2</sup>H]метанол (табл. 1). Согласно полученным данным, замена протонированного метанола его дейтерированным аналогом в условиях одинаковой концентрации <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O в среде приводила к небольшим уменьшениям ростовых характеристик штамма (табл. 1, опыты 2, 4, 6, 8, 10). Поэтому в дальнейших опытах использовали среды М9 с <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и [<sup>2</sup>H]метанолом. При росте исходного штамма *B. methylicum* в контрольной протонированной среде с водой и метанолом продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации составили 20 и 2.2 ч, а выход микробной биомассы 200 г на 1 л КЖ (табл. 1, опыт 1). В промежуточных опытах (2–10) биосинтетические параметры изменялись пропорционально концентрации <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (табл. 1). 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 опыте 10 с использованием максимально дейтерированной среды с 98%-ной <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и 2%-ным [<sup>2</sup>H]метанолом, где продолжительность лаг-периода и время генерации увеличивались в 3 и 2.2 раза по сравнению с контрольными условиями (табл. 1, опыт 1) на обычной воде и метаноле, а выход микробной биомассы уменьшался в 3.1 раза. Улучшить ростовые характеристики штамма *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9 позволила адаптация к дейтерию, условия которой показаны в опыте 10<sup>1</sup> (табл. 1). За ходом адаптации наблюдали, сни-

<sup>1</sup> Здесь и далее использованы проценты по объему.

**Таблица 1.** Условия адаптации, изотопный состав ростовых сред и характеристики роста *B. methylicum*

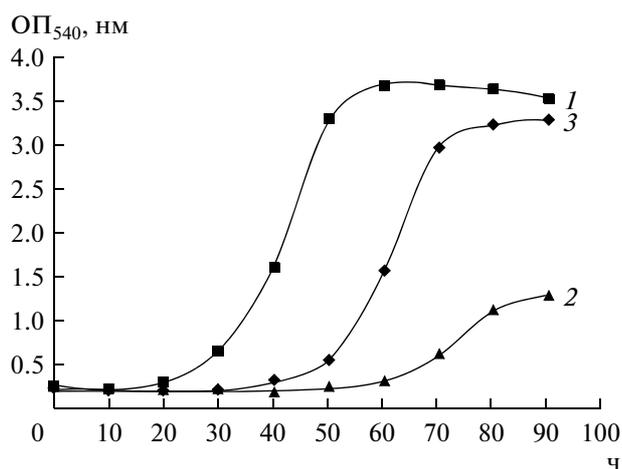
Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лаг-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H <sub>2</sub> O	<sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	метанол	[ <sup>2</sup> H] метанол			
1	98.0	0	2	0	20	100	2.2
2	98.0	0	0	2	30	92.3	2.4
3	73.5	24.5	2	0	32	90.6	2.4
4	73.5	24.5	0	2	34	85.9	2.6
5	49.0	49.0	2	0	40	70.1	3.0
6	49.0	49.0	0	2	44	60.5	3.2
7	24.5	73.5	2	0	45	56.4	3.5
8	24.5	73.5	0	2	49	47.2	3.8
9	0	98.0	2	0	58	32.9	4.4
10	0	98.0	0	2	60	30.1	4.9
10'	0	98.0	0	2	40	87.0	2.8

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

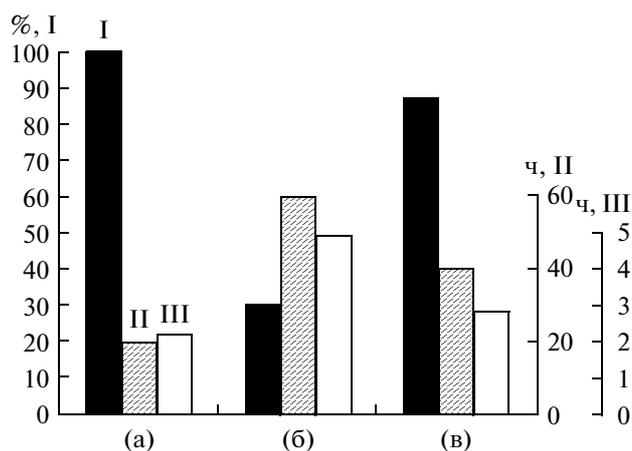
мая динамики роста исходного (рис. 1, кривая 2) и адаптированного к дейтерию (рис. 1, кривая 3) штамма *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9, содержащей 98%-ную <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и 2%-ный  $[^2\text{H}]$ метанол (рис. 1, кривая 1 (контроль), получен в протонированной среде), а также по изменению продолжительности лаг-периода, времени генерации и выходов микробной биомассы (рис. 2а–2в). В отличие от адаптированного

штамма (рис. 1, кривая 3), динамика роста исходного штамма (рис. 1, кривая 2) в максимальной дейтерированной среде ингибировались дейтерием.

Согласно данным эксперимента выход микробной биомассы у адаптированного штамма *B. methylicum* (рис. 2в) уменьшался на 13% по сравнению с контрольными условиями (рис. 2а) при увеличении времени генерации до 2.8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч (рис. 2в). По-



**Рис. 1.** Динамики роста *B. methylicum* в различных экспериментальных условиях: исходный метилотроф в протонированной среде М9 с обычной водой и метанолом (1); исходный метилотроф в максимально дейтерированной среде М9 (2); адаптированный к дейтерию метилотроф в максимально дейтерированной среде М9 (3).



**Рис. 2.** Выход биомассы (% от контроля, I) *B. methylicum*, величина лаг-периода (ч, II) и время генерации (ч, III) в различных экспериментальных условиях: исходный метилотроф в протонированной среде М9 с обычной водой и метанолом (а); в максимально дейтерированной среде М9 (б); адаптированный к дейтерию на максимально дейтерированной среде М9 (в).

**Таблица 2.** Аминокислотный состав гидролизата биомассы факультативной метилотрофной бактерии *B. methylisum*, полученный с максимально дейтерированной среды М9 с 98%-ной  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2%-ным [ $^2\text{H}$ ]метанолом и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, %	Величина молекулярного иона производных аминокислот [M] <sup>++</sup>	Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы <sup>**</sup>	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода <sup>***</sup>
Глицин	9.69	324	2	90.0
Аланин	13.98	340	4	97.5
Валин	3.74	369	4	50.0
Лейцин	7.33	383	5	49.0
Изолейцин	3.64	383	5	49.0
Фенилаланин	3.94	420	8	95.0
Тирозин	1.82	669	7	92.8
Серин	4.90	355	3	86.6
Треонин	5.51	не детектировался	—	—
Метионин	2.25	не детектировался	—	—
Аспарагин	9.59	396	2	66.6
Глутаминовая кислота	10.38	411	4	70.0
Лизин	3.98	632	5	58.9
Аргинин	5.27	не детектировался	—	—
Гистидин	3.72	не детектировался	—	—

\* Данные получены для метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

\*\* При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH- и амино NH<sub>2</sub>-группах молекула аминокислот не учитывались из-за легкости изотопного ( $^1\text{H}$ – $^2\text{H}$ ) обмена.

\*\*\* Прочерк означает отсутствие данных.

сле переноса в протонированную среду адаптированный штамм возвращался к нормальному росту после некоторого лаг-периода, что наблюдалось для других адаптированных нами штаммов бактерий [30]. Эффект реверсии роста в протонированной(дейтерированной) средах доказывает, что адаптация к  $^2\text{H}_2\text{O}$  является фенотипическим явлением, хотя не исключается, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же фенотипического признака в средах различного изотопного состава. В целом, улучшенные ростовые характеристики адаптированного метилотрофа существенно упрощают схему получения дейтеробиомассы, оптимальным условиям которой удовлетворяет максимально дейтерированная среда М9 с 98%-ной  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2%-ным [ $^2\text{H}$ ]метанолом с инкубационным периодом 3–4 сут при 35°C.

**Микробиологический синтез [ $^2\text{H}$ ]инозина.** Стратегия биосинтеза  $^2\text{H}$ -меченого инозина за счет использования в качестве ростовых субстратов метилотрофной биомассы *B. methylisum* разрабатывалась с учетом способности метилотрофных бактерий синтезировать большое количество белка (выход 50% от массы сухого вещества), 15–17% полисахаридов, 10–12% липидов (в основ-

ном, фосфолипиды) и 18% зольных веществ [31]. Для обеспечения высоких выходов этих соединений и минимизации реакций обратного ( $^1\text{H}$ – $^2\text{H}$ ) обмена в аминокислотных остатках молекул белков гидролиз биомассы проводили автоклавированием в 0.5 н.  $^2\text{HCl}$  (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ). Поскольку штамм *B. subtilis* – продуцент инозина является полиауксотрофным штаммом, нуждающимся для роста в тирозине и гистидине, исследовали качественный и количественный состав ароматических аминокислот гидролизата метилотрофной биомассы, полученного в максимально дейтерированной среде с 98%-ной  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2%-ным [ $^2\text{H}$ ]метанолом, а также уровни их дейтерированности (табл. 2). Качественный и количественный состав аминокислот метилотрофного гидролизата изучали на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Nethleler-Hinz”, ФРГ) с сульфированной смолой UR-30, а уровни дейтерированности молекул – масс-спектрометрией ЭУ метиловых эфиров N(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных производных аминокислот, полученных обработкой смеси белкового гидролизата дансилхлоридом и диазометаном. Метилотрофный гидролизат представлен пятнадцатью идентифицированными

аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при  $\lambda = 440$  нм) при содержании тирозина и гистидина в 1 г сухого метилотрофного гидролизата 1.82 и 3.72%, что удовлетворяет ауксотрофности штамма-производителя в этих аминокислотах. Содержания других аминокислот в гидролизате также сопоставимы с потребностями штамма в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в синтезируемый продукт, служат высокие уровни дейтерированности молекул аминокислот, которые варьируют от 49% для лейцина(изолейцина) до 97.5% для аланина (табл. 2). Это позволило использовать гидролизат дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum* как источник ростовых субстратов для выращивания штамма *B. subtilis* – производителя инозина.

Ростовые и биосинтетические характеристики штамма-производителя инозина *B. subtilis* изучали в протонированной БВК-среде с обычной водой и 2%-ным БВК дрожжей и ТВ-среде с 98%-ной <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* (рис. 3). Во всех опытах отмечена корреляция в характере изменения ростовой динамики *B. subtilis* (рис. 3, кривые 1, 1'), выхода инозина (рис. 3, кривые 2, 2') и ассимиляции глюкозы (рис. 3, кривые 3, 3'). Максимальный выход инозина (17 г/л) зафиксирован на протонированной БВК-среде при уровне ассимилируемой глюкозы 10 г/л (рис. 3, кривая 2). На ТВ-среде выход инозина снижался в 4.4 (3.9 г/л) (рис. 3, кривая 2'), а уровень ассимиляции глюкозы – в 4 раза (рис. 3, кривая 3'). Экспериментальные данные показали, что при росте в ТВ-среде глюкоза ассимилируется менее эффективно, чем в контрольных условиях.

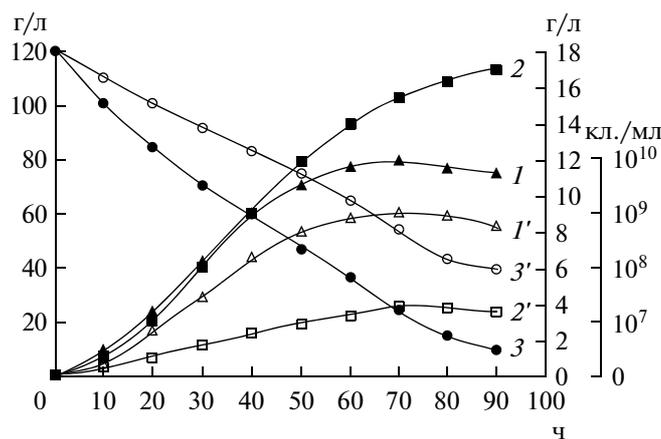
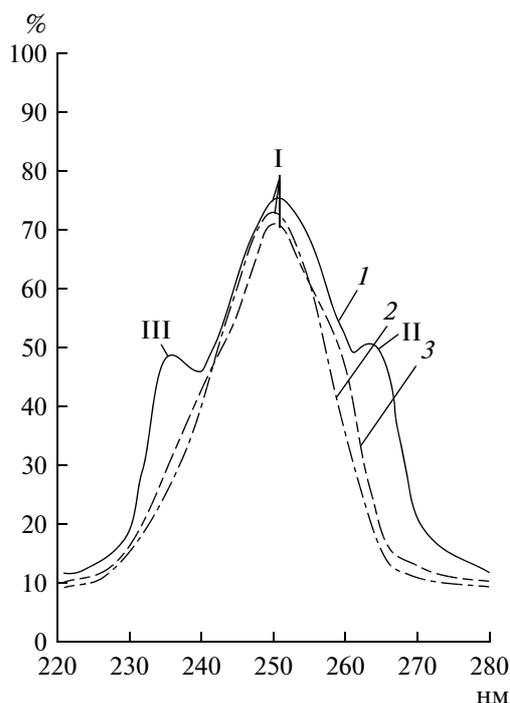


Рис. 3. Динамики роста (клет./мл) *B. subtilis* (1, 1'), накопления инозина в КЖ (г/л) (2, 2') и ассимиляции глюкозы (г/л) (3, 3') в различных экспериментальных условиях: протонированная БВК-среда (1, 2, 3); ТВ-среда с 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* (1', 2', 3').

Полученный результат требовал изучения содержания глюкозы и других внутриклеточных углеводов в биомассе штамма-производителя *B. subtilis*, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Ultrasorb CN, 10 мкм, 10 × 250 мм с подвижной фазой ацетонитрил–вода (75 : 25, об. %) (табл. 3). Фракция внутриклеточных углеводов в табл. 3 представлена моносахаридами (глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), а также четырьмя другими неидентифицированными углеводами с временами удерживания 3.08 (15.63%), 4.26 (7.46%), 7.23 (11.72%) и 9.14 (7.95%) мин (не показаны). Как ожидалось, выход глюкозы в

Таблица 3. Качественный и количественный состав внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в ТВ-среде и уровни дейтерированности молекул

Углевод	Содержание в биомассе, %		Уровни дейтерированности молекул, %
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в ТВ-среде	
Глюкоза	20.01	21.40	80.6
Фруктоза	6.12	6.82	85.5
Рамноза	2.91	3.47	90.3
Арабиноза	3.26	3.69	90.7
Мальтоза	15.30	11.62	—
Сахароза	8.62	не детектировалась	—



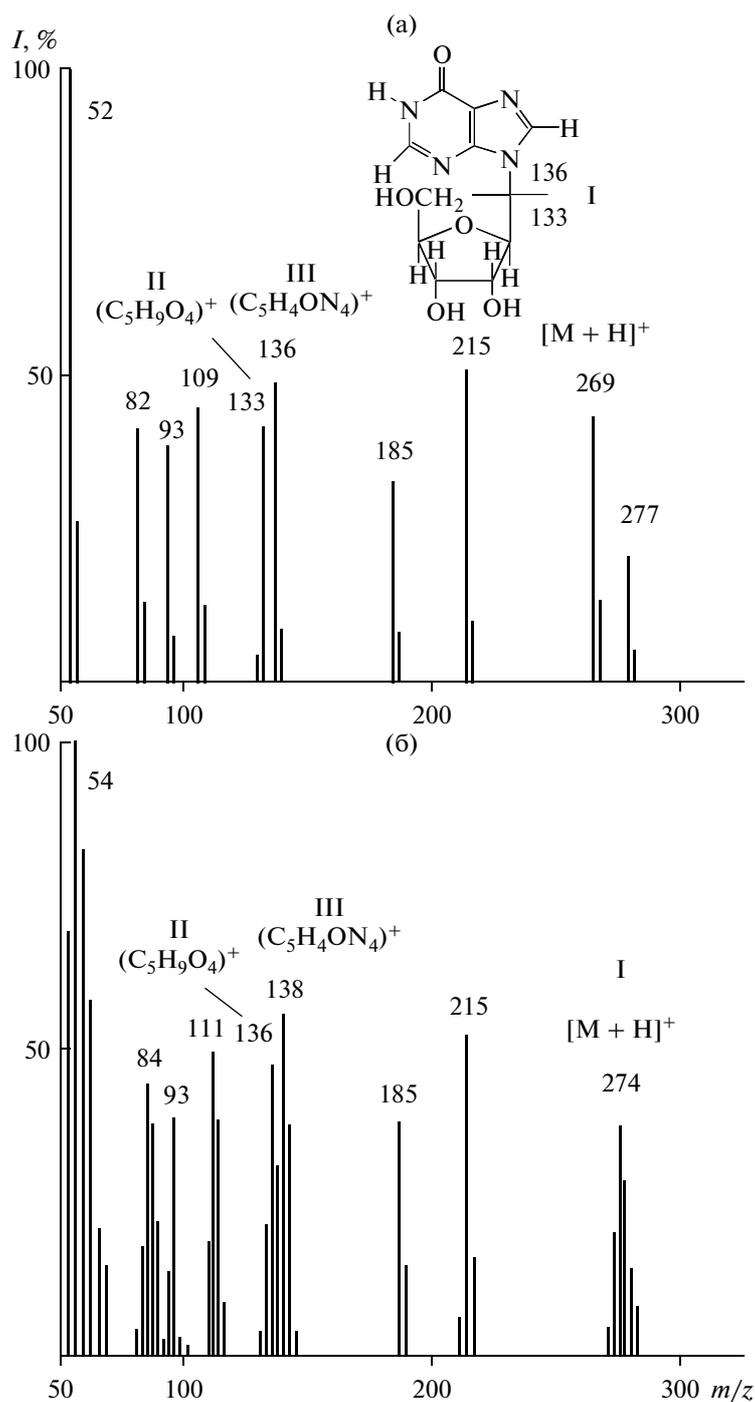
**Рис. 4.** Спектры УФ-поглощения (%) инозина (0.1 н. раствор HCl): исходная КЖ после выращивания штамма продуцента *B. subtilis* в ТВ-среде (1); природный инозин (2); инозин, выделенный из КЖ штамма-продуцента (3). В качестве контроля использовали природный инозин (2): I – инозин, II и III – вторичные метаболиты.

дейтерированном гидролизате составляет 21.4% от сух. массы, т.е. выше, чем фруктозы (6.82%), рамнозы (3.47%), арабинозы (3.69%) и мальтозы (11.62%) (табл. 3). Их выходы существенно не отличались от контроля на H<sub>2</sub>O, за исключением сахарозы, которая не детектируется в дейтерированном гидролизате. Уровни дейтерированности углеводов составили 90.7% для арабинозы до 80.6% для глюкозы.

**Выделение [<sup>2</sup>H]инозина из КЖ.** Применение комбинации физико-химических методов для выделения биосинтетического <sup>2</sup>H-меченого инозина из КЖ штамма-продуцента диктовалось необходимостью получения инозина высокой степени хроматографической чистоты, не менее 95%. Поскольку в КЖ наряду с инозином присутствуют примеси неорганических солей, белков и полисахаридов, а также сопутствующие вторичные метаболиты нуклеиновой природы (аденозин, гуанозин) и непрореагировавшие субстраты (глюкоза, аминокислоты), проводилось ступенчатое фракционирование КЖ с целью выделения [<sup>2</sup>H]инозина. Повышенная чувствительность инозина к кислотам и щелочам и его нестабильность при выделении требовали использование кислот-

ных и щелочных растворов низкой концентрации, а также проведения выделения при низких температурах, избегая длительного перегрева реакционной смеси. Фракционирование КЖ заключалось в низкотемпературном осаждении высокомолекулярных примесей органическими растворителями – ацетоном и метанолом, адсорбции(десорбции) на поверхности активированного угля, экстракции продукта, перекристаллизации и ИОХ. Белки и полисахариды удаляли низкотемпературным осаждением ацетоном при 4°C, проводя последующую адсорбцию суммы рибонуклеозидов активированным углем на холоду. Десорбированные рибонуклеозиды извлекали из прореагировавшей твердой фазы элюцией этанольно-аммиачным раствором при 60°C, а сам инозин экстракцией 0.3 М NH<sub>4</sub>-формиатным буфером (рН 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80%-ном этаноле. Окончательная стадия очистки заключалась в колоночной ИОХ на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0.3 М NH<sub>4</sub>-формиатным буфером с 0.045 М NH<sub>4</sub>Cl со сбором фракций при R<sub>f</sub> = 0.5. Данные по выделению инозина из КЖ штамма-продуцента представлены в виде спектров УФ-поглощения на рис. 4, кривые 1–3. Наличие в полученном образце (рис. 4, кривая 3) основной полосы поглощения I, соответствующей природному инозину ( $\lambda_{\text{макс}}$  249 нм,  $\epsilon_{249}$  7100 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) и отсутствие вторичных метаболитов II и III доказывает его однородность и эффективность разработанного метода выделения.

**Изучение уровня дейтерированности [<sup>2</sup>H]инозина.** Уровень дейтерированности инозина исследовали методом масс-спектрометрии ББА из-за высокой чувствительности, позволяющей детектировать 10<sup>-8</sup>–10<sup>-10</sup> моль вещества в пробе, что существенно выше, чем при использовании <sup>1</sup>НЯМР-спектроскопии [32]. Для этого получали масс-спектры ББА дейтерированного и протонированного инозина, по разности величин пиков молекулярных ионов, для которых проводили расчет уровня дейтерированности молекулы. Формирование пика молекулярного иона инозина в масс-спектрометрии ББА сопровождался миграцией протона Н<sup>+</sup>. Биосинтетический <sup>2</sup>H-меченый инозин (масс-спектр приведен на рис. 5б относительно контроля (рис. 5а)), представлял смесь изотопнозамещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пик молекулярного иона инозина [M + H]<sup>+</sup> полиморфно расщеплялся на отдельные кластеры с примесью молекул со статистическим набором массовых чисел m/z с различным вкладом в суммарный уровень дейтерированности молекулы. Его подсчет проводили по вкладу наиболее интенсивного пика молекулярного иона (пик с наибольшим вкладом в уровень дейтерирован-



**Рис. 5.** Масс спектры ББА инозина (глицериновая матрица) в различных экспериментальных условиях: природный инозин (а); [<sup>2</sup>H]инозин, выделенный из ТВ-среды (б). Интервал сканирования при  $m/z$  50–350, базовые пики с относительной интенсивностью 100% при  $m/z$  52 и  $m/z$  54, условия ионизации: цезиевый источник, ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0.6–0.8 мА. Разрешающая способность 7500 усл. ед. *I* – относительная интенсивность пиков (%). I – инозин, II – рибозный фрагмент, III – гипоксантиновый фрагмент.

ности), зарегистрированным в данных условиях масс-спектрометром. Этим условиям удовлетворял пик  $[M + H]^+$  при  $m/z$  274, 38% (вместо  $[M + H]^+$  при  $m/z$  269, 42% в контрольных условиях

(рис. 5а)), что соответствует включению 5 атомов дейтерия в молекулу инозина (рис. 5б). В пике молекулярного иона инозина также фиксировались менее интенсивные пики с примесями молекул с

**Таблица 4.** Величины пиков  $[M + H]^+$  в масс-спектрах ББА и уровни дейтерированности инозина, выделенного с ТВ-среды

Величина пика $[M + H]^+$	Вклад в уровень дейтерированности, мол. %	Количество атомов дейтерия	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода*
273	20	4	20.0
274	38	5	62.5
275	28	6	72.5
276	14	7	87.5

\* При вычислении уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при гидроксильных OH-группах, а также имидазольные NH-протоны при гетероатомах азота не учитывались из-за легкости изотопного ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ ) обмена в  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

включением 4 ( $m/z$  273, 20%), 5 ( $m/z$  274, 38%), 6 ( $m/z$  275, 28%) и 7 атомов дейтерия ( $m/z$  276, 14%) (табл. 4).

С учетом вклада пиков молекулярных ионов суммарный уровень дейтерированности (УД) молекулы инозина, вычисленный по нижеприведенной формуле, составил 62.5% от общего количества атомов водорода в углеродном скелете молекулы.

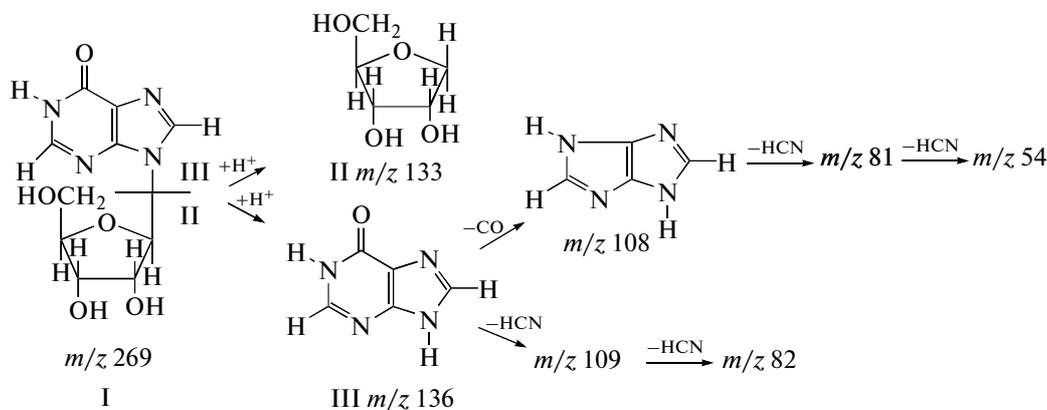
$$\text{УД} = \frac{[M]_{r1}^+ C_1 + [M]_{r2}^+ C_2 + \dots + [M]_{rn}^+ C_n}{\Sigma C_n},$$

(где  $[M]_r^+$  – величины пиков молекулярного иона инозина;  $C_n$  – вклад в уровень дейтерированности, мол. %).

Более точную информацию о распределении дейтерия в молекуле инозина дает фрагментация молекулы, показанная на рис. 6. Пути фрагментации молекулы инозина методом ББА приводят к распаду инозина I на фрагмент рибозы II при массовом соотношении  $m/z$  133 и гипоксантиновый фрагмент III при  $m/z$  136 (их распад сопровождается миграцией протона  $\text{H}^+$ ), который в свою очередь расщепляется на ряд менее низкомолекулярных осколочных фрагментов при  $m/z$  109, 108, 82, 81 и 54 за счет элиминирования  $\text{HCN}$  и  $\text{CO}$  из ги-

поксантина (рис. 6). Следовательно, присутствие в масс-спектре ББА инозина двух “тяжелых” пиков фрагментов рибозы II  $m/z$  136, 46% (вместо  $m/z$  133, 41%) и гипоксантина III  $m/z$  138, 55% (вместо  $m/z$  136, 48%), а также пиков низкомолекулярных фрагментов, продуктов распада гипоксантина при  $m/z$  111, 49% (вместо  $m/z$  109, 45%) и  $m/z$  84, 43% (вместо  $m/z$  82, 41%) свидетельствует о включении трех атомов дейтерия в рибозный и двух атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы инозина (рис. 5 и рис. 6). Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о включении 5 атомов дейтерия по 1', 3', 4', 2, 8 положениям молекулы инозина, что подтверждается  $^1\text{H}$ ЯМР-спектроскопией.

При анализе дейтерированности инозина учитывалось, что уровень и характер включения дейтерия в молекулу определялся способом получения дейтерированного инозина микробиологическим синтезом. Вследствие того, что протоны (дейтероны) в  $\text{C}_1$ – $\text{C}_2'$  положениях рибозного фрагмента молекулы инозина могли происходить из глюкозы, характер биосинтетического включения дейтерия в рибозный фрагмент определяется, в основном, функционированием процессов гексозо-6-монофосфатного (ГМФ) шунта, связанного с ассимиляцией глюкозы и других углеводов.

**Рис. 6.** Схема фрагментации молекулы инозина методом ББА.

Поскольку глюкоза использовалась в протонированном виде, ее вклад в уровень дейтерированности рибозного фрагмента пренебрегался. Однако, вопреки этому предположению, наблюдалось включение дейтерия в рибозный фрагмент молекулы инозина за счет сохранения минорных путей биосинтеза глюкозы *de novo*. Многочисленные (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) обменные процессы также могли привести к специфическому включению атомов дейтерия по определенным положениям в молекуле инозина. Такими доступными положениями в молекуле инозина являются гидроксильные протоны ОН<sup>-</sup> и имидазольные протоны при гетероатомах NH<sup>+</sup>, которые могут обмениваться на дейтерий в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O за счет кето-енольной таутомерии. Три атома дейтерия в рибозном фрагменте инозина могли происходить за счет функционирования реакций ГМФ-шунта, два атома дейтерия в гипоксантиновом фрагменте могли синтезироваться *de novo* за счет [<sup>2</sup>H]аминокислот, источником которых являлся метилотрофный гидролизат. В частности, гликозидный протон в положении С<sub>1</sub>' в рибозном фрагменте мог заместиться на дейтерий в процессе реакции элиминирования СО<sub>2</sub> на стадии образования рибулозо-5-монофосфата из 3-кето-6-фосфоглюконовой кислоты с последующим присоединением протона(дейтерона) по С<sub>1</sub>-положению рибулозо-5-монофосфата. В целом, наши исследования подтверждают эту схему. Следует подчеркнуть, что уровень дейтерированности инозина определяется изотопной чистотой <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и дейтерированных субстратов.

Таким образом, в работе показана возможность препаративного микробиологического синтеза [<sup>2</sup>H]инозина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерией *B. subtilis* за счет использования в качестве источников ростовых субстратов гидролизата биомассы факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученной с максимально дейтерированной ростовой среды. Выход [<sup>2</sup>H]инозина на максимально дейтерированной среде с 2%-ным гидролизатом <sup>2</sup>H-меченой биомассы *B. methylicum* составил 3.9 г/л, а уровень дейтерированности – 62.5% (5 атомов с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы). Для достижения более высокого уровня дейтерированности конечного продукта необходимо тщательным образом контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов, в т.ч. использовать [<sup>2</sup>H]глюкозу. В будущем планируется получать разработанным методом другие дейтерированные природные нуклеозиды и их аналоги.

Настоящая работа осуществлялась при финансовой поддержке Научно-исследовательско-

го центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 32.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andres H.* Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds / Eds. U. Pleiss, R. Vöges. N.Y.: John Wiley & Sons, 2001. V. 7. 728 p.
2. *Kundu M.K., Trifonova A., Dinya Z., Foldes A., Chattopadhyaya J.* // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 4–7. P. 1333–1337.
3. *Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G.* // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 77. № 2. P. 79–88.
4. *Crespi H.L.* // Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds. Proc. 2nd Intern. Sympos / Eds. T. Baillie, J.R. Jones. Amsterdam: Elsevier, 1989. 332 p.
5. *Caire G., de la Barca C.A.M., Bolanos A.V., Valencia M.E., Coward A.W., Salazar G., Casanueva E.* // Food Nutr. Bull. 2002. V. 23. № 3. P. 38–41.
6. *Shvets V.I., Yurkevich A.M., Mosin O.V., Skladnev D.A.* // Karadeniz J. Med. Sci. 1995. V. 8. № 4. P. 231.
7. *Lukin M., de los Santos C.* // Nucleosid., Nucleotid. Nucleic Acids. 2010. V. 29. № 7. P. 562–573.
8. *Chirakul P., Litzer J.R., Sigurdsson S.T.* // Nucleosid., Nucleotid. Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 12. P. 1903–1913.
9. *Jung M.E., Xu Y.* // Cheminform Abstract. 1998. V. 29. № 16. P. 235–238.
10. *Daub G.H.* // Stable Isotopes. Proc. 3d Intern. Conference / Ed. E.R. Klein. N.Y.: Acad. Press, 1979. P. 3–10.
11. *Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И.* // Изв. РАН. Сер. биол. 1999. Т. 4. № 6. С. 403–413.
12. *Huang X., Yu P., LeProust E., Gao X.* // Nucleic Acids Res. 2006. V. 25. № 23. P. 4758–4763.
13. *Kezar H.S., Hutchison T.L., Tyler P.S., Morris P.E.* // J. Labell. Compounds and Radiopharmaceuticals. 2001. V. 45. № 1. P. 71–78.
14. *Miroshnikov A.I., Esipov R.S., Muravyova T.I., Konstantinova I.D., Fateev I.V., Mikhailopulo I.A.* // Open Conf. Proc. J. 2010. V. 1. P. 98–102.
15. *Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999. V. 62. № 2. P. 225–229.
16. *Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И.* // Биофармацевт. журн. 2012. Т. 4. № 1. С. 11–22.
17. *Stable Isotopes in the Life Sciences* / Ed. H.L. Crespi. Vienna: Internat. Atom. Energy Agency Press, 1977. 111–121 p.
18. *Денько Е.И.* // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70. № 4. С. 41–49.
19. *Еремин В.А., Чекулаева Л.Н., Харатьян Е.Ф., Островский Д.Н.* // Микробиология. 1978. Т. 47. № 4. С. 629–636.
20. *Лобышев В.Н., Калиниченко Л.П.* Изотопные эффекты D<sub>2</sub>O в биологических системах. М.: Наука, 1978. 120 с.
21. *Vertes A.* Physiological Effect of Heavy Water. Elements and Isotopes: Formation, Transformation, Distribution. Vienna, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. 112 p.
22. *Trotsenko Y.A., Khmelina V.N., Beschastny A.P.* // Microbial Growth on C1 Compounds. Proc. 8th In-

- tern. Symp. / Eds. M.E. Lindstrom, F.R. Tabita. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 24–26.
23. Karnaukhova E.N., Reshetova O.S., Semenov S.Y., Skladnev D.A., Tsygankov Y.D. // *Amino Acids*. 1994. V. 6. № 2. P. 165–176.
  24. Skladnev D.A., Tsygankov Y.D. // *Conversion of Stable Isotope Labeled Methanol to Components of Bacterial Biomass*. 6 th Eur. Conf. of Biomass for Energy, Athens: Elsevier, 1991. P. 234–235.
  25. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швеиц В.И. // *Биотехнология*. 1996. № 3. С. 3–12.
  26. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швеиц В.И. // *Биотехнология*. 1996. № 5. С. 25–34.
  27. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1999. № 4. С. 1–10.
  28. Мосин О.В., Казаринова Л.А., Преображенская К.А., Складнев Д.А., Чеботаев Д.В., Юркевич А.М., Швеиц В.И. // *Биотехнология*. 1996. № 4. С. 19–27.
  29. Мосин О.В., Карнаухова Е.Н., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Акимова О.Л. // *Биотехнология*. 1993. № 9. С. 16–20.
  30. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швеиц В.И. // *Биоорган. химия*. 1996. Т. 22. № 10–11. С. 856–869.
  31. Зорина А.В., Бабусенко Е.С. // *Современные проблемы биотехнологии микроорганизмов. Тезисы докл. молодых ученых*. Рига: Зинятне, 1988. С. 35–40.
  32. Caprioli R.M. *Continuous-flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*. N.Y.: Wiley, 1990. 125 p.

## Microbiological Synthesis of [<sup>2</sup>H]-Inosine with a High Degree of Isotopic Enrichment by the Gram-Positive Chemoheterotrophic Bacterium *Bacillus subtilis*

O. V. Mosin<sup>a</sup>, V. I. Shvets<sup>a</sup>, D. A. Skladnev<sup>b</sup>, and I. Ignatov<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Lomonosov State University of Fine Chemical Technology, Moscow, 117571 Russia*

*e-mail: mosin-oleg@yandex.ru*

<sup>b</sup> *State Research Center of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 113545 Russia*

*e-mail: genetika@genetika.ru*

<sup>c</sup> *Scientific Research Center of Medical Biophysics, Sofia, 1111 Bulgaria*

*e-mail: mbioph@dir.bg*

Received May 11, 2012

**Abstract**—A <sup>2</sup>H-labeled purine ribonucleoside inosine was microbiologically synthesized (yield, 3.9 g/L of culture liquid) using a deuterium-adapted strain of the gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis*, cultivated in a heavy water medium with a high degree of deuteration (99.8 at % <sup>2</sup>H) containing 2% hydrolysate of deuterated biomass of the methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* as a source of <sup>2</sup>H-labeled growth substrate produced in an M9 minimal medium with 98% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O and 2% [<sup>2</sup>H]-methanol. The inosine extracted from the culture liquid of the producer strain was fractionated by adsorption (desorption) on an activated carbon surface, extraction with 0.3 M ammonium–formate buffer (pH 8.9), subsequent crystallization in 80% ethanol, and ion exchange chromatography on a column with AG50WX 4 cation exchange resin equilibrated with 0.3 M ammonium–formate buffer containing 0.045 M NH<sub>4</sub>Cl. Fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry demonstrated incorporation of five deuterium atoms in the inosine molecule (62.5% <sup>2</sup>H), three of which were contained in the ribose moiety and two in the hypoxanthine moiety.