

**ISSN:** 2310-6255**Founder:** Academic Publishing House *Researcher***DOI:** 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.



<b>European Journal of Molecular Biotechnology</b>
--

UDC 579.871.08

### **Use of Gram-positive Chemoheterotrophic Bacterium *Bacillus subtilis* B-3157 with HMP-cycle of Carbon Assimilation for Microbiological Synthesis of [<sup>2</sup>H]riboxine with High Level of Deuterium Enrichment**

<sup>1</sup>Oleg Mosin<sup>2</sup>Ignat Ignatov<sup>3</sup>Dmitry Skladnev<sup>4</sup>Vitaly Shvets

<sup>1</sup> Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation  
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)  
103316, Moscow, ulitza Talalihinina, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

<sup>2</sup> The Scientific Research Center of Medical Biophysics (SRC MB), Bulgaria  
Professor, D. Sc., director of SRC MB.

1111, Sofia, N. Kopernik street, 32

E-mail: mbioph@dir.bg

<sup>3</sup> Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms "Genetika", Russian Federation

Professor, D. Sc (Biology), leading scientist of Genetika

117545, Moscow, 1st Dorozhniy proezd, 1

E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup> M. V. Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Russian Federation  
Academician of Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry), head of department of biotechnology and nanobiotechnology.

119571, Moscow, Vernadskogo avenue, 86

E-mail: mitht@mitht.ru

**Abstract.** We studied the growth and biosynthetic properties of a strain of Gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis* B-3157– producer of <sup>2</sup>H-labeled purine ribonucleoside riboxine (outcome is 3,9 g/l) in heavy hydrogen (HH) medium with high level of deuterium enrichment (99,8 at.% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) with 2 % hydrolysate of deuterated biomass of methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* B-5662 as a source of <sup>2</sup>H-labeled growth substrates, obtained in the minimal M9 growth medium of 98 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O and 2 % [<sup>2</sup>H]methanol. Isolation of riboxine from liquid culture of riboxine producer strain was carried out by adsorption/resorption on a surface of activated carbon coal, extraction by 0.3 M NH<sub>4</sub>-formiate buffer (pH = 8.9) with the subsequent crystallization in 80 % of ethanol and column ion exchange chromatography on cation exchanger AG50WX 4, counterbalanced with 0.3 M NH<sub>4</sub>-formiate with 0.045 M NH<sub>4</sub>Cl (outcome of riboxine is 3.1 g/l (80 %)). The level of deuterium enrichment of biosynthetically prepared riboxine, analyzed by a method of fast atom bombardment (FAB) mass-spectrometry makes up 5 deuterium atoms with incorporation of 3 deuterium atoms into ribose and 2 deuterium atoms into hypoxantine fragments of the molecule.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; [<sup>2</sup>H]riboxine; biosynthesis; heavy water; fast atom bombardment mass spectrometry (FAB).

**Введение.** Природные нуклеозиды, меченные дейтерием ( $^2\text{H}$ ), представляют значительный научно-практический интерес для многочисленных медицинских и диагностических целей [1], структурно-функциональных исследований [2], а также для изучения клеточного метаболизма [3]. В частности, дейтерированные рибонуклеозиды и их аналоги применяются в матричных синтезах молекул дейтерированных РНК для изучения их пространственной структуры и конформационных изменений [4].

Важным фактором в исследованиях с дейтерированными нуклеозидами и их аналогами является их доступность.  $^2\text{H}$ -меченые нуклеозиды могут быть синтезированы с использованием химических, ферментативных и микробиологических методов [5, 6]. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и  $^2\text{H}$ -меченых субстратов и приводят к конечному продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*-энантиомеров, для разделения которых требуются специальные методы [7]. Более тонкие химические технологии синтеза [ $^2\text{H}$ ]нуклеозидов связаны с комбинацией химических и ферментативных подходов [8].

Для многих научно-прикладных целей биотехнология предлагает альтернативный микробиологический метод синтеза [ $^2\text{H}$ ]нуклеозидов, который характеризуется высокими выходами синтезируемых продуктов, эффективным включением дейтерия в молекулы и сохранению природной *L*-конфигурации синтезируемых соединений [9]. Традиционным подходом при этом является выращивание штаммов-продуцентов в средах с максимальными концентрациями  $^2\text{H}_2\text{O}$  и дейтерированных субстратов. 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 ат.%, 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

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 [10]. Эксперименты обнаружили бактериостатический эффект дейтерия, заключающийся в ингибировании жизненно-важных функций клетки, оказываемой 50 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  на растительные клетки и 80–90 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  на клетки простейших и бактерий [11]. Попытки использовать для синтеза в  $^2\text{H}_2\text{O}$  природных объектов различной таксономической принадлежности, включая бактерии, микроводоросли и дрожжи [12] 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 [13]. 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 % [14]. Как было показано нами ранее, метилотрофные бактерии — неприхотливые объекты, растут на минимальных средах с 2–4 % [ $^2\text{H}$ ]метанолом, 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 [15].

Большой научно-практический интерес к использованию дейтерированной биомассы метилотрофных бактерий для биосинтеза рибонуклеозидов определил направление исследования. Целью работы являлось изучение принципиальной возможности биосинтеза [ $^2\text{H}$ ]рибокрина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* B-3157 за счет использования в качестве источника дейтерированных субстратов 99,8 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2

% гидролизат дейтеро-биомассы факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* B-5662, полученной со среды с максимальным содержанием дейтерия.

**Материалы и методы.** 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 рибоксина, 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 ат.%  $^2\text{H}$ ),  $^2\text{HCl}$  (95,5 ат.%  $^2\text{H}$ ) и [ $^2\text{H}$ ]метанол (97,5 ат.%  $^2\text{H}$ ) (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 ат.% изотопной чистоты исходной  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Выращивание штамма-продуцента рибоксина проводили тяжеловодородной (ТВ) среде (89–90 ат.%  $^2\text{H}$ ), используя в качестве источника  $^2\text{H}$ -меченых ростовых субстратов 2 %-ный гидролизат дейтерированной биомассы ассимилирующего метанол штамма факультативных грамположительных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, полученного селекцией в условиях многоступенчатой адаптации на твердой (2 % 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 % [ $^2\text{H}$ ]метанолом и ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации тяжелой воды (от 0; 24,5; 73,5 до 98 об.%  $^2\text{H}_2\text{O}$ ). Сырую метилотрофную биомассу (выход 200 г/л среды) суспендировали в 100 мл 0,5 н.  $^2\text{HCl}$  (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ), автоклавировали 30–40 мин при 0,8 атм. Полученную суспензию нейтрализовали 0,2 М  $\text{KOH}$  (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ), до  $\text{pH} = 7,0$ , после чего использовали в качестве источника ростовых субстратов при выращивании штамма-продуцента рибоксина. Для этого посевной материал в количестве 5 – 6 масс.% переносили в ТВ-среду с  $^2\text{H}_2\text{O}$  (масс.%): глюкоза – 12; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* – 2;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1;  $\text{CaCO}_3$  – 2; аденин – 0,01; урацил – 0,01. В качестве контроля использовали протонированную среду с 2 % белково-витаминным концентратом (БВК) дрожжей. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл (наполнение средой 100 мл) в течение 3–4 сут при 32 °С 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 % агар) сред, а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при  $\lambda = 540$  нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень биоконверсии углеродного субстрата определяли, используя глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4).

Аналитическое определение рибоксина 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: *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (2 : 1 : 1, об.%). Элюирование пятен проводили 0,1 н.  $\text{HCl}$ . УФ-поглощение элюатов определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

Для выделения [ $^2\text{H}$ ]рибоксина 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 °С (3×5 мл). Смесь выдерживали ~10 ч при 4 °С, осадок отделяли центрифугированием при 1200 *g*, 5 мин. К супернатанту добавляли 10 г активированного угля, выдерживали 24 ч при 4 °С. Водную фракцию отделяли фильтрованием, к твердой фазе добавляли 20 мл 50 % этанола в 25 % аммиаке (1 : 1, об.%), нагревали при 60 °С с обратным водяным холодильником. Через 2–

з ч смесь фильтровали и упаривали при 10 мм рт. ст. Продукт экстрагировали 0,3 М  $\text{NH}_4$ -формиатным буфером (рН = 8,9), промывали ацетоном (2×10 мл), сушили над безводным  $\text{CaCl}_2$ . Рибоксин перекристаллизовывали из 80 % этанола ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1,61^\circ$ , выход 3,1 г/л, 80 %). Конечная очистка рибоксина производилась методом ИОХ на откалиброванной колонке с ручным отбором проб размерами 150 × 10 мм с катионообменной смолой AG50WX 4 (“Pharmacia”, США). Колонку уравнивали 0,3 М  $\text{NH}_4$ -формиатным буфером (рН = 8,9) с 0,045 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и элюировали тем же буфером в условиях изократической элюции (хроматографическая чистота 92 %). Элюат подвергали лиофильной сушке и хранили в запаянных ампулах при  $-4^\circ\text{C}$ . Выход рибоксина 3,1 г/л (80 %);  $T_{\text{пл.}} = 68 - 70^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1,61^\circ$  (этанол);  $R_f = 0,5$ ;  $pK_a = 1,2$  (фосфатный буфер, рН = 6,87). УФ-спектр (0,1 н. HCl): ( $\lambda_{\text{макс}} = 249$  нм,  $\varepsilon_{249} = 7100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); масс-спектр ББА (глицериновая матрица  $\text{Cs}^+$ , ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0,6–0,8 мА): ( $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z (I, \%)$ ): 273, 20 % (4 ат.  $^2\text{H}$ ); 274, 38 % (5 ат.  $^2\text{H}$ ); 275, 28 % (6 ат.  $^2\text{H}$ ); 276, 14 % (7 ат.  $^2\text{H}$ ),  $[\text{A} + \text{H}]^+ 136, 46 \%$ ;  $[\text{B} + \text{H}]^+ 138, 55 \%$ ;  $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 111, 49 \%$ ;  $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 84, 43 \%$ .

УФ-спектры регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в диапазоне длин волн  $\lambda = 220 - 280$  нм.

Аминокислотный анализ гидролизатов биомассы проводили на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Nethleler-Hinz”, ФРГ) (230×3,2 мм); неподвижная фаза — сульфированная стирольная (7,25 % сшивки) смола UR-30 (“Beckman-Spinco”, США); диаметр гранул — 25 мкм; элюент — 0,2 н.  $\text{Na}^+$ -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 осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer Smartline (“Knauer”, ФРГ), снабженным 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  $\text{Cs}^+$  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 °С) после модификации аминокислот в метиловые эфиры 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот по разработанной ранее методике [16].

**Результаты и обсуждение.** В качестве продуцента рибоксина использовали мутантный полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Vacillus subtilis B-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 °С) 17–20 г рибоксина на 1 л культуральной жидкости (КЖ) [17]. Максимальный выход рибоксина данным штаммом достигался при использовании протонированной среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии глюкозу (не менее 12 масс.%), а в качестве источника ростовых факторов и аминного азота — 2 % БВК дрожжей.

При проведении биосинтеза требовалось заменить протонированные ростовые субстраты их дейтерированными аналогами, а также использовать  $^2\text{H}_2\text{O}$  высокого уровня изотопной чистоты. Для решения поставленной задачи использовали автолизированную биомассу адаптированного к дейтерию грамположительного штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum B-5662*, ассимилирующего метанол по рибулозо-5-монофосфатному циклу фиксации углерода, который благодаря 50–60 % уровню биоконверсии метанола (при эффективности конверсии 15,5–17,3 г. сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) и устойчивому росту в минимальной дейтерированной среде M9 с

$^2\text{H}_2\text{O}$  и  $[\text{H}^2]$ метанолом оказался очень удобным источником для наработки дейтеро-биомассы, а затраты на биоконверсию определяются, в основном, стоимостью  $^2\text{H}_2\text{O}$  и  $[\text{H}^2]$ метанола [18].

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 рассев клеток на твердые среды М9 (2 % агар) со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации  $^2\text{H}_2\text{O}$  (от 24,5; 49,0; 73,5 до 98 %  $^2\text{H}_2\text{O}^*$ ) в присутствии 2 % метанола и его дейтерированного аналога и последующей селекции (табл. 1). Условия адаптации показаны в опыте 10' (табл. 1). Техника адаптации была разработана на предыдущем этапе работы и подробно описана в работе [19]. Выход микробной биомассы у адаптированного штамма *B. methylicum* уменьшался на 13 % по сравнению с исходным штаммом (опыт 1) при увеличении времени генерации до 2,8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч (табл. 1). После переноса в протонированную среду адаптированный штамм возвращался к нормальному росту после некоторого лаг-периода.

Таблица 1

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

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

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

За ходом адаптации наблюдали, измеряя 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 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2 %  $[\text{H}^2]$ метанол (рис. 1, кривая 1 (контроль)) получен в протонированной среде М9), а также по изменению продолжительности лаг-периода, времени генерации и выходов микробной биомассы. В отличие от адаптированного штамма (рис. 1, кривая 3), ростовые динамики исходного штамма (рис. 1, кривая 2) в максимальной дейтерированной среде ингибировались дейтерием. В результате удалось получить 87 г/л дейтеро-биомассы *B. methylicum*, которая в дальнейшем использовалась в качестве источника дейтерированных субстратов при выращивании штамма *B. subtilis* – продуцента рибоксина.

\* Здесь и далее использованы проценты по объему

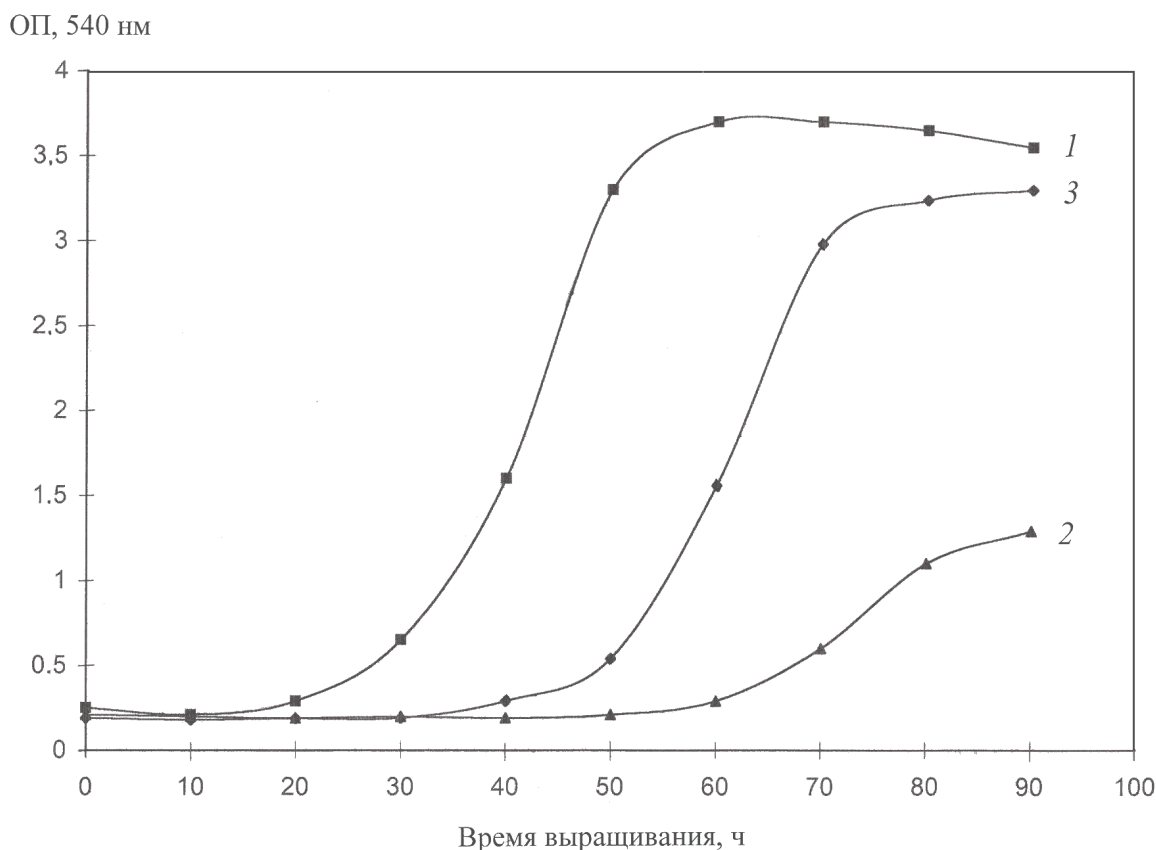


Рис. 1. Динамики роста *V. methylicum* в различных экспериментальных условиях: 1 — исходный метилотроф в протонированной среде М9 с водой и метанолом; 2 — исходный метилотроф в максимально дейтерированной среде М9; 3 — адаптированный к дейтерию метилотроф в максимально дейтерированной среде М9.

Стратегия биосинтеза  $^2\text{H}$ -меченого рибоксина за счет использования в качестве ростовых субстратов метилотрофной биомассы *V. methylicum* разрабатывалась с учетом способности метилотрофных бактерий синтезировать большое количество белка (выход 50 % от массы сухого вещества), 15–17 % полисахаридов, 10–12 % липидов (в основном, фосфолипиды) и 18 % зольных веществ [20]. 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 *V. subtilis* — продуцент рибоксина 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 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2 % [ $^2\text{H}$ ]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-продуцента 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* – продуцента рибоксина.

Таблица 2

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

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот $[\text{M}]^{+*}$	Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы**	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода***
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 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

\*\* При вычислении уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных  $\text{COOH}$ - и amino  $\text{NH}_2$ - группах молекул аминокислот не учитывались из-за легкости диссоциации в  $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ .

\*\*\* Прочерк означает отсутствие данных.

Ростовые и биосинтетические характеристики штамма *B. subtilis* – продуцента рибоксина изучали в протонированной БВК-среде с обычной водой и 2 % БВК дрожжей и ТВ-среде с 98 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2 % гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* (рис. 2). Во всех опытах отмечена корреляция в характере изменения ростовой динамики *B. subtilis* (рис. 2, кривые 1, 1'), выхода рибоксина (рис. 2, кривые 2, 2') и ассимиляции глюкозы (рис. 2, кривые 3, 3'). Максимальный выход рибоксина (17 г/л) зафиксирован на протонированной БВК-среде при уровне ассимилируемой глюкозы 10 г/л (рис. 2, кривая 2). На ТВ-среде выход рибоксина снижался в 4,4 (3,9 г/л) (рис. 2, кривая 2'), а уровень ассимиляции глюкозы – в 4 раза, о чем показали 40 г/л остаточной не ассимилируемой глюкозы в КЖ (рис. 2, кривая 3'). Экспериментальные данные показали, что при росте в ТВ-среде глюкоза ассимилируется менее эффективно, чем в контрольных условиях.

Ассимиляция глюкозы, г/л

Накопление рибоксина в КЖ, г/л

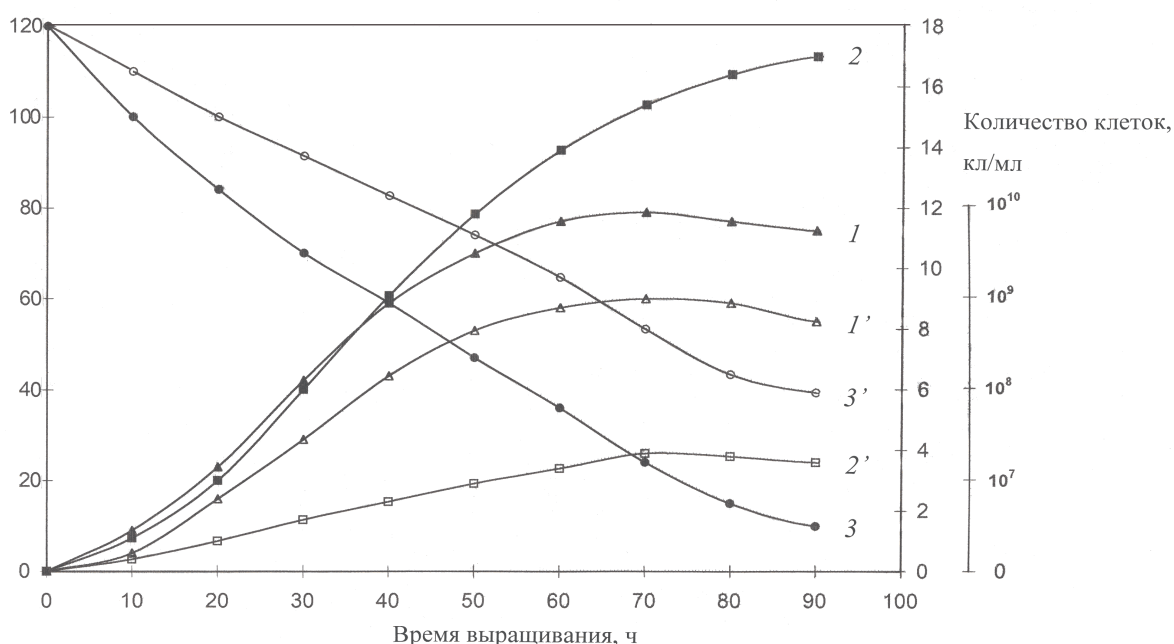


Рис. 2. Динамики роста (кл./мл) *B. subtilis* (1, 1'), накопления рибоксина в КЖ (г/л) (2, 2') и ассимиляции глюкозы (г/л) (3, 3') в различных экспериментальных условиях: 1, 2, 3 — протонированная БВК-среда с 2 %-ным БВК дрожжей; 1', 2', 3' — ТВ-среда с 2 %-ным гидролизатом дейтерированной биомассы *B.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

Полученный результат требовал изучение содержания глюкозы и других внутриклеточных углеводов в биомассе штамма-производителя *B. subtilis*, осуществленное 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 (нумерация приведена по последовательности их элюирования с колонки) 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 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 от 80,6 % для глюкозы до 90,7 % для арабинозы.

Таблица 3

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

Углевод	Содержание в биомассе, % от 1 г сухой массы биомассы		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	—

\* Прочерк означает отсутствие данных



Применение комбинации физико-химических методов для выделения биосинтетического [ $^2\text{H}$ ]рибоксина из КЖ штамма-продуцента диктовалось необходимостью получения инозина высокой степени хроматографической чистоты, не менее 95 %. Поскольку в КЖ наряду с рибоксином 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 [ $^2\text{H}$ ]рибоксина. Повышенная чувствительность рибоксина к кислотам и щелочам и его нестабильность при выделении требовали использования кислотных 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 °С, проводя последующую адсорбцию суммы рибонуклеозидов активированным углем на холоде. Десорбированные рибонуклеозиды извлекали из прореагировавшей твердой фазы элюцией этанольно-аммиачным раствором при 60 °С, а сам рибоксин — экстракцией 0,3 М  $\text{NH}_4$ -формиатным буфером (рН = 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80 % этаноле. Окончательная стадия очистки заключалась в колоночной ИОХ на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0,3 М  $\text{NH}_4$ -формиатным буфером с 0,045 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  со сбором фракций при  $R_f = 0,5$ . Данные по выделению рибоксина из КЖ штамма-продуцента представлены в виде спектров УФ-поглощения на рис. 3, кривые 1–3. Наличие в полученном образце (рис. 3, кривая 3) основной полосы поглощения I, соответствующей природному рибоксину ( $\lambda_{\text{макс.}} = 249 \text{ нм}$ ,  $\varepsilon_{249} = 7100 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) и отсутствие вторичных метаболитов II и III доказывает его однородность и эффективность разработанного метода выделения.

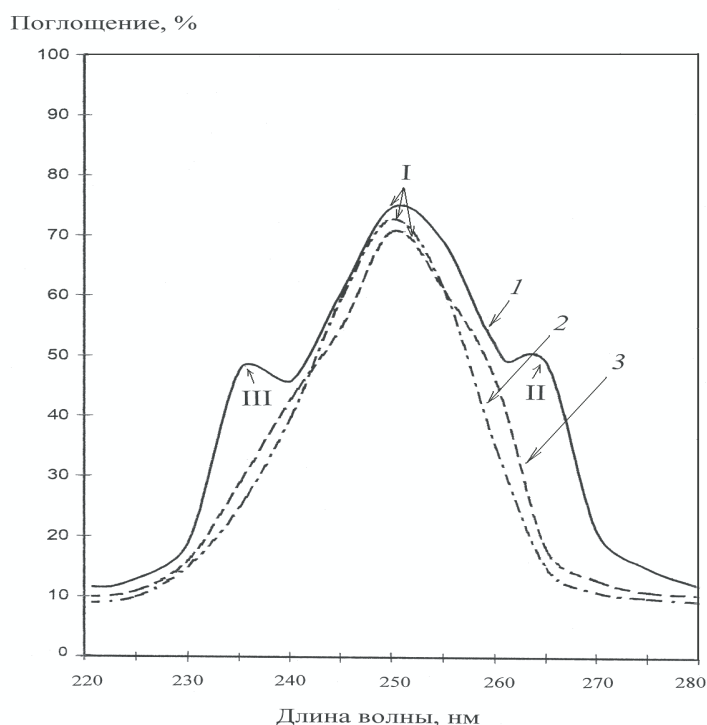
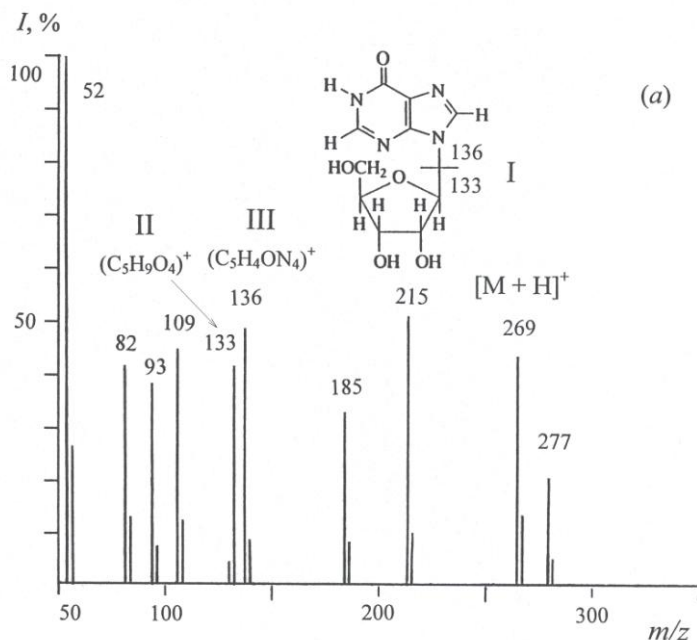


Рис. 3. Спектры УФ-поглощения (%) рибоксина (0,1 н. раствор HCl): 1 — исходная КЖ после выращивания штамма продуцента *B. subtilis* в ТВ-среде; 2 — природный рибоксин; 3 — рибоксин, выделенный из КЖ штамма-продуцента. В качестве контроля использовали природный рибоксин (2): I — рибоксин, II и III — вторичные метаболиты

Уровень дейтерированности рибоксина исследовали методом масс-спектрометрии ББА из-за высокой чувствительности, позволяющей детектировать  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  моль вещества в

пробе, что существенно выше, чем при использовании  $^1\text{H}$ ЯМР-спектроскопии [21]. Для этого получали масс-спектры ББА дейтерированного и протонированного рибоксина, по разности величин пиков молекулярных ионов, для которых проводили расчет уровня дейтерированности молекулы. Формирование пика молекулярного иона рибоксина в масс-спектрометрии ББА сопровождался миграцией протона  $\text{H}^+$ . Биосинтетический  $^2\text{H}$ -меченый рибоксин (масс-спектр ББА приведен на рис. 4, б относительно контроля (рис. 4, а)), представлял смесь изотопнозамещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пик молекулярного иона рибоксина  $[\text{M} + \text{H}]^+$  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 дейтерированности), зарегистрированным в данных условиях масс-спектрометром. Этим условиям удовлетворял пик  $[\text{M} + \text{H}]^+$  при  $m/z$  274, 38 % (вместо  $[\text{M} + \text{H}]^+$  при  $m/z$  269, 42 % в контрольных условиях (рис. 4, а)), что соответствует включению 5 атомов дейтерия в молекулу рибоксина (рис. 4, б). В пике молекулярного иона рибоксина также фиксировались менее интенсивные пики с примесями молекул с 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).



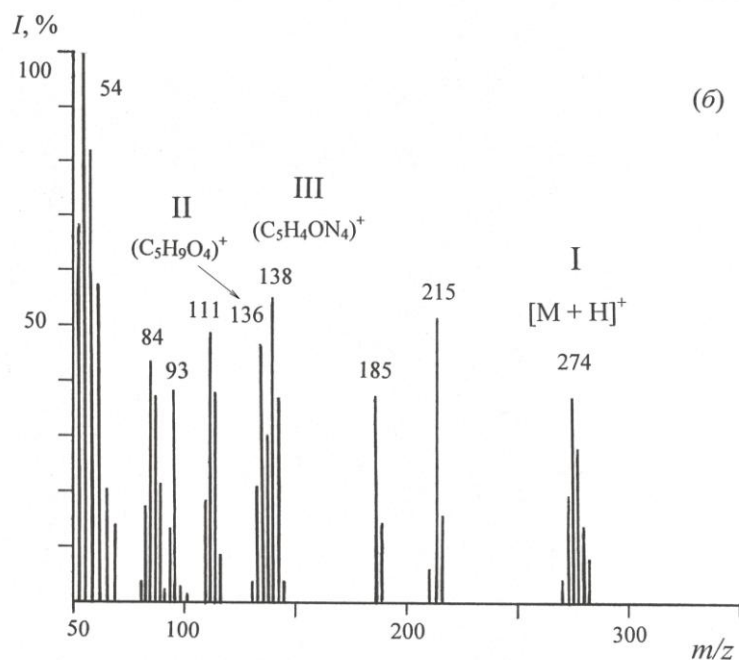


Рис. 4. Масс спектры ББА рибоксина (глицериновая матрица) в различных экспериментальных условиях: *a* — природный рибоксин (контроль); *б* —  $[^2\text{H}]$ рибоксин, выделенный из ТВ-среды. Условия ионизации: цезиевый источник, ускоряющее напряжение — 5 кВ, ионный ток — 0,6–0,8 мА. Разрешающая способность — 7500 усл. ед. *I* — относительная интенсивность пиков (%). I — рибоксин, II — рибозный фрагмент, III — гипоксантиновый фрагмент.

Таблица 4

**Величины пиков  $[M + H]^+$  в масс-спектрах ББА и уровни дейтерированности рибоксина, 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 диссоциации в  $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ .

С учетом вклада пиков молекулярных ионов суммарный уровень дейтерированности (УД) молекулы  $[^2\text{H}]$ рибоксина, вычисленный по нижеприведенной формуле, составил 62,5 % от общего количества атомов водорода в углеродном скелете молекулы.

$$\text{УД} = \frac{[M]^{+r_1} C_1 + [M]^{+r_2} C_2 + \dots + [M]^{+r_n} C_n}{\sum C_n},$$

где  $[M]^{+r}$  — величины пиков молекулярного иона рибоксина;  $C_n$  — вклад в уровень дейтерированности молекулы, мол. %.

Более точную информацию о распределении дейтерия в молекуле рибоксина дает фрагментация молекулы, показанная на рис. 5. Пути фрагментации молекулы рибоксина методом БА приводят к распаду рибоксина I на фрагмент рибозы II при массовом соотношении  $m/z$  133 и гипоксантиновый фрагмент III при  $m/z$  136 (их распад сопровождается миграцией протона  $H^+$ ), который в свою очередь расщепляется на ряд менее низкомолекулярных осколочных фрагментов при  $m/z$  109, 108, 82, 81 и 54 за счет элиминирования  $HCN$  и  $CO$  из гипоксантина (рис. 5). Следовательно, присутствие в масс-спектре БА рибоксина 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 рибоксина (рис. 4 и рис. 5). Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о включении 5 атомов дейтерия по 1',3',4',2,8 положениям молекулы рибоксина, что подтверждается  $^1H$ ЯМР-спектроскопией.

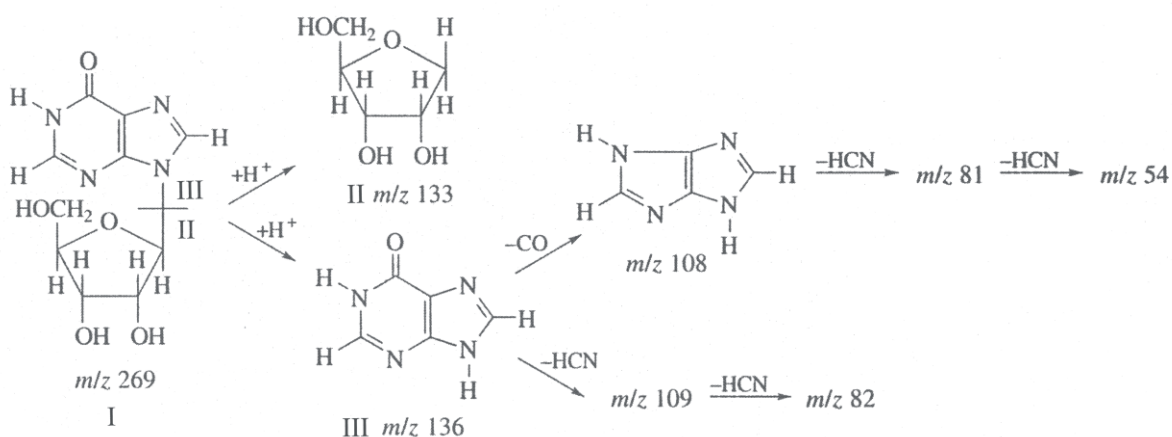


Рис. 5. Схема фрагментации молекулы рибоксина методом БА

При анализе дейтерированности рибоксина учитывалось, что уровень и характер включения дейтерия в молекулу определялся способом получения дейтерированного рибоксина микробиологическим синтезом. Вследствие того, что протоны (дейтероны) в  $C_1$ – $C_2$  положениях рибозного фрагмента молекулы рибоксина 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. 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 рибоксина за счет сохранения минорных путей биосинтеза глюкозы *de novo*. Многочисленные ( $^1H$ – $^2H$ ) обменные процессы также могли привести к специфическому включению атомов дейтерия по определенным положениям в молекуле рибоксина. Такими доступными положениями в молекуле рибоксина являются гидроксильные протоны ( $OH^-$ ) и имидазольные протоны при гетероатомах  $NH^+$ , которые могут обмениваться на дейтерий в  $^2H_2O$  за счет кето-енольной таутомерии. Три атома дейтерия в рибозном фрагменте молекулы рибоксина могли происходить за счет функционирования реакций ГМФ-шунта, два атома дейтерия в положениях  $C_2, C_8$  в гипоксантиновом фрагменте могли синтезироваться *de novo* за счет [ $^2H$ ]аминокислот, источником которых являлся метилотрофный гидролизат. В частности, гликозидный протон в положении  $C_1$  в рибозном фрагменте ( $\beta$ - $N_9$ -гликозидная связь) мог заместиться на дейтерий в процессе реакции элиминирования  $CO_2$  на стадии образования рибулозо-5-монофосфата из 3-кето-6-фосфоглюконовой кислоты с последующим присоединением протона (дейтерона) по  $C_1$ -положению рибулозо-5-монофосфата. Два других протона в положениях  $C_2(C_3)$  и  $C_4$  в рибозном фрагменте молекулы могли заместиться на дейтерий в

результате изомеризации рибулозо-5-монофосфата в рибозо-5-монофосфата. В целом, наши исследования подтверждают эту схему. Однако следует подчеркнуть, что уровень дейтерированности рибоксина определяется изотопной чистотой  $^2\text{H}_2\text{O}$  и дейтерированных субстратов.

**Заключение.** Продемонстрирована эффективность использования в гидролизата биомассы факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученной с максимально дейтерированной ростовой среды для микробиологического синтеза [ $^2\text{H}$ ]рибоксина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis*. Выход [ $^2\text{H}$ ]рибоксина на максимально дейтерированной среде с 2 %-ным гидролизатом  $^2\text{H}$ -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 [ $^2\text{H}$ ]глюкозу. В будущем планируется получать разработанным методом другие дейтерированные природные нуклеозиды.

### Примечания:

1. Andres H. Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds / Eds. U. Pleiss, R. Voges. N.Y.: John Wiley & Sons, 2001. Vol. 7. 728 p.
2. Kundu M.T. Synthetic studies to improve the deuterium labelling in nucleosides for facilitating structural studies of large RNAs by high-field NMR spectroscopy / M.T. Kundu, A. Trifonova, Z. Dinya, A. Foldes, J. Chattopadhyaya // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001. Vol. 20, № 4–7. P. 1333–1337.
3. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. Vol. 77, № 2. P. 79–88.
4. Chen B., Jamieson E. R., Tullius T. D. A general synthesis of specifically deuterated nucleotides for studies of DNA and RNA / B. Chen, E.R. Jamieson, T.D. Tullius // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2002. Vol. 12. P. 3093–3096.
5. Jung M.E. Efficient synthesis of specifically deuterated nucleosides: preparation of 4'-deuteriothymidine / M.E. Jung, Y. Xu // Cheminform Abstract. 1998. Vol. 29, № 16. P. 235–238.
6. Daub G.H. Organic synthesis with stable isotopes // Stable Isotopes: Proc. 3d Intern. Conference / Ed. E.R. Klein. New York: Acad. Press, 1979. P. 3–10.
7. Huang X. An efficient and economic site-specific deuteration strategy for NMR studies of homologous oligonucleotide repeat sequences / X. Huang, P. Yu, E. LeProust, X. Gao // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 25, № 23. P. 4758–4763.
8. Miroshnikov A.I. A new strategy for the synthesis of nucleosides: one-pot enzymatic transformation of D-pentoses into nucleosides / A.I. Miroshnikov, R.S. Esipov, T.I. Muravyova, I.D. Konstantinova, I.V. Fateev, I.A. Mikhailopulo // Open Conf. Proc. Journal. 2010. Vol. 1. P. 98–102.
9. Mosin O.V. Biosynthesis of  $^2\text{H}$ -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1999. Vol. 62, № 2. P. 225–229.
10. Денько Е.И. Действие тяжёлой воды ( $\text{D}_2\text{O}$ ) на клетки животных, растений и микроорганизмы / Е.И. Денько // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70, № 4. С. 41–49.
11. Vertes A. Physiological effect of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. Vienna: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. 112 p.
12. Лобышев В.Н. Изотопные эффекты  $\text{D}_2\text{O}$  в биологических системах / В.Н. Лобышев, Л.П. Калиниченко. Москва: Наука, 1978. 120 с.
13. Trotsenko Y.A. The ribulose monophosphate (Quayle) cycle: News and views / Y.A. Trotsenko, V.N. Khmelena, A.P. Beschastny // Microbial Growth on C1 Compounds: Proc. 8th Intern. Sympos / Eds. M.E. Lindstrom, F.R. Tabita. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 24–26.
14. Skladnev D.A. Conversion of stable isotope labeled methanol to components of bacterial biomass / D.A. Skladnev, Y.D. Tsygankov // 6 th Eur. Conf. of Biomass for Energy, Athens: Elsevier, 1991. P. 234–235.
15. Мосин О.В. Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* на средах, содержащих тяжелую воду и дейтеро-метанол / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, В.И. Швец // Биотехнология. 1996. № 3. С. 3–12.

16. Мосин О.В. Биосинтез  $^2\text{H}$ -меченого инозина бактерией *Bacillus subtilis* / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швеиц // Известия РАН. Сер. биол. 1999. № 4. С. 1–10.
17. Mosin O.V. Microbial synthesis of  $^2\text{H}$ -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. Vol. 7, № 3. P. 249–260.
18. Mosin O.V. Microbiological synthesis of  $^2\text{H}$ -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, I. Ignatov // International Journal of Biomedicine. 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.
19. Мосин О.В. Изучение микробного синтеза дейтерированного L-фенилаланина метилотрофной бактерией *Brevibacterium methylicum* на средах с различным содержанием тяжелой воды / О.В. Мосин, В.И. Швеиц, Д.А. Складнев, И. Игнатов // Биофармацевтический журнал. 2012. № 4. С. 11–22.
20. Lindstrom M.E., Stirling D.I. Methylotrophs: genetics and commercial applications / M.E. Lindstrom, D.I. Stirling // Annual Review of Microbiology. 1990. Vol. 4. P. 27–58.
21. Caprioli R.M. Continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry. New York: Wiley, 1990. 125 p.

### References:

1. Andres H. Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds / Eds. U. Pleiss, R. Voges. N.Y.: John Wiley & Sons, 2001. Vol. 7. 728 p.
2. Kundu M.T. Synthetic studies to improve the deuterium labelling in nucleosides for facilitating structural studies of large RNAs by high-field NMR spectroscopy / M.T. Kundu, A. Trifonova, Z. Dinya, A. Foldes, J. Chattopadhyaya // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001. Vol. 20, № 4–7. P. 1333–1337.
3. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. Vol. 77, № 2. P. 79–88.
4. Chen B., Jamieson E. R., Tullius T. D. A general synthesis of specifically deuterated nucleotides for studies of DNA and RNA / B. Chen, E.R. Jamieson, T.D. Tullius // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2002. Vol. 12. P. 3093–3096.
5. Jung M.E. Efficient synthesis of specifically deuterated nucleosides: preparation of 4'-deuteriothymidine / M.E. Jung, Y. Xu // Cheminform Abstract. 1998. Vol. 29, № 16. P. 235–238.
6. Daub G.H. Organic synthesis with stable isotopes // Stable Isotopes: Proc. 3d Intern. Conference / Ed. E.R. Klein. New York: Acad. Press, 1979. P. 3–10.
7. Huang X. An efficient and economic site-specific deuteration strategy for NMR studies of homologous oligonucleotide repeat sequences / X. Huang, P. Yu, E. LeProust, X. Gao // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 25, № 23. P. 4758–4763.
8. Miroshnikov A.I. A new strategy for the synthesis of nucleosides: one-pot enzymatic transformation of D-pentoses into nucleosides / A.I. Miroshnikov, R.S. Esipov, T.I. Muravyova, I.D. Konstantinova, I.V. Fateev, I.A. Mikhailopulo // Open Conf. Proc. Journal. 2010. Vol. 1. P. 98–102.
9. Mosin O.V. Biosynthesis of  $^2\text{H}$ -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1999. Vol. 62, № 2. P. 225–229.
10. Den'ko E.I. Influence of heavy water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) on cells of animals, plants and microorganisms / E.I. Den'ko // Usp. Sovr. Biol. 1970. Vol. 70, № 4. P. 41–49.
11. Vertes A. Physiological effect of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. Vienna: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. 112 p.
12. Lobishev V.N. Isotopic effects in biological systems / V.N. Lobishev, L.P. Kalinichenko. Moscow: Nauka, 1978. 120 p.
13. Trotsenko Y.A. The ribulose monophosphate (Quayle) cycle: News and views / Y.A. Trotsenko, V.N. Khmelenina, A.P. Beschastny // Microbial Growth on C1 Compounds: Proc. 8th Intern. Sympos / Eds. M.E. Lindstrom, F.R. Tabita. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 24–26.
14. Skladnev D.A. Conversion of stable isotope labeled methanol to components of bacterial biomass / D.A. Skladnev, Y.D. Tsygankov // 6 th Eur. Conf. of Biomass for Energy, Athens: Elsevier, 1991. P. 234–235.

15. Mosin O.V. Studying of biosynthesis of amino acids by the strain of *Brevibacterium methylicum* at growth on media, containing heavy water and deuteromethanol / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, A.M. Yurkevich, V.I. Shvets // *Biotechnologija*. 1996. № 3. P. 3–12.
16. Mosin O.V. Biosynthesis of  $^2\text{H}$ -labelled inosine by bacterium *Bacillus subtilis* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Izv. RAN. Ser. Biol.* 1999. № 4. P. 1–10.
17. Mosin O.V. Microbial synthesis of  $^2\text{H}$ -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2013. Vol. 7, № 3. P. 249–260.
18. Mosin O.V. Microbiological synthesis of  $^2\text{H}$ -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, I. Ignatov // *International Journal of Biomedicine*. 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.
19. Mosin O.V. Studying of microbic synthesis of deuterium labeled L-phenylalanine by methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* on media with different content of heavy water / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2012. № 4. P. 11–22.
20. Lindstrom M.E., Stirling D.I. Methylotrophs: genetics and commercial applications / M.E. Lindstrom, D.I. Stirling // *Annual Review of Microbiology*. 1990. Vol. 4. P. 27–58.
21. Caprioli R.M. Continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry. New York: Wiley, 1990. 125 p.

УДК 579.871.08

**Использование грамположительной хемогетеротрофной бактерии *Bacillus subtilis* B-3157 с ГМФ-циклом ассимиляции углерода для микробиологического синтеза [ $^2\text{H}$ ]рибоксина высокого уровня дейтерированности**

<sup>1</sup> Олег Викторович Мосин

<sup>2</sup> Игнат Игнатов

<sup>3</sup> Дмитрий Анатольевич Складнев

<sup>4</sup> Виталий Иванович Швец

<sup>1</sup> Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация  
Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук  
103316, Москва, ул. Талалихина, 33  
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария  
Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ), директор НИЦ МБ.

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

<sup>3</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация  
Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник ГосНИИГенетика

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup> Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация  
Академик РАН, доктор химических наук

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

**Аннотация.** Изучены ростовые и биосинтетические характеристики штамма грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* B-3157 – продуцента  $^2\text{H}$ -меченого пуринового рибонуклеозид рибоксина (выход – 3,9 г/л) в тяжеловодородной

среде высокого уровня дейтерированности (99,8 ат.%  $^2\text{H}$ ) с 2 %-ным гидролизатом дейтерированной биомассы факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* B-5662 как источника  $^2\text{H}$ -меченых ростовых субстратов, полученной в минимальной среде M9 с 98 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  и 2 % [ $^2\text{H}$ ]метанолом. Выделение [ $^2\text{H}$ ]рибоксина из КЖ штамма-продуцента производили адсорбцией/десорбцией) на поверхности активированного угля, экстракцией 0,3 М  $\text{NH}_4$ -формиатным буфером (pH = 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80 % этаноле и колоночной ионообменной хроматографии на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенным 0,3 М  $\text{NH}_4$ -формиатным буфером с 0,045 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (выход рибоксина 3,1 г/л (80 %)). Уровень дейтерированности биосинтетического [ $^2\text{H}$ ]рибоксина, исследованный методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), составил 5 атомов дейтерия (62,5 %  $^2\text{H}$ ) с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

**Ключевые слова:** *Vacillus subtilis*; [ $^2\text{H}$ ]рибоксин; биосинтез; тяжелая вода; масс-спектрометрия ББА.