
ПРИБОРОСТРОЕНИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

УДК 543.51: 577.1

© О. В. Мосин, И. Игнатов, В. И. Швец, Г. Тыминский

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ С БОМБАРДИРОВКОЙ БЫСТРЫМИ
АТОМАМИ В УСТАНОВЛЕНИИ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА
ПУРИНОВОГО РИБОНУКЛЕОЗИДА [²H]ИНОЗИНА**

Продemonстрирована возможность применения масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА) на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ ("Fisons VG Analytical", США) для установления путей биосинтеза ²H-меченого пуринового рибонуклеозида инозина, секретируемого в культуральную жидкость (КЖ) грамположительной хемогетеротрофной бактерией *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 при выращивании на тяжеловодородной среде с 2 % гидролизатом дейтерированной биомассы метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662 как источника ²H-меченых ростовых субстратов. Выделение [²H]инозина из КЖ производили адсорбцией/десорбцией смеси рибонуклеозидов на поверхности активированного угля, экстракцией 0.3 М NH₄-формиатным буфером (pH = 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80 % этаноле и ионообменной хроматографией на колонке с катионообменной смолой AG50WX 4, уравновешенной 0.3 М NH₄-формиатным буфером с 0.045 М NH₄Cl. Исследование распределения дейтерия в молекуле биосинтетического [²H]инозина методом масс-спектрометрии ББА продемонстрировало включение 5 атомов дейтерия в молекулу (общий уровень дейтерированности — 62.5 атом. % ²H) с включением 3 атомов дейтерия в рибозный фрагмент и 2 атомов дейтерия — в гипоксантиновый фрагмент молекулы. Три не обмениваемые атома дейтерия были включены в рибозный фрагмент молекулы за счет гликолиза по пути Эмбдена—Мейергофа вследствие реакций ферментативной изомеризации глюкозы в ²H₂O-среде с участием реакций изотопного (¹H—²H) обмена, в то время как два других атома дейтерия при C2-, C8-положениях в гипоксантиновом остатке происходили из [²H]аминокислот дейтерированного метилотрофного гидролизата *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662.

Кл. сл.: ²H-меченый инозин, биосинтез, тяжелая вода, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157, масс-спектрометрия ББА

ВВЕДЕНИЕ

Природные нуклеозиды, меченные дейтерием (²H), представляют значительный научно-практический интерес для многочисленных биохимических и диагностических целей [1], структурно-функциональных исследований [2], а также в матричных синтезах молекул дейтерированных РНК для изучения их пространственной структуры и конформационных изменений [3]. Тенденции к их предпочтительному применению обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью использования инструментальных методов масс-спектрометрии для определения локализации дейтериевой метки в молекулах синтезируемых соединений [4]. Как аналитический метод масс-спектрометрия обладает исключительно высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать и количественно определять микро и следовые количества органического вещества в больших объемах жидкостей и газов, а также в биологических системах [6]. В случае бомбардировки быстрыми атомами (ББА) быстрые ато-

мы образуются путем предварительной ионизации в разряде атомов благородных газов (Ar, Xe), ускорения образующихся ионов и последующей их нейтрализации при столкновении с незаряженными атомами [6]. Масс-спектрометрию ББА применяют при анализе веществ, которые способны растворяться или диспергироваться в жидкой матрице (глицерин, тиоглицерин, полиэтиленгликоль, *m*-нитробензиловый спирт и др.) [7]. Масс-спектры ББА отличаются от масс-спектров химической ионизации тем, что они содержат пики ионов [M + H]⁺ или [M – H][–], но не M⁺ или M[–]. Методом ББА можно анализировать молекулы разной природы с молекулярной массой до 10 кДа [8]. Метод ББА особенно удобен при исследовании соединений, содержащих кислотные, основные или ионные группировки. Вместе с тем метод ББА менее чувствителен, чем ионизация электронами и матрично-активированная лазерная десорбция, и малоприменим для количественных определений, но удобен для качественного определения нелетучих веществ без их химической модификации в летучие производные.

Основным препятствием практического использования дейтерированных нуклеозидов в вышеобозначенных исследованиях является недостаток ^2H -меченых ростовых субстратов высокого уровня дейтерированности. Прежде всего это связано с ограниченной доступностью и высокой стоимостью 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 позволяют получать ^2H -меченые субстраты высокого уровня изотопной чистоты.

Инозин (1,9-дигидро-9-бета-D-рибофуранозил-6Н-пурин-6-ОН) — рибонуклеозид, состоящий из гипоксантина, связанный с остатком рибозы (рибофуранозы) посредством β -N9-гликозидной связи, обладающий полифункциональным биологическим воздействием на организм. В клетках простейших и эукариот инозин является предшественником АТФ, повышает активность ряда ферментов цикла Кребса, стимулирует синтез нуклеотидов. Как метаболическое средство инозин оказывает антигипоксическое, метаболическое и антиаритмическое действие, а также оказывает положительное влияние на процессы обмена в миокарде, улучшает коронарное кровообращение, предотвращая дистрофические изменения миокарда, вызванные физическими нагрузками, инфекцией или эндокринными заболеваниями [9].

Для биосинтеза природных ^2H -меченых нуклеозидов, в том числе инозина, разработаны подходы с использованием в качестве ростовых субстратов гидролизатов дейтерированной 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 [10, 11]. Уровень ассимиляции биомассы метилотрофных бактерий клетками простейших организмов и эукариот составляет 85–98 %, а их производительность, измеренная по уровню биоконверсии метанола в клеточные компоненты, достигает 50 % [12]. Как было показано нами ранее, метилотрофные бактерии — неприхотливые объекты, растут на минимальных средах с 2–4 % метанолом, в которых другие бактерии не размножаются, и достаточно легко адаптируются к максимальным концентрациям $^2\text{H}_2\text{O}$ [13]. Однако эксперименты обнаружили бактериостатический эффект $^2\text{H}_2\text{O}$, заключающийся в ингибировании жизненно-важных функций клеток бактериальных штаммов-продуцентов [14]. Поэтому целый ряд практических вопросов биосинтеза

природных дейтерированных нуклеозидов в $^2\text{H}_2\text{O}$ остается неизученным.

Большой научно-практический интерес к использованию аналитических методов масс-спектрометрии для изучения биосинтетических путей дейтерированных природных соединений определил цель настоящей работы, связанной с изучением принципиальной возможности использования масс-спектрометрии ББА для установления путей биосинтеза ^2H -меченого пуринового рибонуклеозида инозина, синтезируемого грамположительной хемогетеротрофной бактерией *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157.

ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.9 атом. % ^2H), ^2HCl (95.6 атом. % ^2H) и [^2H]метанол (98.5 атом. % ^2H), полученные из Российского научно-технического центра "Изотоп" (Санкт-Петербург, Россия). Неорганические соли предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H ЯМР-спектроскопией на приборе Brucker WM-250 ("Brucker Daltonics", Германия) (рабочая частота — 70 МГц, внутренний стандарт — Me_4Si), химические сдвиги протонов (δ , ppm) измерены в миллионных долях по отношению к Me_4Si .

УФ-спектрофотометрию проводили на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 ("Beckman Coulter", США) в диапазоне длин волн 220–280 нм.

Аналитическое определение инозина проводили в пробах культуральной жидкости (КЖ) объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150 × 150 мм) с закрепленным слоем флуоресцентного носителя Silufil UV-254 ("Kavalier", Словакия) с использованием стандартного набора рибонуклеозидов фирмы "Beckman Spenco" (США) в системе растворителей: *n*-бутанол—уксусная кислота—вода = 2 : 1 : 1 об. %. Элюирование пятен проводили 0.1 н. HCl . УФ-поглощение элюатов определяли спектрофотометрически при $\lambda = 249$ нм, используя стандартную калибровочную кривую.

Ионообменную хроматографию осуществляли на приборе Biotronic LC 5001 ("Eppendorf-Nethleler-Hinz", Германия) с использованием колонки Biotronic resin BIC 2710; $t = 20-(\pm 25)^\circ\text{C}$; размеры колонки — 3.2 × 230 мм; неподвижная фаза — сульфированная стирольная смола (7.25 % сшивки полимера) UR-30 ("Beckman Spenco", США); подвижная фаза — 0.2 М Na-цитратный буфер; рабочее давление — 50–60 атм; скорость подачи Na-цитратного буфера —

18.5 мл/ч; нингидрина — 9.25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer Smartline ("Knauer", Германия), снабженном УФ-детектором UF-2563 и интегратором C-R 3A ("Shimadzu", Япония) при $t = 20$ – (± 25) °С, используя колонку размером 250×10 мм с неподвижной фазой Ultrasorb CN, 10 мкм ("Кова", Словакия); подвижная фаза: ацетонитрил—вода = 75 : 25 об. % в условиях градиентного элюирования; объем пробы — 50–100 мкл; скорость элюирования — 1.5 мл/мин.

Масс-спектрометрию ББА проводили на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ ("Fisons VG Analytical", США), снабженным цезиевым (Cs^+) источником на глицириновой матрице с ускоряющим напряжением 8–30 кВ и ионным током 0.6–0.8 мА путем предварительной ионизации образцов в разряде атомов благородного газа (Ar, Xe).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм-продуцент [^2H]инозина

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 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов (Москва, Россия). Штамм был предварительно адаптирован к дейтерию расевом до отдельных колоний на 2 % агаре со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ и последующей селекцией по признаку устойчивости к $^2\text{H}_2\text{O}$.

Биосинтез [^2H]инозина

[^2H]инозин получен микробиологическим синтезом с выходом 3.9 г/л на синтетической тяжело-водородной (ТВ) среде (89–90 атом. % ^2H), используя в качестве штамма-продуцента штамм хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157, а в качестве источника ^2H -меченых ростовых субстратов — гидролизат дейтерированной биомассы метанол-ассимилирующего штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662 (условия получения: автоклавирование в 0.1 н. ^2HCl ~30–40 мин при 0.8 атм), выделенный селекцией в условиях многостадийной адаптации

на твердой минеральной среде М9 (2 % агар) с 2 % [^2H]метанолом со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации тяжелой воды (от 0 до 98 об. % $^2\text{H}_2\text{O}$).^{*} Сырую метилотрофную биомассу (выход 200 г с 1 л среды) суспендировали в 100 мл 0.5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$), автоклавировали 30–40 мин при 0.8 атм. Полученную суспензию нейтрализовали 0.2 н. 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 инозина. Для этого посевной материал в количестве 5–6 масс. % переносили в ТВ-среду с $^2\text{H}_2\text{O}$ (масс. %): глюкоза — 12.0; дейтерированный гидролизат *B. methylicum* ВКПМ В-5662 — 2.0; NH_4NO_3 — 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1.0; CaCO_3 — 2.0; аденин — 0.01; урацил — 0.01. В качестве контроля использовали протонированную среду на основе белково-витаминного концентрата (БВК) дрожжей, состав которой аналогичен составу ТВ-среды, за исключением 2 % БВК дрожжей. Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл (наполнение средой 100 мл) в течение 3–4 сут при $t = +32$ °С в условиях интенсивной аэрации реакционной смеси на орбитальном шейкере 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 оптической плотности (ОП) суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman-DU6 ("Beckman Coulter", США) при $\lambda = 540$ нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень биоконверсии углеродного субстрата определяли глюкозооксидазным методом, как описано в работе [15].

Выделение [^2H]инозина

Пробы КЖ центрифугировали на центрифуге Т-24 ("Carl Zeiss", ФРГ) при 2000 g 10 мин, концентрировали при 10 мм рт. ст. в роторном испарителе РВО-6 ("Microtechna", Венгрия) до объема в 2 раза меньше исходного, добавляли ацетон при 0 °С (3×5 мл). Смесь выдерживали 14–15 ч при +4 °С, осадок отделяли центрифугированием при $t = +4$ °С при 1200 g 5 мин. К супернатанту добавляли 10 г активированного угля, выдерживали 1 сут при $t = +4$ °С. Водную фракцию отделяли фильтрованием, к твердой фазе добавляли 20 мл 50 % этанола в 25 % аммиаке (1 : 1 об. %), кипятили при $t = +60$ °С с обратным водяным холодильником. Через 2–3 ч смесь фильтровали и упаривали при 10 мм рт. ст. Продукт экстрагировали 0.3 М NH_4 -формиатным буфером ($\text{pH} =$

^{*} Здесь и далее использованы проценты по объему.

= 8.9), промывали ацетоном (2×10 мл), сушили безводным CaCl_2 . Инозин перекристаллизовывали из 80 % этанола ($[\alpha]_D^{20} = +1.61^\circ$, выход 3.1 г/л (80 %)). Затем образцы наносили на откалиброванную колонку (150×10 мм) с ручным отбором проб с катионообменной смолой AG50WX 4 ("Pharmacia", США). Колонку уравнивали 0.3 М NH_4 -формиатным буфером (pH = 8.9) с 0.045 М NH_4Cl и элюировали тем же буфером в условиях изократической элюции (хроматографическая чистота, 92 %). Элюат подвергали лиофильной сушке и хранили в запаянных ампулах в морозильной камере холодильника при $t = -10^\circ\text{C}$. Выход: 3.1 г/л (80 %); $T_{\text{пл.}} = 68-70^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = +1.61^\circ$ (этанол); $R_f = 0.5$; $\text{pK}_a = 1.2$ (фосфатный буфер, pH = 6.87). УФ-спектр (0.1 н. HCl): ($\lambda_{\text{max}} = 249$ нм, $\varepsilon_{249} = 7100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); масс-спектр ББА (жидкая матрица — глицерин, ускоряющее напряжение $\text{Cs}^+ — 8-30$ кВ, ионный ток — 0.6–0.8 мА): $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ (I , %): 273, 20 % (4 атома ^2H); 274, 38 % (5 атомов ^2H); 275, 28 % (6 атомов ^2H); 276, 14 % (7 атомов ^2H), $[\text{A} + \text{H}]^+ 136$, 46 %; $[\text{B} + \text{H}]^+ 138$, 55 %; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 111$, 49 %; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 84$, 43 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ^2H -меченой биомассы *B. methylicum* ВКПМ В-3157

В качестве продуцента инозина использовали полиауксотрофный по гистидину, тирозину,

аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий *B. 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 (дрожжевая среда, поздний экспоненциальный рост, $t = +32^\circ\text{C}$) 17–20 г инозина на 1 л КЖ [16]. Максимальный выход инозина достигался при использовании протонированной среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии глюкозу (12 масс. %), а в качестве источника ростовых факторов и аминного азота 2 % белково-витаминный концентрат (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 биомассу адаптированного к дейтерию штамма факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* ВКПМ В-5662, ассимилирующего метанол по рибулозо-5'-монофосфатному пути фиксации углерода, который благодаря 50 %-му уровню биоконверсии метанола (при эффективности конверсии 15.5–17.3 г сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) и устойчивому росту в минеральной дейтерированной среде М9 оказался очень удобным источником для наработки дейтеро-биомассы, а затраты на биоконверсию

Табл. 1. Условия адаптации, изотопный состав ростовых сред и характеристики бактериального роста *B. methylicum* ВКПМ В-5662*

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Ляг-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H_2O	$^2\text{H}_2\text{O}$	метанол	$[\text{H}^2]\text{метанол}$			
1	98.0	0	2	0	20.0	100.0	2.2
2	98.0	0	0	2	30.0	92.3	2.4
3	73.5	24.5	2	0	32.1	90.6	2.4
4	73.5	24.5	0	2	34.0	85.9	2.6
5	49.0	49.0	2	0	40.5	70.1	3.0
6	49.0	49.0	0	2	44.1	60.5	3.2
7	24.5	73.5	2	0	45.8	56.4	3.5
8	24.5	73.5	0	2	49.6	47.2	3.8
9	0	98.0	2	0	58.3	32.9	4.4
10	0	98.0	0	2	60.0	30.1	4.9
10'	0	98.0	0	2	40.0	87.0	2.8

* Данные опытов 1–10 приведены для *B. methylicum* ВКПМ В-5662 при выращивании в водных средах М9, содержащих 2 % метанол и указанное количество (об. %) $^2\text{H}_2\text{O}$. Данные опыта 10' приведены для адаптированной к максимальному содержанию дейтерия бактерии при выращивании в среде, содержащей 2 % $[\text{H}^2]\text{метанол}$ и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. В качестве контроля использовали опыт 1, где использовали обычную воду и метанол.

определяются в основном стоимостью $^2\text{H}_2\text{O}$ и $[^2\text{H}]$ метанола [17]. Проведение адаптации для *B. methylicum* ВКПМ В-5662 определялось необходимостью улучшения ростовых характеристик штамма и достижения высокого выхода микробной биомассы в максимально дейтерированной среде. Для этого использовали ступенчато-увеличивающийся градиент концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах М9 (от 24.5 до 98.0 % $^2\text{H}_2\text{O}$) в присутствии 2 % метанола и его дейтерированного аналога, т. к. предполагалось, что постепенное привыкание клеток к $^2\text{H}_2\text{O}$ будет оказывать благоприятный эффект на ростовые параметры (табл. 1).

Для изучения влияния уровня дейтерированности источника углерода на ростовые параметры штамма в опытах 1, 3, 5, 7 и 9 использовали протонированный метанол, а в опытах 2, 4, 6, 8 и 10 — $[^2\text{H}]$ метанол (табл. 1). Замена протонированного метанола его дейтерированным аналогом в условиях одинаковой концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде приводила к небольшим уменьшениям ростовых характеристик штамма (табл. 1, опыты 2, 4, 6, 8 и 10). Поэтому в дальнейших опытах использовали среды с $^2\text{H}_2\text{O}$ и $[^2\text{H}]$ метанолом. При росте исходного штамма *B. methylicum* ВКПМ В-5662 на контрольной протонированной среде (рис. 1, (1)) с водой и метанолом продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации составили 20 и 2.2 ч, а выход микробной биомассы 200 г с 1 л КЖ (табл. 1, опыт 1). В промежуточных опытах (2–10) биосинтетические параметры изменялись пропорционально концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$. Выявленная закономерность заключалась в увеличении продолжительности лаг-периода и

времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы с фиксированием самых низких значений этих параметров в максимально дейтерированной среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % $[^2\text{H}]$ метанолом (табл. 1, опыт 10), где продолжительность лаг-периода и время генерации увеличивались в 3.0 и 2.2 раза по сравнению с контрольными условиями, а выход микробной биомассы уменьшался в 3.1 раза (табл. 1, опыт 1). Улучшить ростовые характеристики штамма в максимально дейтерированной среде позволила адаптация к дейтерию, условия которой показаны в опыте 10⁹ (табл. 1). За ходом адаптации наблюдали, снимая динамику роста (рис. 1) исходного (б) и адаптированного к дейтерию (в) штамма в максимально дейтерированной среде М9, содержащей 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % $[^2\text{H}]$ метанол (рис. 1, а, (контроль) получен в протонированной среде), а также по изменению продолжительности лаг-периода, времени генерации и выходов микробной биомассы. В отличие от адаптированного штамма (в) ростовые динамики исходного штамма (б) в максимальной дейтерированной среде ингибировались дейтерием (рис. 1). Выход микробной биомассы у адаптированного штамма (в) уменьшался на 13 % по сравнению с контрольными условиями (рис. 1, а) при увеличении времени генерации до 2.8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч (рис. 1, в). В целом улучшенные ростовые характеристики адаптированного метилотрофа существенно упрощают схему получения дейтеро-биомассы, оптимальным условием которой является максимально дейтерированная среда М9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2% $[^2\text{H}]$ метанолом (инкубационный период 3–4 сут при $t = +32^\circ\text{C}$).

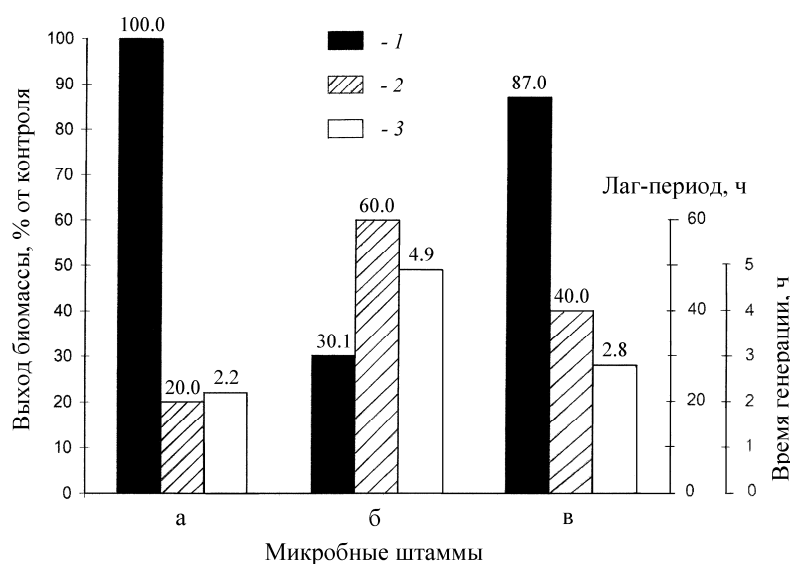


Рис. 1. Выход биомассы *B. methylicum* ВКПМ В-5662 (1), величина лаг-периода (2) и время генерации (3) в различных экспериментальных условиях.

а — исходный метилотроф в протонированной среде с обычной водой и метанолом; б — исходный метилотроф в максимально дейтерированной среде; в — адаптированный к дейтерию метилотроф на максимально дейтерированной среде

Биосинтез [^2H]инозина

Стратегия биосинтеза ^2H -меченого инозина за счет использования в качестве ростовых субстратов биомассы метилотрофных бактерий разрабатывалась с учетом способности метилотрофных бактерий синтезировать большое количество белка (50 % от веса сухого вещества), 15–17 % полисахаридов, 10–12 % липидов (в основном фосфолипиды) и 18 % зольных веществ [18]. Для обеспечения высоких выходов этих соединений и минимизации реакций обратного (^1H — ^2H) обмена в аминокислотных остатках гидролиз биомассы проводили автоклавированием в 0.5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$). Поскольку штамм *B. subtilis* ВКПМ В-3157, 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 2 % [^2H]метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$, а также уровни их дейтерированности (табл. 2). Качественный и количественный состав аминокислот метилотрофного гидролизата изучали на катионообменной колонке "Biotronic LC-5001" (Германия) с сульфированной смолой UR-30,

а уровни дейтерированности молекул — масс-спектрометрией ЭУ метиловых эфиров N-5-(диметиламино)нафтаген-1-сульфонильных (данных) производных аминокислот, как описано в работе [19]. Из табл. 2 видно, что 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 ауксотрофную потребность штамма продуцента в тирозине и гистидине. Содержание других аминокислот в гидролизате также сопоставимо с потребностями штамма-продуцента инозина в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в синтезируемый продукт, служит высокий уровень дейтерированности молекул аминокислот, который варьирует от 49.0 атом. % для лейцина/изолейцина до 97.5 атом. % для аланина (табл. 2). Это позволило использовать гидролизат дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum* ВКПМ В-5662 как источник ростовых субстратов для выращивания штамма *B. subtilis* ВКПМ В-3157, продуцента инозина.

Табл. 2. Аминокислотный состав гидролизата биомассы *B. methylicum* ВКПМ В-5662, полученный с максимально дейтерированной среды, и уровни дейтерированности (атом. %) молекул

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот [М] ⁺	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	НД ^{***}	—	—
Метионин	2.25	НД	—	—
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	НД	—	—
Гистидин	3.72	НД	—	—

* Данные получены масс-спектрометрией ЭУ для метиловых эфиров N-5-(диметиламино)нафтаген-1-сульфонил хлоридных производных аминокислот.

** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH₂-группах молекул аминокислот не учитывались из-за легкости изотопного (^1H — ^2H) обмена.

*** НД — не детектировался.

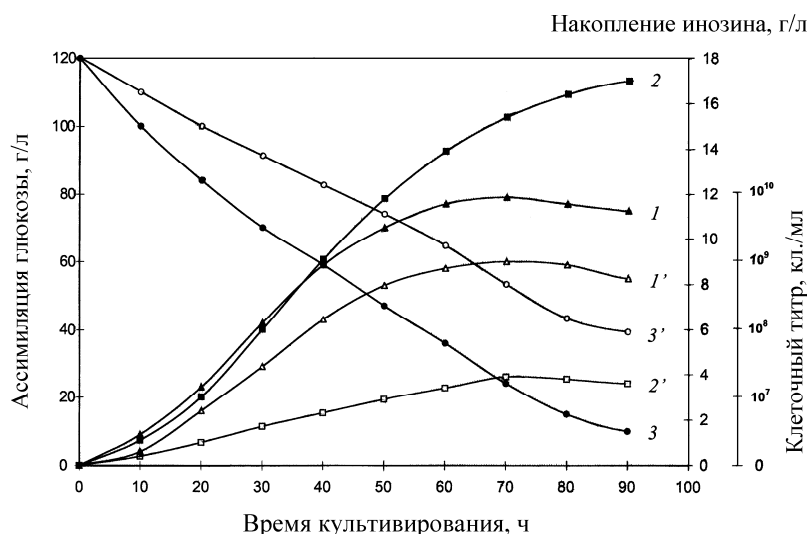


Рис. 2. Динамики роста *B. subtilis* ВКПМ В-3157, кл/мл (1, 1'); накопления инозина, г/л (2, 2') и ассимиляции глюкозы, г/л (3, 3') в различных экспериментальных условиях. 1, 2, 3 — протонированная БВК-среда; 1', 2', 3' — ТВ-среда с 2 % гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* ВКПМ В-5662

Табл. 3. Состав внутриклеточных углеводов гидролизата биомассы *B. subtilis* ВКПМ В-3157 и уровни дейтерированности (атом. %) молекул

Углевод	Содержание в биомассе, % от сухого веса 1 г биомассы		Уровень дейтерированности молекул, %*
	протонированный гидролизат, полученный в БВК-среде (контроль)	гидролизат, 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	НД**	—

* Данные получены ^1H ЯМР-спектроскопией.

** НД — не детектировалось.

Ростовые и биосинтетические характеристики штамма продуцента инозина *B. subtilis* ВКПМ В-3157 изучали в протонированной БВК-среде с обычной водой и в синтетической ТВ-среде с 86 % $^2\text{H}_2\text{O}$, 12 % глюкозой и 2 % гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* ВКПМ В-5662 (рис. 2). Во всех опытах отмечена корреляция в характере изменения ростовых динамик (рис. 2, опыты 1, 1'), выхода инозина (рис. 2, опыты 2, 2') и ассимиляции глюкозы (рис. 2, опыты 3, 3'). Максимальный выход инозина (17 г/л) зафиксирован на протонированной БВК-среде (рис. 2, опыт 2) при уровне ассимилируемой глюкозы 10 г/л (рис. 2, опыт 3). На ТВ-среде выход инозина снижался в 4.4 (3.9 г/л) (рис. 2, опыт 2'), а уровень ассимиляции глюкозы в 4 раза, о чем свидетельствует 40 г/л остаточной неассимилируемой глюкозы в КЖ (рис. 2, опыт 3'). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при росте

в ТВ-среде глюкоза расходуется менее эффективно, чем в контрольных условиях на протонированной БВК-среде, из-за ингибирования тяжелой водой ферментативных реакций ассимиляции глюкозы клеткой.

Полученный результат требовал изучения содержания глюкозы и других внутриклеточных углеводов в биомассе штамма продуцента *B. subtilis* ВКПМ В-3157, осуществленное методом ВЭЖХ на колонке Ultrasorb CN, 10 мкм с подвижной фазой ацетонитрил—вода = 75 : 25 об. % (табл. 3). Смесь внутриклеточных углеводов гидролизата биомассы в табл. 3 (нумерация приведена по последовательности их элюции с колонки) составляли моно-(глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза), ди-сахариды (мальтоза, сахароза), а также четыре других неидентифицированных углевода с временами удерживания 3.08 (15.63 %), 4.26 (7.46 %), 7.23 (11.72 %) и 9.14

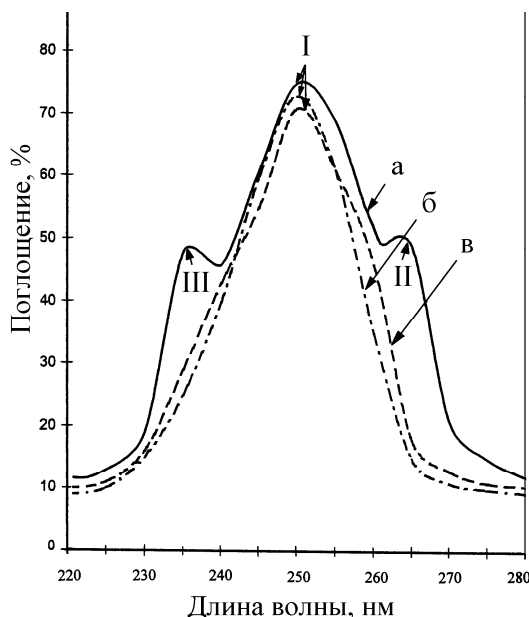


Рис. 3. Спектры УФ-поглощения инозина (0.1 н. раствор HCl).

а — исходная КЖ после выращивания штамма-продуцента *B. subtilis* ВКПМ В-3157 в ТВ-среде; б — природный инозин; в — инозин, выделенный из КЖ штамма-продуцента. I — инозин, II и III — вторичные метаболиты

(7.95 %) мин (не показаны). Как ожидалось, выход глюкозы в дейтерированном гидролизате составляет 21.4 % от сухого веса, 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 в H₂O, за исключением сахарозы, которая не детектируется в дейтерированном гидролизате. Уровни дейтерированности углеводов варьируют от 90.7 атом. % ²H для арабинозы до 80.6 атом. % ²H для глюкозы.

Выделение [²H]инозина

Применение комбинации физико-химических методов для выделения биосинтетического [²H]инозина из КЖ диктовалось необходимостью получать инозин высокой степени хроматографической чистоты (не менее 95 %). Поскольку в КЖ наряду с синтезируемым продуктом 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. Повышенная чувстви-

тельность инозина к кислотам и щелочам и его нестабильность при выделении требовали использования кислотных и щелочных растворов низкой концентрации, а также проводить выделение 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, ионообменной хроматографии. 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 элюированием этанольно-аммиачным раствором при +60 °С, а сам инозин — экстракцией 0.3 М NH₄-формиатным буфером (рН = 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80 % этаноле. Окончательная стадия очистки заключалась в колоночной ионообменной хроматографии на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0.3 М NH₄-формиатным буфером 0.045 М NH₄Cl со сбором фракций при R_f = 0.5. Данные по выделению инозина из КЖ штамма-продуцента *B. subtilis* ВКПМ В-3157 представлены в виде спектров УФ-поглощения на рис. 3. Наличие в анализируемом образце (в) основной полосы поглощения I, соответствующей природному инозину ($\lambda_{\max} = 249$ нм, $\epsilon_{249} = 7100$ М⁻¹см⁻¹) и отсутствие вторичных метаболитов II и III доказывает его однородность и, следовательно, эффективность разработанного метода выделения.

Изучение распределения дейтериевой метки в молекуле [²H]инозина

Уровень дейтерированности инозина исследовали методом масс-спектрометрии ББА, который за счет ионизации быстрыми атомами позволяет обнаруживать микро и следовые количества органического вещества в больших объемах жидкостей и в биологических системах без их предварительной химической модификации в летучие производные. Для этого регистрировали масс-спектры ББА дейтерированного и протонированного инозина, по разности величин пиков молекулярных ионов которых проводили расчет уровня дейтерированности молекулы. Формирование пика молекулярного иона инозина при масс-спектрометрии ББА сопровождается миграцией протона H⁺ с формированием молекул с [M + H]⁺. Биосинтетический ²H-меченый инозин (масс-спектр ББА приведен на рис. 4, б, относительно

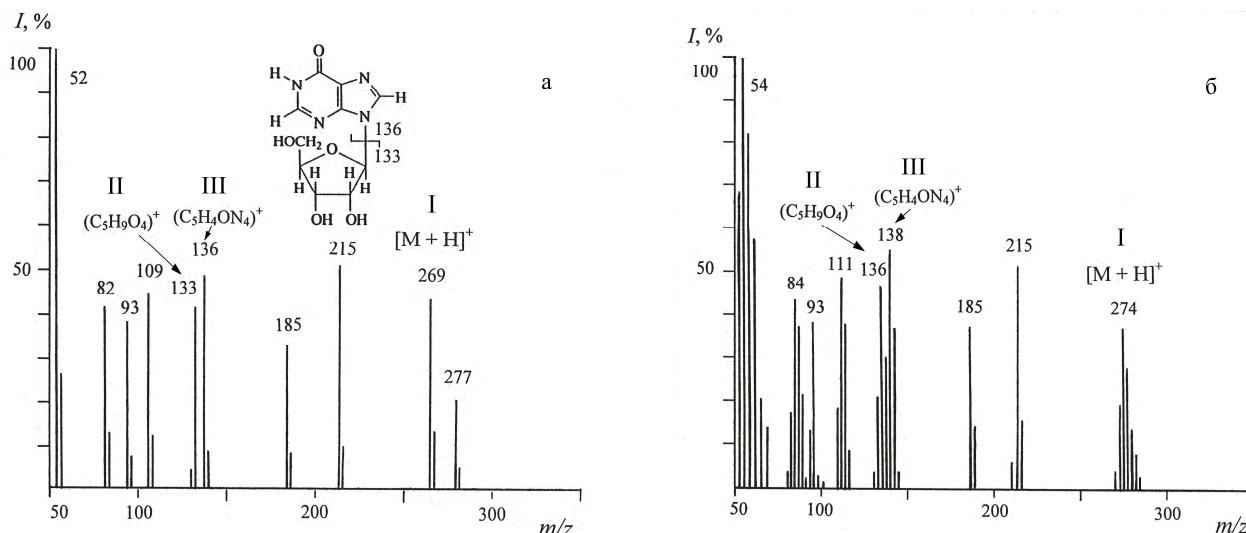


Рис. 4. Масс спектры ББА инозина (глицериновая матрица) в различных экспериментальных условиях. а — природный инозин; б — $[^2\text{H}]$ инозин, выделенный из ТВ-среды. Условия ионизации: цезиевый источник в разряде атомов Ag; ускоряющее напряжение — 8–30 кВ; ионный ток — 0.6–0.8 мА. I — инозин, II — рибозный фрагмент, III — гипоксантиновый фрагмент

Табл. 4. Величины пиков $[\text{M} + \text{H}]^+$ в масс-спектрах ББА и уровни дейтерированности (атом. %) молекулы инозина

Величина пика $[\text{M} + \text{H}]^+$	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 OH-гидроксильных группах, а также имидазольные NH-протоны при гетероатомах азота не учитывались из-за легкости изотопного ($\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$) обмена в $^2\text{H}_2\text{O}$.

контроля (рис. 4, а)) представлял смесь изотопно-замещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пики молекулярных ионов инозина $[\text{M} + \text{H}]^+$ полиморфно расщеплялись 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 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (пик с наибольшим вкладом в уровень дейтерированности), зарегистрированного в данных условиях масс-спектрометром. Этим условиям удовлетворял пик I 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 инозина (рис. 4, б).

Пик II с $m/z = 133$, 41 % и пик III с $m/z = 136$, 49 % соответствуют фрагменту рибозы и гипоксантиновому фрагменту. Как видно из табл. 4, в пике молекулярного иона инозина $[\text{M} + \text{H}]^+$ также фиксировались менее интенсивные пики с примесями молекул с включением четырех ($m/z = 273$, 20 %), пяти ($m/z = 274$, 38 %), шести ($m/z = 275$, 28 %) и семи атомов дейтерия ($m/z = 276$, 14 %). Это свидетельствует об изотопном полиморфизме при данном инструментальном методе введения в молекулу дейтериевой метки.

С учетом эффекта изотопного полиморфизма суммарный уровень дейтерированности молекулы инозина (УД), вычисленный по нижеприведенной формуле, составил 62.5 атом. % от общего количества атомов водорода в углеродном скелете молекулы:

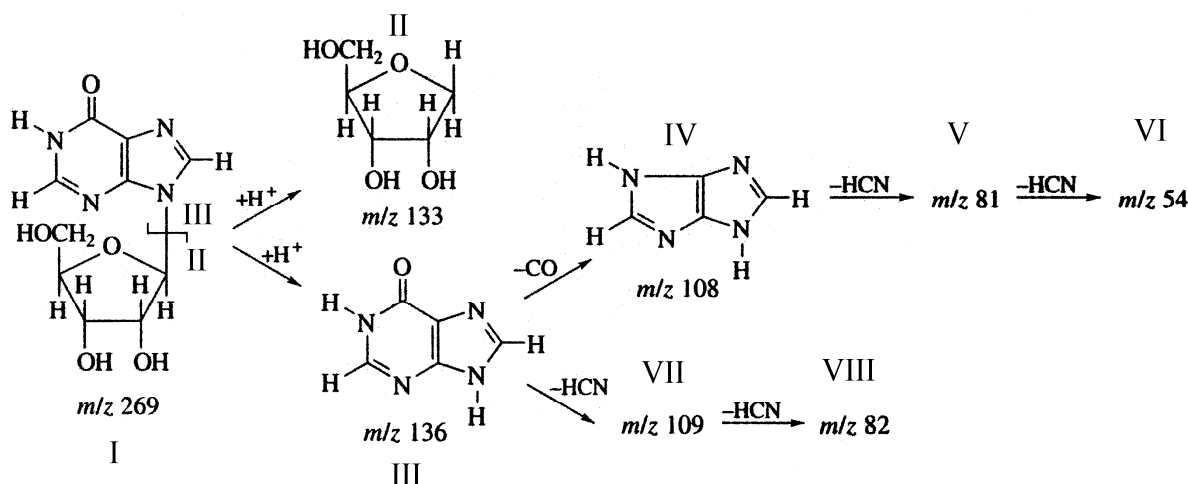


Рис. 5. Схема фрагментации молекулы инозина методом ББА

$$UD = \frac{[M_{r1}]C_1 + [M_{r2}]C_2 + \dots + [M_{rn}]C_n}{\sum C_n},$$

где M_{rn} — величины пиков молекулярных ионов инозина; C_n — вклад в уровень дейтерированности, мол. %.

Более точную информацию о распределении дейтерия в молекуле инозина дает фрагментация молекулы методом ББА, показанная на рис. 5. Пути фрагментации молекулы инозина методом ББА приводят к распаду инозина на фрагмент рибозы II при массовом соотношении $m/z = 133$ и гипоксантиновый фрагмент III при $m/z = 136$ (их распад сопровождается миграцией протона H^+), которые в свою очередь расщепляются на ряд низкомолекулярных осколочных фрагментов (IV–VIII) при $m/z = 109, 108, 82, 81$ и 54 за счет элиминирования HCN и CO из фрагмента гипоксантина (рис. 5). Следовательно, присутствие в масс-спектре ББА инозина "тяжелых" пиков фрагментов рибозы II с $m/z = 136, 46\%$ (вместо $m/z = 133, 41\%$) и гипоксантина III с $m/z = 138, 55\%$ (вместо $m/z = 136, 48\%$), а также осколочных пиков низкомолекулярных фрагментов (VII, VIII), 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. Селективный характер включения дейтерия в молекулу инозина по определенным положениям молекулы подтвержден присутствием дейтерия в осколочных фрагментах.

При анализе уровня дейтерированности $[^2H]$ инозина учитывался факт, что уровень и характер включения дейтерия в молекулу определя-

ется путями ассимиляции углерода (глюкоза, аминокислоты) данным штаммом хемогетеротрофных бактерий. Метаболические пути ассимиляции глюкозы хемогетеротрофными бактериями в аэробных условиях определяются в основном гликолизом; анаэробный гликолиз не распространен для этого вида бактерий. Основным источником углерода служила глюкоза, а источником дейтерированных субстратов и аминного азота — гидролизат дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum* ВКПМ В-5662. Поскольку протоны (дейтроны) в положениях рибозного остатка в молекуле инозина могли синтезироваться из глюкозы, характер изотопного включения дейтерия в рибозный остаток молекулы определяется в основном ассимиляцией глюкозы за счет гликолиза по пути Эмбдена—Мейергофа. Поскольку глюкоза в экспериментах использовалась в протонированной форме, ее вклад в уровень обогащения дейтерием рибозного остатка пренебрегался. Однако, вопреки этому, наблюдалось включение дейтерия в рибозный фрагмент молекулы инозина за счет ферментативной изомеризации глюкозы и реакций изотопного (1H — 2H) обмена в процессе изомеризации. Эти обменные процессы также могли приводить к специфическому включению атомов дейтерия по определенным положениям в молекуле инозина. Такими доступными положениями в молекуле инозина являются гидроксильные протоны (OH^+), протоны в C'2, C'3-положениях рибозного остатка, имидазольные протоны при гетероатомах (NH^+) и протоны в N1-положении в гипоксантиновом остатке, которые могут обмениваться на дейтерий в 2H_2O за счет кето-енольной таутомерии. Три не обмениваемые атома дейтерия в рибозном фрагменте молекулы

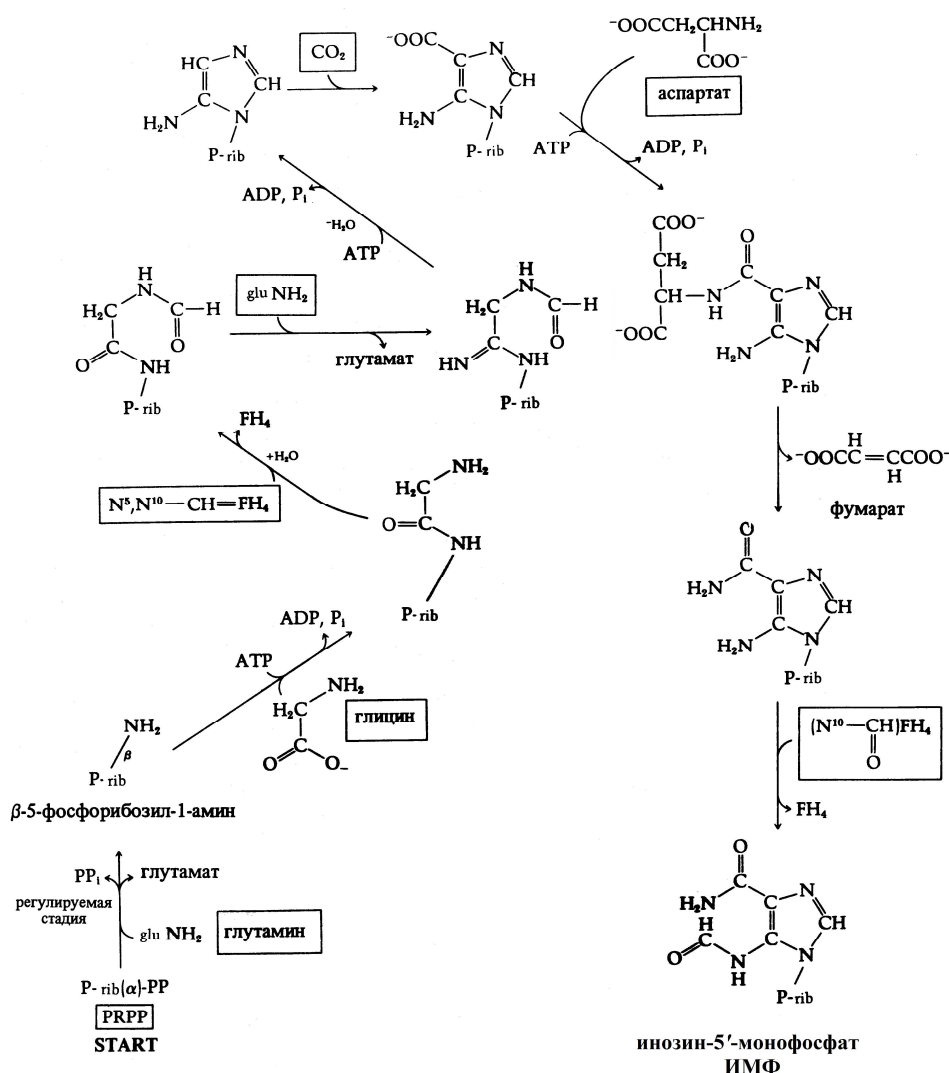


Рис. 6. Общая схема биосинтеза ИМФ микробной клеткой (адаптировано из [21])

могли синтезироваться за счет ферментативной ассимиляции глюкозы клеткой, в то время как два других атома дейтерия в С2-, С8-положениях гипоксантинового остатка могли синтезироваться из [²H]аминокислот — глицина, глутамина и аспартата (с участием N¹⁰-СНО-ФН₄ и N⁵,N¹⁰-СН=ФН) (рис. 6), источником которых служил дейтерированный гидролизат метилотрофной бактерии *B. methylicum* ВКПМ В-5662. Гликозидный протон в положении β-N₉ гликозидной связи в рибозном фрагменте мог заместиться на дейтерий в процессе реакции элиминирования CO₂ на стадии образования рибулозо-5'-монофосфата из 3-кето-6-фосфоглюконовой кислоты с последующим присоединением протона (дейтерона) по С1-положению рибулозо-5'-монофосфата. В целом

наши исследования подтверждают эту схему [20]. Тем не менее следует отметить, что ауко-трофность этого мутантного штамма в тирозине, гистидине, аденине и урациле предполагает разветвленные метаболические пути, отличные от тех, которые указаны выше, поскольку известно, что промежуточные продукты гликолиза являются предшественниками ряда соединений, как нуклеотиды и аминокислоты. Уровень изотопного обогащения молекулы инозина определяется степенью изотопной чистоты ²H₂O и дейтерированных субстратов и, следовательно, для униформного включения атомов дейтерия в молекулу инозина вместо протонированной глюкозы должен использоваться ее дейтерированный аналог.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно проведенному исследованию, масс-спектрометрия ББА хорошо зарекомендовала себя для изучения путей биосинтеза ^2H -меченого инозина и распределения дейтерия в молекуле. В результате удалось установить места локализации дейтерия в молекуле биосинтетического [^2H]инозина. Наблюдаемый изотопный полиморфизм, сопровождающийся миграцией протона с образованием $[\text{M} + \text{H}]^+$ не является препятствием определения дейтерия в молекуле, который определяется с учетом вклада пиков молекулярных ионов в суммарный уровень дейтерированности молекулы (5 атомов ^2H , 62.5 атом. %). Из пяти включенных в молекулу инозина атомов дейтерия три атома дейтерия в рибозном фрагменте молекулы инозина синтезировались за счет ферментативной изомеризации глюкозы клеткой и реакций изотопного (^1H — ^2H) обмена, в то время как два других атома дейтерия в С2-, С8-положениях гипоксантинового остатка могли синтезироваться из [^2H]аминокислот — глицина, глутамина и аспартата, источником которых служил гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* В-5662. Кроме этого, реакции изотопного (^1H — ^2H) обмена также могли приводить к специфичному включению дейтерия в молекулу. Для достижения более высокого уровня дейтерированности конечного продукта необходимо тщательным образом контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов, в том числе использовать дейтерированную глюкозу, которая может быть выделена в препаративных количествах из дейтерированной биомассы того же штамма метилотрофных бактерий *B. methylicum* ВКПМ В-5662. В будущем планируется получать и идентифицировать разработанным методом другие дейтерированные природные нуклеозиды и их аналоги.

Работа осуществлялась при финансовой поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 48-РП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen B., Jamieson E.R., Tullius T.D. A general synthesis of specifically deuterated nucleotides for studies of DNA and RNA // *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 2002. Vol. 12. P. 3093–3096. Doi: 10.1016/S0960-894X(02)00650-9.
2. Kundu M.T., Trifonova A., Dinya Z., Foldes A., Chattopadhyaya J. Synthetic studies to improve the deuterium labeling in nucleosides for facilitating structural studies of large RNAs by high-field NMR spectroscopy // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2001. Vol. 20, no. 4-7. P. 1333–1337. Doi: 10.1081/NCN-100002549.
3. Chirakul P., Litzer J.R., Sigurdsson S.T. Preparation of base-deuterated 2'-deoxyadenosine nucleosides and their site-specific incorporation into DNA // *Nucleosid., Nucleotid. Nucleic Acids*. 2001. Vol. 20, no. 12. P. 1903–1913. Doi: 10.1081/NCN-100108321.
4. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот бактериальных объектов // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22, № 10-11. С. 856–869.
5. Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И. Биосинтез фотопреобразующего трансмембранного белка [^2H]бактериородопсина, меченного дейтерием по остаткам ароматических аминокислот [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe, [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp // *Научное приборостроение*. 2013. Т. 23, № 2. С. 14–26. URL: <http://213.170.69.26/mag/2013/full2/Art3.pdf>.
6. Caprioli R.M. Continuous flow fast atom bombardment mass spectrometry / R.M. Caprioli (ed.). New York: Wiley, 1990. 125 p. Doi: 10.1016/0076-6879(90)93417-j.
7. Tomer K.B. The development of fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of biomolecules // *Mass Spectrometry Reviews*. 1989. Vol. 8, no. 6. P. 445–482. Doi: 10.1002/mas.1280080602.
8. Morris H.R., Panico M., Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A. Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. Vol. 101, no. 2. P. 623–631. Doi: 10.1002/mas.1280080602.
9. Muñoz García D., Midaglia L., Martínez Vilela J. et al. // *Acta Neurologica Scandinavica*. 2015. Vol. 131. no. 6. P. 405–410. Doi: 10.1111/ane.12333.
10. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И. Биосинтез дейтерированного инозина бактерией *Bacillus subtilis* на тяжеловодородной среде // *Изв. Акад. наук. Серия биологическая*. 1999. № 4. С. 396–402.
11. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1999. Vol. 62, no. 2. P. 225–229. Doi: 10.1271/bbb.62.225.
12. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2013. Vol. 7, no. 3. P. 249–260.
13. Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И. Исследование микробного синтеза дейтерий-меченого L-фенилаланина факультативной метилотрофной бактерией *Brevibacterium methylicum* на средах с различным содержанием тяжелой воды // *Биофармацевтический журнал*. 2012. Т. 4, № 1. С. 11–22.
14. Мосин О.В., Игнатов И. Биологическое воздействие дейтерия на клетки прокариот и эукариот // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014. Т. 2, № 7. С. 122–131.

15. Мосин О.В., Казаринова Л.А., Преображенская К.А., Складнев Д.А., Юркевич А.М., Швец Д.А. Рост бактерии *Bacillus subtilis* и биосинтез инозина на высокодейтерированной среде // Биотехнология. 1996. № 4. С. 19–26.
16. Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И. Микробиологический синтез [²H]инозина высокого уровня дейтерированности грамм-положительной хемотротрофной бактерией *Bacillus subtilis* // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49, № 3. Р. 255–266. Doi: 10.1134/S0003683813030137.
17. Mosin O.V., Ignatov I. Microbiological synthesis of ²H-labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylcum* // International Journal of BioMedicine. 2013. Vol. 3, no. 2. Р. 132–138.
18. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швец В.И. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых ²H- и ¹³C-аминокислот // Биотехнология. 1996. № 5. С. 25–34.
19. Мосин О.В., Игнатов И., Швец В.И., Тыминский Г. Масс спектрометрия электронного удара в анализе включения стабильных изотопов дейтерия и углерода-13 в молекулы аминокислот биологических объектов // Научное приборостроение. 2015. Т. 25, № 4. Р. 3–18. URL: <http://213.170.69.26/mag/2015/full4/Art1.pdf>.
20. Ignatov I., Mosin O.V. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Bacillus subtilis* in heavy water as model system // Journal of Natural Sciences Research. 2013. Vol. 3, no. 9. Р. 65–76.
21. Bohinski R.C. Modern concepts in biochemistry / R.C. Bohinski (ed.). Boston, London, Sydney, Toronto, Massachusetts: Allyn & Bacon Inc, 1983. 378 p.

**Московский государственный университет
прикладной биотехнологии (Мосин О.В.)**

**Научно-исследовательский центр медицинской
биофизики, София, Болгария (Игнатов И.)**

**Московский государственный университет тонких
химических технологий им. М. В. Ломоносова
(Швец В.И.)**

**Европейское научное общество, Европейская акаде-
мия естественных наук, Ганновер, Германия
(Тыминский Г.)**

Контакты: Мосин Олег Викторович,
mosin-oleg@yandex.ru

Материал поступил в редакцию: 14.02.2016

FAST ATOM BOMBARDMENT MASS SPECTROMETRY IN EVALUATION OF BIOSYNTHETIC PATHWAYS OF PURINE RIBONUCLEOSIDE [²H]INOSINE

O. V. Mosin¹, I. Ignatov², V. I. Shvets³, G. Tyminski⁴

¹Moscow State University of Applied Biotechnology, Russia

²The Scientific Research Center of Medical Biophysics, Sofia, Bulgaria

³Moscow State University of Fine Chemical Technology named after M.V. Lomonosov, Russia

⁴European Scientific Society, European Academy of Natural Sciences, Hannover, Germany

In this paper was demonstrated the possibility of the use of fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry on an impulse mass spectrometer VG-70 SEQ ("Fisons VG Analytical", USA) for the study of biosynthetic pathways of ²H-labeled purine ribonucleoside inosine secreted into the culture liquid (CL) by Gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis* VKPM B-3157 when grown on heavy water (HW) medium with 2 % hydrolyzate of deuterated biomass of methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylcum* VKPM B-5662 as a source of growth ²H-labeled substrates. Isolation of ²H-labeled inosine from the LC was performed by adsorption/desorption on activated carbon with following extraction by 0.3 M ammonium–formate buffer (pH = 8.9), crystallization in 80 % (v/v) ethanol and ion exchange chromatography (IEC) on a column with AG50WX 4 cation exchange resin equilibrated with 0.3 M ammonium–formate buffer and 0.045 M NH₄Cl. The investigation of deuterium incorporation into the molecule of biosynthetic [²H]inosine by FAB mass spectrometry demonstrated the incorporation of 5 deuterium atoms into the molecule (the total level of deuterium enrichment — 62.5 atom% ²H) with incorporation of 3 deuterium atoms into the ribose and 2 deuterium atoms — into the hypoxanthine residue of the molecule. Three non-exchangeable deuterium atoms were incorporated into the ribose residue owing to reactions of enzymatic isomerization of glucose in ²H₂O-medium due to reactions of glycolysis, associated with the Embden-Meyerhof pathway with participation of reactions of isotope (¹H–²H) exchange, while two other deuterium atoms at C2, C8-positions in the hypoxanthine residue were synthesized from [²H]amino acids that originated from the deuterated hydrolysate of the methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylcum* VKPM B-5662.

Keywords: ²H-labeled inosine, biosynthesis, heavy water, *Bacillus subtilis* VKPM B-3157, mass spectrometry FAB

REFERENCES

1. Chen B., Jamieson E.R., Tullius T.D. A general synthesis of specifically deuterated nucleotides for studies of DNA and RNA. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2002, vol. 12, pp. 3093–3096. Doi: 10.1016/S0960-894X(02)00650-9.
2. Kundu M.T., Trifonova A., Dinya Z., Foldes A., Chattopadhyaya J. Synthetic studies to improve the deuterium labelling in nucleosides for facilitating structural studies of large RNAs by high-field NMR spectroscopy. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, vol. 20, no. 4–7, pp. 1333–1337. Doi: 10.1081/NCN-100002549.
3. Chirakul P., Litzer J.R., Sigurdsson S.T. Preparation of base-deuterated 2'-deoxyadenosine nucleosides and their site-specific incorporation into DNA. *Nucleosid., Nucleotid. Nucleic Acids*, 2001, vol. 20, no. 12, pp. 1903–1913. Doi: 10.1081/NCN-100108321.
4. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvets V.I. [Mass-spectrometry evaluation of enrichment levels of ²H and ¹³C isotopes in molecules of bacterial objects]. *Bioorganicheskaja himija* [Bioorganic chemistry], 1996, vol. 22, no. 10–11, pp. 856–869 (In Russ.).
5. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. [Biosynthesis of transmembrane photo-transforming protein [²H]bacteriorhodopsin, labeled with deuterium on residues of aromatic amino acids [2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr и [2,4,5,6,7-²H₅]Trp]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2013, vol. 23, no. 2, pp. 14–26 URL: <http://213.170.69.26/mag/2013/full2/Art3.pdf> (In Russ.).
6. Caprioli R.M. *Continuous flow fast atom bombardment mass spectrometry*. Ed. R.M. Caprioli, New York, Wiley, 1990. 125 p. Doi: 10.1016/0076-6879(90)93417-j.
7. Tomer K.B. The development of fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of biomolecules. *Mass Spectrometry Reviews*, 1989, vol. 8, no. 6, pp. 445–482. Doi: 10.1002/mas.1280080602.
8. Morris H.R., Panico M., Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A. Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 101, no. 2, pp. 623–631. Doi: 10.1002/mas.1280080602.
9. Muñoz García D., Midaglia L., Martínez Vilela J. et al. Associated Inosine to interferon: results of a clinical trial

- in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2015, vol. 131, no. 6, pp. 405–410. Doi: 10.1111/ane.12333.
10. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. [Biosynthesis of ^2H -labelled inosine by bacterium *Bacillus subtilis* on heavy water medium]. *Izv. RAN. Ser. Biologicheskaja* [News of the Russian Academy of Sciences. A series is biological], 1999, vol. 4, pp. 396–402 (In Russ.).
 11. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1999, vol. 62, no. 2, pp. 225–229. Doi: 10.1271/bbb.62.225.
 12. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2013, vol. 7, no. 3, pp. 249–260.
 13. Mosin O.V., Shvets V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. [Studying of microbial synthesis of deuterium labeled L-phenylalanine by methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* on media with different content of heavy water]. *Biofarmaceuticheskij zhurnal* [Russian Journal of Biopharmaceuticals], 2012, vol. 4, no. 1, pp. P. 11–22 (In Russ.).
 14. Mosin O.V., Ignatov I. [Biological influence of deuterium on prokaryotic and eukaryotic cells]. *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv* [Drug development and registration], 2014, vol. 2, no. 7, pp. 122–131 (In Russ.).
 15. Mosin O.V., Kazarinova L.A., Preobrazhenskaja K.A., Skladnev D.A., Jurkevich A.M., Shvets V.I. [Growth of the bacteria *Bacillus subtilis*, and the biosynthesis of inosine on high deuterated medium]. *Biotechnologiya* [Biotechnology], 1996, no. 4, pp. 19–26 (In Russ.).
 16. Mosin O.V., Shvez V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Microbiological synthesis of [^2H]inosine with high degree of isotopic enrichment by Gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2013, vol. 49, no. 3, pp. 255–266. Doi: 10.1134/S0003683813030137.
 17. Mosin O.V., Ignatov I. Microbiological synthesis of ^2H -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum*. *International Journal of BioMedicine*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 132–138.
 18. Skladnev D.A., Mosin O.V., Egorova T.A., Eremin S.V., Shvets V.I. [Methylotrophic bacteria – the sources of isotopically labeled ^2H - and ^{13}C -amino acids]. *Biotechnologiya* [Biotechnology], 1996, no. 5, pp. 24–34 (In Russ.).
 19. Mosin O.V., Ignatov I., Shvets V.I., Tyminski G. Electron impact mass spectrometry in analysis of introduction of stable isotopes of deuterium and carbon-13 into amino acid molecules from bacterial objects. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 4, pp. 14–26. Doi: 10.18358/np-25-4-i318 (In Russ.).
 20. Ignatov I., Mosin O.V. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Bacillus subtilis* in heavy water as model system. *Journal of Natural Sciences Research*, 2013, vol. 3, no. 9, pp. 65–76.
 21. Bohinski R.C. *Modern concepts in biochemistry*. R.C. Bohinski, ed., Boston, London, Sydney, Toronto, Massachusetts, Allyn & Bacon Inc., 1983, 378 p.

Contacts: Mosin Oleg Victorovich,
mosin-oleg@yandex.ru

Article received in edition: 14.02.2016