
EUROPEAN  of Molecular
Journal Biotechnology

Has been issued since 2013.
ISSN 2310-6255.
2014. Vol.(3). № 1. Issued 4 times a year

EDITORIAL STAFF

Dr. Novochadov Valerii – Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation
(Editor-in-Chief)

Dr. Goncharova Nadezhda – Research Institute of Medical Primatology, Sochi,
Russian Federation

EDITORIAL BOARD

Dr. Garbuzova Victoriia – Sumy State University, Sumy, Ukraine

Dr. Ignatov Ignat – Scientific Research Center of Medical Biophysics, Sofia, Bulgaria

Dr. Malcevski Alessio – University of Parma, Parma, Italy

Dr. Nefed'eva Elena – Volgograd State Technological University, Volgograd, Russian
Federation

Dr. Tarantseva Klara – Penza State Technological University, Penza, Russian Federation

The journal is registered by Federal Service for Supervision of Mass Media,
Communications and Protection of Cultural Heritage (Russian Federation). Registration
Certificate ПИ № ФС77-55114 26.08.2013.

Journal is indexed by: **CiteFactor** - Directory of International Research Journals (Canada),
Cross Ref (USA), E-library (Russian Federation), **International Society of Universal
Research in Sciences** (Pakistan), **Journal Index** (USA), **Open Academic Journals
Index** (Russian Federation), **Sherpa Romeo** (Spain), **Universal Impact Factor** (Australia),
ULRICH's WEB (USA).

All manuscripts are peer reviewed by experts in the respective field. Authors of
the manuscripts bear responsibility for their content, credibility and reliability.

Editorial board doesn't expect the manuscripts' authors to always agree with its
opinion.

Postal Address: 26/2 Konstitucii, Office 6
354000 Sochi, Russian Federation

Website: <http://ejournal8.com/>
E-mail: ejm2013@mail.ru

Founder and Editor: Academic Publishing
House *Researcher*

Passed for printing 16.03.14.

Format 21 × 29,7/4.

Enamel-paper. Print screen.

Headset Georgia.

Ych. Izd. l. 4,5. Ysl. pech. l. 4,2.

Circulation 1000 copies. Order № 3.

European Journal of Molecular Biotechnology

2014

№

1



Издается с 2013 г. ISSN 2310-6255.
2014. № 1 (3). Выходит 4 раза в год.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Новочадов Валерий – Волгоградский государственный университет, Волгоград, Российская Федерация (Гл. редактор)

Гончарова Надежда – Научно-исследовательский институт медицинской приматологии РАМН, Сочи, Российская Федерация

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Гарбузова Виктория – Сумский государственный университет, Сумы, Украина

Игнатов Игнат – Научно-исследовательский центр медицинской биофизики, София, Болгария

Малкевечи Алессио – Университет города Парма, Парма, Италия

Нефедьева Елена – Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Российская Федерация

Таранцева Клара – Пензенский государственный технологический университет, Пенза, Российская Федерация

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия (Российская Федерация). Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-55114 от 26.08.2013 г.

Журнал индексируется в: **CiteFactor** - Directory of International Research Journals (Канада), **Cross Ref** (США), **E-library** (Россия), **International Society of Universal Research in Sciences** (Пакистан), **Journal Index** (США), **Open Academic Journals Index** (Россия), **Sherpa Romeo** (Испания), **Universal Impact Factor** (Австралия), **ULRICH's WEB** (США).

Статьи, поступившие в редакцию, рецензируются. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несут авторы публикаций.

Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов.

Адрес редакции: 354000, Российская Федерация, г. Сочи, ул. Конституции, д. 26/2, оф. 6

Сайт журнала: <http://ejournal8.com/>

E-mail: ejm2013@mail.ru

Подписано в печать 16.03.14.

Формат 21 × 29,7/4.

Бумага офсетная.

Печать трафаретная.

Гарнитура Georgia.

Учредитель и издатель: ООО «Научный издательский дом "Исследователь"» - Academic Publishing House *Researcher*

Уч.-изд. л. 4,5. Усл. печ. л. 4,2.

Тираж 1000 экз. Заказ № 3.

C O N T E N T S

Pavel A. Krylov The Grouping of Chondrocyte Receptors According to Their Control over Cartilage Tissue Remodeling	4
Oleg Mosin, Ignat Ignatov Biological Influence of Deuterium on Procariotic and Eukaryotic Cells	11
Oleg Mosin, Ignat Ignatov, Dmitry Skladnev, Vitaly Shvets Using of Facultative Methylophilic Bacterium <i>Brevibacterium Methylicum B-5652</i> With RMP-cycle of Carbon Assimilation for Microbiological Synthesis of [² H]phenylalanine With Different Levels of Deuterium Enrichment	25
Ildar G. Shaikhiev Linen Fire as Biosorbent to Remove Heavy Metal Ions From Wastewater Modeling	41

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Journal of Molecular Biotechnology
Has been issued since 2013.
ISSN: 2310-6255
Vol. 3, No. 1, pp. 4-10, 2014

DOI: 10.13187/issn.2310-6255
www.ejournal8.com



UDC 51-76: 612.751.2

The Grouping of Chondrocyte Receptors According to Their Control over Cartilage Tissue Remodeling

Pavel A. Krylov

Volgograd State University, Russian Federation
Universitetskiiy Avenue 100, Volgograd city, 400062
Post-graduate student, Laboratory assistant
E-mail: p.krylov.volsu@yandex.ru

Abstract. To give the empirical space for development of molecular biotechnologies in regenerative medicine the article presents a systematic review of new data for the last 5 years, dedicated to chondrocyte receptor apparatus, connected to physiological and reparative regeneration in articular cartilage. The main attention is given to the receptors of chondrocytes involved in synthesis and degradation extracellular matrix, differentiation and apoptosis of chondrocytes.

Keywords: chondrocyte receptors; articular cartilage; extracellular matrix; apoptosis; tissue; engineering.

Introduction.

Progressive damage and loss of tissue in the articular cartilage is major problem of regenerative medicine. This pathology is so widespread that it can be called the multifactorial «disease of civilization». The diseases of joints are important in reducing the quality of life for people of all ages, limiting the working ability of the population, which lead to high costs of prevention and medical care. Low regenerative capacity of the cartilage is serious medical and biological problem resulting in the difficulties in organotypical restoration of articular cartilage after trauma or in severe forms of osteoarthritis [1].

Chondrocytes complete the cellular pool providing regeneration and restoration of the cartilage during all life. Their receptor apparatus is intended to regulate the process of self-renewal and repair of tissue which determine the functional state of the hyaline cartilage. These processes include, as a minimum, synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM), differentiation and apoptosis of chondrocytes [2, 3, 4]. The same processes regulate cartilage healing after trauma or osteoarthritis [4, 5].

The aim of this work is to carry out the grouping of chondrocyte receptors, as the regulatory tool of basic molecular processes in cartilage.

Material and methods.

To form the adequate groups of receptors, exhaustive search and analysis of literature was performed using open resources: PubMed, PubMedCentral, PDB and the Russian scientific electronic library (E-library). The search was carried out using the following keywords: receptors chondrocytes, chondrogenesis, matrix cartilage, cartilage, osteoarthritis & molecular biology,

matrix metalloproteinase in Russian and English equivalents. For the detailed analysis we selected more than 300 sources over a 10-year period. Microsoft Office Access was used to create a grouping database. The criteria of adequacy, completeness, and stability characteristics were used for holding groups. In the end following list of information was formed to write the record in the database: the name of the receptor with all synonyms (1), belonging to the family (2); binding ligands (3); secondary messengers and executive intracellular molecules (4); proven involvement in the regulation of synthesis, the collapse of the extracellular matrix, differentiation and apoptosis of chondrocytes (5). Part of the receptor in each of these processes was noted separately. We have selected the key receptors: transforming growth factor beta ($TGF\beta R$), bone morphogenetic proteins (BMPR), insulin-like growth factor (IGF-1R), toll-like receptor (TLR), tumor necrosis factor (TNFR), interleukin 1 (IL-1R), leptin (LRB), angiotensin (ATR), CD44, and prostaglandins (E2/E4). All of the receptors mentioned above have a direct or indirect impact on the catabolic or anabolic function of chondrocytes, as a result, on the remodeling of the cartilaginous tissue (Fig. 1).

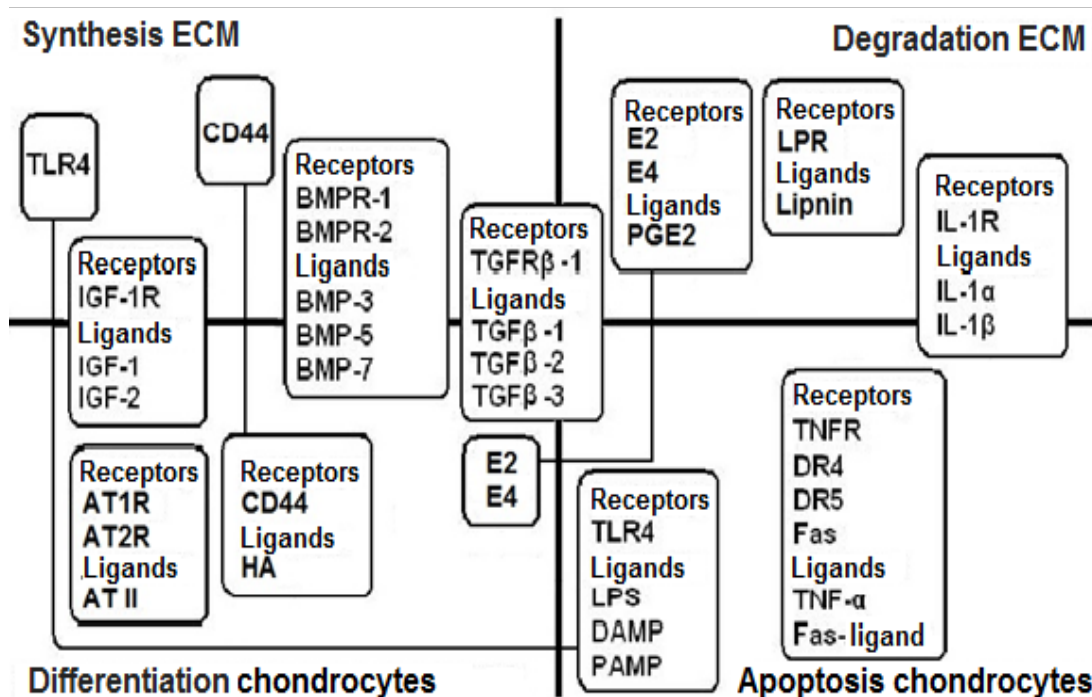


Figure 1. Working groups of chondrocyte receptors in accordance with their participation in the remodeling of the articular cartilage. TLR4, except for the start of apoptosis, takes part in the regulation of proteoglycan synthesis; CD44 in addition to participating in the regulation of ECM synthesis, shows the participation in the differentiation of chondrocytes; PGE2 in addition to running processes of destruction ECM cartilage, shows a possible participation in the differentiation of chondrocytes.

Results and discussion.

During the analysis and study of the receptor apparatus the main receptors and signaling molecules were detected according to their participation in the remodeling of the articular cartilage under normal and pathological conditions. Their interaction with specific ligands led to the activation of one of the four processes associated with remodeling: differentiation (1) or apoptosis (2) of chondrocytes, ECM synthesis including collagen II, X, and aggrecan (3) or ECM degradation (4) by metalloproteinase (MMP), aggrecanase (ADAMTS) in balance with their inhibitors (TIMP) (Fig. 2).

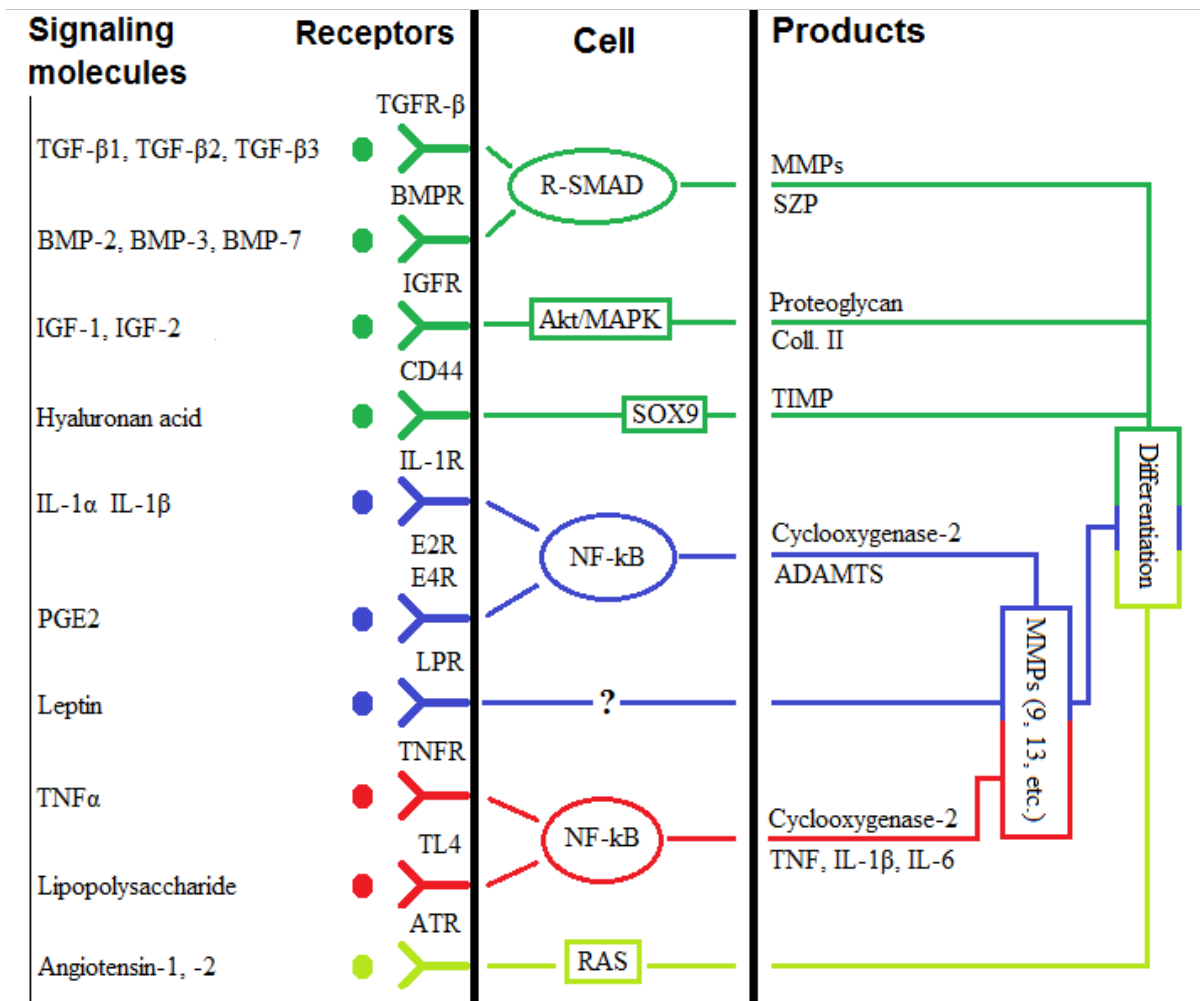


Figure 2. The result of the interaction of chondrocyte receptors with specific ligands, affecting key functions in the cartilage tissue: • – ECM synthesis, differentiation, • – ECM degradation, • – apoptosis, • – differentiation.

Two main families (TFR and BMPR) are crucial in the regulation of ECM synthesis and differentiation of chondrocytes. They include TGFR-1, TGFR-2, TGFR- β 3 associated with the relevant molecules of TGF β super family, and BMPR, affine to BMP2, BMP4, BMP6 and BMP7 [6, 7]. Intracellular signal transmission from TGFR-beta and BMPR is carried out by phosphorylation of R-Smad (1, 2, 3, 5, 8) with the subsequent activation of the transcription factor and synthesis of matrix metalloproteinases and superficial zone protein (SZP) [4, 8, 9, 10]. Receptor IGF-1R, participating in the regulation of ECM synthesis, can communicate with IGF-1 and IGF-2 ligands. As a result of this interaction the synthesis of proteoglycans and collagen II is activated on the signal pathway Akt/MAPK [11]. Another feature of IGF-1R also takes part in the process of chondrocyte differentiation [12].

CD44 is another receptor, which was expressed on the chondrocyte membrane, with the similar regulatory functions due to its ability to bind with hyaluronic acid. Their interaction activates transmission of a signal by the transcription factor SOX9, which allows the receptor to react to cartilage ECM by the increase of MMP synthesis in chondrocytes [13]. A family of TLR-4 receptors, specifically recognizing bacterial lipopolysaccharide, also affects the ECM synthesis [14]. The TLR-4 activation leads to the increased synthesis of MMP-13 and cyclooxygenase-2, with parallel reduction of collagen II synthesis [15].

Next group of receptors may affect ECM volume by stimulation of its degradation. Thus, IL-1R has similar properties when it started, interaction with the IL-1 α and IL-1 β leads to stimulation of MMP synthesis resulting in increased degradation of cartilage matrix proteins [16]. Interaction of IL-1 β with IL-1R can also induce apoptosis of chondrocytes with the progressive degenerative

changes in the cartilage [17]. All these processes are regulated by the transcription nuclear factor (NF- κ B). In chondrocytes NF- κ B is a key regulator of MMP and cyclooxygenase-2 in chondrocytes [11]. Extracellular prostaglandins can get bound to specific receptors E2, E4 which results in slowed synthesis of aggrecans and proteoglycans but in increase of MMP-13 and ADAMTS-5 synthesis. As a result, the progressive decrease of the ECM density has followed. Some data support prostaglandins, in addition to their role in the degradation of ECM, to contribute chondrogenesis and terminal differentiation of chondrocytes [18, 19].

Currently, there is evidence that leptins also had specific receptors (LRB) on the membrane of chondrocytes. The role of these signals in the cartilage is not fully understood, but it is possible that such interactions could regulate the differentiation of chondrocytes and synthesis of collagen X. It is unclear whether this is a direct or indirect effect of leptin [20].

Differentiation of chondrocytes is key to supporting homeostasis in cartilage. As was discussed above, TGFR b BMPR IGF-1R are main receptors in the regulation of differentiation of chondrocytes. In addition to these ones, CD44 can take part in this process. It should be noted that CD44 expression of young chondrocytes is higher than in adult hypertrophic cells [13]. Today there is evidence that renin-angiotensin system takes part in the regulation of chondrocyte differentiation. Angiotensin II molecule interacts with specific receptors AT1R and AT2R. Their interaction results in the differentiation of mesenchyme cells into hypertrophic chondrocytes starts [14].

TNFR1, Fas/apo-1(CD95) and TRAILR-1 (DR4) represent the receptor group regulating the apoptosis of chondrocytes. Fas- and TNF-mediated apoptosis develops in caspase-dependent manner, with the participation of caspase-8. In case of transfer of apoptotic signal through TNFR, the simultaneous anti-apoptotic signal results in gene expression of cytokines TNF, IL-1 β , IL-6, and collagenase stromelysin and adhesion molecules. TRAIL-receptors modulate the two different signals: activation of caspases (1), and the expression of nuclear transcription factor gene NF-KB [21].

Conclusion.

The grouping of chondrocyte receptors (The grouping of chondrocyte receptors) described in this paper is an attempt to make a new step in understanding their role in mediated processes due to natural remodeling and reparative regeneration of articular cartilage. In future it is planned to use this grouping to create a mathematical model, which will more accurately predict the development of various processes in the cartilaginous tissue under the action of different signal molecules. This grouping gives an analytical tool in molecular biology, biotechnology, and regenerative biomedicine.

Примечания:

1. Маланин Д.А., Писарев В.Б., Новочадов В.В. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе. *Волгоград: Волгоградское научное издательство*, 2010. 518 с.
2. Hubmacher D., Apte S.S. The biology of the extracellular matrix: novel insights // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2013. Vol. 25, № 1. P. 65–70.
3. Susan R. Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium // *J. Histochem. Cytochem.* 2006. Vol. 54, № 9, P. 1005–1014.
4. Wu G., Zhu L., Dent J.E., Nardini C. A comprehensive molecular interaction map for rheumatoid arthritis // *PLoS ONE*. 2010 Vol. 5, № 4. e10137.
5. Маланин Д.А., Жуликов А.Л., Новочадов В.В. Морфологическая характеристика регенератов после холодноплазменной обработки экспериментальных неполнослойных повреждений гиалинового хряща // *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки*. 2011. №2. С. 33-40.
6. Tchetina E.V. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis // *Arthritis*. 2011. ID 683970, 16 p.
7. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща (обзор литературы) // *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки*. 2013. № 1. С. 19-28.

8. Jorge A., Roman-Blas M.D., David G., et al. Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes // *Osteoarthritis Cartilage*. 2007. Vol. 12. P. 1367–1377.
9. Papathanasiou I., Malizos K.N., Tsezou A. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes // *Arthritis Res Ther*. 2012. Vol. 14, № 2. R82.
10. Andrades J.A., Motaung S.C., Jiménez-Palomo P. Induction of superficial zone protein (SZP)/lubricin/PRG 4 in muscle-derived mesenchymal stem/progenitor cells by transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-7 // *Arthritis Res. The*. 2012. Vol. 14, № 2. R72.
11. Montaseri A., Busch F. IGF-1 and PDGF-bb Suppress IL-1 β -Induced Cartilage Degradation through Down-Regulation of NF- κ B Signaling: Involvement of Src/PI-3K/AKT Pathway // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 12. e28663.
12. Wang Y., Cheng Z., Elalieh H.Z., et. al. IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway // *J. Bone Mineral Res*. 2011. Vol. 26, № 7. P. 1437–1446.
13. Takahashi N., Knudson C.B., Thankamony S., et. al. Induction of CD44 Cleavage in Articular Chondrocytes // *Arthritis Rheum*. 2010. Vol. 62, № 5. P. 1338–1348.
14. Bobacz K., Sunk I.G., Hofstaetter J.G., et. al. Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7 // *Arthritis & Rheumatism*. 2007. Vol. 56, № 6. P. 1880–1893.
15. Chen Y.J., Sheu M.L., Tsai K.S., et. al. Advanced Glycation End Products Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Down-Regulation-Related Inflammatory Signals in Human Chondrocytes via Toll-Like Receptor-4 and receptor for advanced glycation end products // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 6. e66611.
16. Goldring M.B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis*. 2012. Vol. 4, № 4. P. 269–285.
17. Tsukamoto I., Inoue S., Teramura T., et. al. Activating types 1 and 2 angiotensin II receptors modulate the hypertrophic differentiation of chondrocytes // *FEBS Open Bio*. 2013. Vol. 3. P. 279–284.
18. Wang P., Zhu F., Konstantopoulos K. Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B activation // *Cell Physiol*. 2010. Vol. 298, № 6. P. 1445–1456.
19. Li X., Ellman M., Im H.-J. PGE₂ and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis // *Arthritis Rheum*. 2009. Vol. 60, № 2. P. 513–523.
20. Ohba S., Lanigan T.M., Roessler B.J. Leptin receptor JAK2/STAT3 signaling modulates expression of frizzled receptors in articular chondrocytes // *Osteoarthritis Cartil*. 2010. Vol. 18, № 12. P. 1620–1629.
21. Intakhab-Alam N.Y., White O.B., Getting S.J. Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? // *Cell Death Dis*. 2013. Vol. 4, e717.

References:

1. Malanin D.A., Pisarev V.B., Novochadov V.V. (2010) Restoration of Cartilage Lesions in a Knee Joint: Monograph. *Volgograd: Volgograd Scientific Publishing*, 518 pp. [in Rus.]
2. Hubmacher D., Apte S.S. (2013) The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr. Opin. Rheumatol*. 25(1), pp. 65–70.
3. Susan R. (2006) Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium. *J. Histochem. Cytochem*. 54(9), pp. 1005–1014.
4. Wu G., Zhu L., Dent J.E., Nardini C. (2010) A comprehensive molecular interaction map for rheumatoid arthritis. *PLoS ONE* 5(4), e10137.
5. Malanin D.A., Zhulikov A.L., Novochadov V.V. (2011) Morphological characteristics regenerates after cold plasma processing of experimental full-layer damage hyaline cartilage.

Science Journal of Volgograd State University. Natural sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki]. (2), pp. 33–40. [in Rus.]

6. Tchetina E.V. (2011) Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis*. ID 683970, 16 pp.

7. Novochadov V.V. (2013) Problem management cellular settlement and remodeling tissue-engineered matrices for the recovery of the articular cartilage (review). *Science Journal of Volgograd State University. Natural sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki].* (1), pp. 19-28. [in Rus.]

8. Jorge A., Roman-Blas M.D., David G., et al. (2007) Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 15(12), pp. 1367–1377.

9. Papathanasiou I., Malizos K.N., Tsezou A. (2012) Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 14(2), R82.

10. Andrades J.A., Motaung S.C., Jiménez-Palomo P. (2012) Induction of superficial zone protein (SZP)/lubricin/PRG 4 in muscle-derived mesenchymal stem/progenitor cells by transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-7. *Arthritis Res. Ther*. 14(2), R72.

11. Montaseri A., Busch F. (2011) IGF-1 and PDGF-bb Suppress IL-1 β -Induced Cartilage Degradation through Down-Regulation of NF- κ B Signaling: Involvement of Src/PI-3K/AKT Pathway. *PLoS One*. 6(12), e28663.

12. Wang Y., Cheng Z., Elalieh H.Z., et. al. (2011) IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. *J. Bone Mineral Res*. 26(7), pp. 1437–1446.

13. Takahashi N., Knudson C.B., Thankamony S., et. al. (2010) Induction of CD44 Cleavage in Articular Chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 62(5), pp. 1338–1348.

14. Bobacz K., Sunk I.G., Hofstaetter J.G., et. al. (2007) Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7. *Arthritis & Rheumatism*. 56(6), pp. 1880–1893.

15. Chen Y.J., Sheu M.L., Tsai K.S., et. al. (2013) Advanced Glycation End Products Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Down-Regulation-Related Inflammatory Signals in Human Chondrocytes via Toll-Like Receptor-4 and receptor for advanced glycation end products. *PLoS One*. 8(6), e66611.

16. Goldring M.B. (2012) Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis*. 4(4), pp. 269–285.

17. Tsukamoto I., Inoue S., Teramura T., et. al. (2013) Activating types 1 and 2 angiotensin II receptors modulate the hypertrophic differentiation of chondrocytes. *FEBS Open Bio*. 3, pp. 279–284.

18. Wang P., Zhu F., Konstantopoulos K. (2010) Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B activation. *Cell Physiol*. 298(6), pp. 1445–1456.

19. Li X., Ellman M., Im H.-J. (2009) PGE₂ and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 60(2), pp. 513–523.

20. Ohba S., Lanigan T.M., Roessler B.J. (2010) Leptin receptor JAK2/STAT3 signaling modulates expression of frizzled receptors in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartil*. 18(12), pp. 1620–1629.

21. Intakhab-Alam N.Y., White O.B., Getting S.J. (2013) Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? *Cell Death Dis*. 4, e717.

UDC 51-76: 612.751.2

**Группировка рецепторов хондроцитов по их участию в управлении
ремоделированием хрящевой ткани**

Павел А. Крылов

Волгоградский государственный университет, Российская Федерация

Волгоград, пр. Университетский, 100, 400062

Аспирант

E-mail: p.krylov.volsu@yandex.ru

Аннотация. В статье, на основании фундаментальных закономерностей молекулярной биологии и биотехнологических потребностей регенеративной медицины, представлен систематический обзор новых данных о рецепторном аппарате хондроцитов за последние 5 лет. Данные сгруппированы так, чтобы показать дифференцированное участие рецепторов в ключевых процессах, связанных с естественным remodelированием и репаративной регенерацией хрящевой ткани: синтезе и деградации экстрацеллюлярного матрикса, дифференцировке и апоптоза хондроцитов.

Ключевые слова: рецепторы хондроцитов; суставной хрящ; экстрацеллюлярный матрикс; дифференцировка; апоптоз; тканевая инженерия.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Journal of Molecular Biotechnology
Has been issued since 2013.
ISSN: 2310-6255
Vol. 3, No. 1, pp. 11-24, 2014

DOI: 10.13187/issn.2310-6255
www.ejournal8.com



UDC 579.871.08, 577.112.385.4.08

Biological Influence of Deuterium on Prokaryotic and Eukaryotic Cells

¹Oleg Mosin
²Ignat Ignatov

¹Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)
103316, Moscow, Talalikhina ulitza, 33
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

²The 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

Abstract. Biologic influence of deuterium (D) on cells of various taxonomic groups of prokaryotic and eukaryotic microorganisms realizing methylotrophic, chemoheterotrophic, photoorganotrophic, and photosynthetic ways of assimilation of carbon substrates are investigated at growth on media with heavy water (D₂O). The method of step by step adaptation technique of cells to D₂O was developed, consisting in plating of cells on 2 % agarose nutrient media containing increasing gradient of concentration of D₂O (from 0 up to 98 % D₂O) and the subsequent selection of stable to D₂O cells. In the result of that technique were obtained adapted to maximum concentration of D₂O cells, biological material of which instead of hydrogen contained deuterium with levels of enrichment 92–97,5 at.% D.

Keywords: deuterium; heavy water; adaptation; isotopic effects; bacteria; blue-green algae.

Introduction.

The most interesting biological phenomenon is the ability of some microorganisms to grow on heavy water (D₂O) media in which all hydrogen atoms are replaced with deuterium [1, 2]. D₂O has high environmental potential due to the absence of radioactivity and possibility of detecting the deuterium label in the molecule by high-resolution methods as NMR, IR, and mass spectrometry that facilitates its use as a tracer in biochemical and biomedical research [3]. The average ratio of H/D in nature makes up approximately 1:5700 [4]. In mixtures of D₂O with H₂O the isotopic exchange occurs with high speed with the formation of semi-heavy water (HDO): D₂O + H₂O = HDO. For this reason deuterium presents in smaller content in aqueous solutions in form of HDO, while in the higher content – in form of D₂O.

The chemical structure of D₂O molecule is analogous to that one for H₂O, with small differences in the length of the covalent H–O-bonds and the angles between them. The molecular mass of D₂O exceeds on 10 % that one for H₂O. The difference in nuclear masses stipulates the isotopic effects, which may be sufficiently essential for H/D pair [5]. As a result, physical-chemical properties of D₂O differ from H₂O: D₂O boils at 101,44 °C, freezes at 3,82 °C, has maximal density at 11,2 °C (1,106 g/cm³) [6]. The chemical reactions in D₂O are somehow slower compared to H₂O.

D₂O is less ionized, the dissociation constant of D₂O is smaller, and the solubility of the organic and inorganic substances in D₂O is smaller compared to these ones in H₂O [7]. Due to isotopic effects the hydrogen bonds with the participation of deuterium are slightly stronger than those ones formed of hydrogen.

For a long time it was considered that heavy water is incompatible with life. Experiments with the growing of cells of different organisms in D₂O show toxic influence of deuterium. The high concentrations of D₂O lead to the slowing down the cellular metabolism, mitotic inhibition of the prophase and in some cases – somatic mutations [8]. This is observed even while using natural water with an increased content of D₂O or HDO [9]. Bacteria can endure up to 90 % (v/v) D₂O, plant cells can develop normally up to 75 % (v/v) D₂O, while animal cells – up to not more than 30 % (v/v) D₂O [10]. The decrease of the deuterium content in water to 25 % (v/v) of the physiological level stimulates the cellular metabolism.

With the development of new microbiological approaches, there appears an opportunity to use adapted to deuterium cells for preparation of deuterated natural compounds [11, 12]. The traditional method for production of deuterium labelled compounds consists in the growth on media containing maximal concentrations of D₂O and deuterated substrates as [D]methanol, [D]glucose etc. [13]. During growth of cells on D₂O are synthesized molecules of biologically important natural compounds (DNA, proteins, amino acids, nucleosides, carbohydrates, fatty acids), which hydrogen atoms at the carbon backbones are completely substituted with deuterium. They are being isolated from deuterated biomass obtained on growth media with high D₂O content and deuterated substrates with using a combination of physico-chemical methods of separation – hydrolysis, precipitation and extraction with organic solvents and chromatographic purification by column chromatography on different adsorbents. These deuterated molecules evidently undergo structural adaptation modifications necessary for the normal functioning in D₂O.

The adaptation to D₂O is interested not only from scientific point, but allows to obtain the unique biological material for the studying of molecular structure by ¹H-NMR [14]. Trend towards the use of deuterium as an isotopic label are stipulated by the absence of radioactivity and possibility of determination the deuterium localization in the molecule by high resolution NMR spectroscopy [15], IR spectroscopy [16] and mass spectrometry [17]. The recent advances in the technical and computing capabilities of analytical methods have allowed to considerable increase the efficiency of de novo biological studies, as well as to carry out structural-functional studies with deuterated molecules on a molecular level.

This study is a continuation of our research for the practical utilization of different cells of bacteria and microalgae for the synthesis of deuterium labeled compounds in deuterated growth media with D₂O. The purpose of our research was studying the physiological influence of deuterium on the cells of different taxonomic groups of microorganisms and microalgae realizing methylotrophic, chemoheterotrophic, photo-organotrophic and photosynthetic pathways of carbon assimilation.

Material and methods.

The objects of the study were various microorganisms, realizing methylotrophic, chemoheterotrophic, photo-organotrophic, and photosynthetic ways of assimilation of carbon substrates. The initial strains were obtained from the State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (Moscow, Russia):

1. *Brevibacterium methylicum* B-5652, a leucine auxotroph Gram-positive strain of facultative methylotrophic bacterium, L-phenylalanine producer, assimilating methanol via the NAD⁺ dependent methanol dehydrogenase variant of ribulose-5-monophosphate cycle (RuMP) of carbon fixation.

2. *Bacillus subtilis* B-3157, a polyauxotrophic for histidine, tyrosine, adenine, and uracil spore-forming aerobic Gram-positive chemoheterotrophic bacterium, inosine producer, realizing hexose-6-mono-phosphate (GMP) cycle of carbohydrates assimilation.

3. *Halobacterium halobium* ET-1001, photo-organotrophic carotenoid-containing strain of extreme halobacteria, synthesizing the phototransforming transmembrane protein bacteriorhodopsin.

4. *Chlorella vulgaris* B-8765, photosynthesizing single-cell blue-green algae.

For preparation of growth media was used D₂O (99,9 at.%) and DCl (95,5 at.%) received from the "Isotope" Russian Research Centre (St. Petersburg, Russian Federation). Inorganic salts and glucose were preliminary crystallized in D₂O and dried in vacuum before using. D₂O distilled over KMnO₄ with the subsequent control of isotope enrichment by ¹H-NMR-spectroscopy on a Bruker WM-250 device ("Bruker", Germany) (working frequency 70 MHz, internal standard Me₄Si).

For cell cultivation and adaptation were used various growth media with an increasing gradient of D₂O concentration from 0; 24,5; 49,0; 73,5 up to 98 % (v/v) D₂O. Cultivation of methylotrophic bacteria was carried out on minimal salt M9 medium (g/l): KH₂PO₄ – 3; Na₂HPO₄ – 6; NaCl – 0,5; NH₄Cl – 1. Cultivation of chemoheterotrophic bacteria was carried out on HW medium (g/l): glucose – 12; yeast extract or hydrolyzed deuterated biomass of *B. methylicum* – 2,5; NH₄NO₃ – 3; MgSO₄·7H₂O – 2; CaCO₃ – 2. Cultivation of photo-organotrophic bacteria was carried out on SM medium (g/l): yeast extract or hydrolyzed deuterated biomass of *B. methylicum* – 2,5; NaCl – 250; MgSO₄·7H₂O – 20; KCl – 2; NH₄Cl – 0,5; KNO₃ – 0,1; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; Na⁺-citrate – 0,5; MnSO₄·2H₂O – 3·10⁻⁴; CaCl₂·6H₂O – 0,065; ZnSO₄·7H₂O – 4·10⁻⁵; FeSO₄·7H₂O – 5·10⁻⁴; CuSO₄·5H₂O – 5·10⁻⁵; glycerol – 1,0. Blue-green algae *C. vulgaris* grew on mineral growth medium (g/l): KNO₃ – 5,0; MgSO₄·7H₂O – 2,5; KH₂PO₄ – 1,25; FeSO₄ – 0,003; MnSO₄·2H₂O – 3·10⁻⁴; CaCl₂·6H₂O – 0,065; ZnSO₄·7H₂O – 4·10⁻⁵; CuSO₄·5H₂O – 5·10⁻⁵; CoCl₂·6H₂O – 5·10⁻⁶.

For adaptation were used solid 2 % (w/v) agarose media with gradually increasing concentration of D₂O, combined with the subsequent selection of individual cellular colonies resistant to deuterium. As a source of deuterated growth substrates for the growth of chemoheterotrophic bacteria and photo-organotrophic bacteria was used the deuterated biomass of facultative methylotrophic bacterium *B. methylicum*, obtained via a multi-stage adaptation on solid 2 % (w/v) agarose M9 media with an increasing gradient of D₂O (from 0; 24,5; 49,0; 73,5 up to 98 % (v/v) D₂O). Raw deuterated biomass (output, 100 gram of wet weight per 1 liter of liquid culture) was suspended in 100 ml 0,5 M ²HCl (in D₂O) and autoclaved for 30–40 min at 0,8 atm. The suspension was neutralized with 0,2 M KOH (in D₂O) to pH = 7,0 and used as a source of growth substrates for growing of chemoheterotrophic bacterium *B. subtilis* and photo-organotrophic bacterium *H. halobium*.

Cellular growth was carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the growth medium at 32–34 °C and vigorously aerated on an orbital shaker Biorad ("Biorad Labs", Poland). Photo-organotrophic bacteria and blue-green algae were grown at illumination by fluorescent monochromatic lamps LDS-40-2 (40 W) ("Alfa-Electro", Russia). Growing of microalgae *C. vulgaris* was carried out at 32 °C in a photoreactor with CO₂ bubbling. Bacterial growth was monitored on ability to form individual colonies on a surface of 2 % (w/v) agarose media, and on optical density of cell suspension measured on Beckman DU-6 (Beckman Coulter, USA) spectrophotometer at λ = 620 nm. After 6–7 days the cells were harvested and separated by centrifugation (10000 g, 20 min) on T-24 centrifuge ("Heracles", Germany). The biomass was washed with D₂O and extracted with a mixture of organic solvents: chloroform-methanol-acetone = 2: 1: 1, % (v/v) for isolating lipids and pigments. The resulting precipitate (10–12 mg) was dried in vacuum and used as a protein fraction, while the liquid extract – as a lipid fraction. The exogenous deuterated amino acids and ribonucleosides were isolated from the liquid cultures of appropriate strain-producers. Inosine was isolated from LC of *B. subtilis* by adsorption/desorption on activated carbon as adsorbent with following extraction with 0,3 M NH₄-formate buffer (pH = 8,9), subsequent crystallization in 80 % (v/v) ethanol, and ion exchange chromatography (IEC) on a column with cation exchange resin AG50WX 4 equilibrated with 0,3 M NH₄-formate buffer and 0,045 M NH₄Cl (output, 3,1 g/l (80 %); [α]_D²⁰ = 1,61 (ethanol)). Bacteriorhodopsin was isolated from the purple membranes of photo-organotrophic halobacterium *H. halobium* by the method of D. Osterhelt, modified by the authors [18].

The analysis of amino acids from protein hydrolyzates was carried out on a Biotronic LC-5001 (230 × 3,2) column ("Eppendorf–Nethleler–Hinz", Germany) with a UR-30 ("Beckman–Spinco", USA) sulfonated styrene (7,25 % cross linked) resin as a stationary phase; the granule diameter was 25 μm; 0,2 N sodium–citrate buffer (pH = 2,5) was used as an eluent; the working pressure – 50–60 atm; the eluent input rate – 18,5 ml/h; the ninhydrin input rate – 9,25 ml/h; detection at λ = 570 and λ = 440 nm (for proline).

Carbohydrates were analyzed on a Knauer Smartline chromatograph ("Knauer", Germany) equipped with a Gilson pump ("Gilson Inc.", Germany) and a Waters K-401 refractometer ("Water Associates", Germany) using Ultrasorb CN as a stationary phase: the column size – 250 × 10 mm; the granule diameter – 10 μm; the mobile phase – acetonitrile–water (75 : 25, % (w/w)); the input rate – 0,6 ml/min.

Fatty acids were analyzed on a Beckman Gold System (USA) chromatograph, equipped with Model 126 Detector (USA). Stationary phase: Ultrasphere ODS, particle size 5 μm, 4,6 × 250 mm; mobile phase: linear gradient of 5 mM KH₂PO₄-acetonitrile, elution rate 0,5 ml/min, detection at λ = 210 nm.

For evaluation of deuterium enrichment levels EI and FAB mass spectrometry was used. EI mass spectra were recorded on MB-80A device ("Hitachi", Japan) with double focusing (the energy of ionizing electrons, 70 eV; the accelerating voltage, 8 kV; the cathode temperature, 180–200 °C) after amino acid modification into methyl esters of N-5-dimethylamino(naphthalene)-1-sulfonyl (dansyl) amino acid derivatives according to an earlier elaborated protocol [19]. FAB-mass spectra were recorded on pulse mass spectrometer VG-70 SEQ ("Fisons VG Analytical", USA), supplied with caesium source Cs⁺ on a glyceric matrix with accelerating pressure 5 κB and an ionic current 8 mA.

IR-spectra were registered on Brucker Vertex ("Brucker", Germany) IR spectrometer (a spectral range: average IR – 370–7800 cm⁻¹; visible – 2500–8000 cm⁻¹; the permission – 0,5 cm⁻¹; accuracy of wave number – 0,1 cm⁻¹ on 2000 cm⁻¹).

Results and discussion.

When biological objects being exposed to water with different deuterium content, their reaction varies depending on the isotopic composition of water and magnitude of isotope effects determined by the difference of constants of chemical reactions rates k_H/k_D in H₂O and D₂O. The maximum kinetic isotopic effect observed at ordinary temperatures in chemical reactions leading to rupture of bonds involving hydrogen and deuterium lies in the range $k_H/k_D = 5-7$ for C–H versus C–D, N–H versus N–D, and O–H versus O–D-bonds. Isotopic effects have an impact not only on the physical and chemical properties of macromolecules, but also on the biological behaviour of biological objects in D₂O. Experiments with D₂O (Table 1) have shown, that green-blue algae is capable to grow on 70 % (v/v) D₂O, methylotrophic bacteria – 75 % (v/v) D₂O, chemoheterotrophic bacteria – 82 % (v/v) D₂O, and photo-organotrophic halobacteria – 95 % (v/v) D₂O.

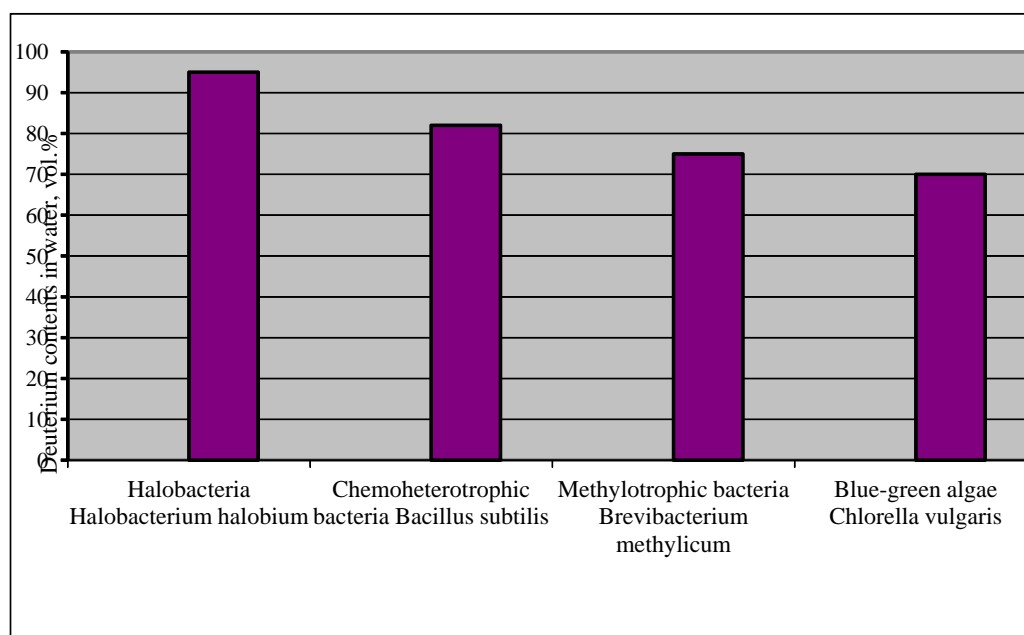


Figure 1. Cell survival of studied microorganisms in water with different deuterium content

In the course of the experiment were obtained adapted to the maximum concentration of D₂O cells belonging to different taxonomic groups of microorganisms, realizing methylotrophic, chemoheterotrophic, photo-organotrophic and photosynthetic pathways of assimilation of carbon substrata, as facultative methylotrophic bacterium *B. methylicum*, chemoheterotrophic bacterium *B. subtilis*, halobacterium *H. halobium* and blue-green algae *C. vulgaris*.

Selection of methanol-assimilating facultative methylotrophic bacterium *B. methylicum* was connected with the development of new microbiological strategies for preparation of deuterated biomass via bioconversion of [D]methanol and D₂O and its further use as a source of deuterated growth substrates for the growing of other strains-producers in D₂O.

Choosing of photo-organotrophic halobacteria *H. halobium* was stipulated by the prospects of further isolation of retinal containing transmembrane protein bacteriorhodopsin (BR) – chromoprotein of 248 amino acid residues, containing as a chromophore an equimolar mixture of 13-*cis*- and 13-*trans* C20 carotenoid associated with a protein part of the molecule via a Lys-216 residue [20]. BR performs in the cells of halobacteria the role of ATP-dependent translocase, which creates an electrochemical gradient of H⁺ on the surface of the cell membrane, which energy is used by the cell for the synthesis of ATP in the anaerobic photosynthetic phosphorylation.

Using chemoheterotrophic bacterium *B. subtilis* was determined by preparative isolation produced by this bacterium deuterated ribonucleoside – inosine (total deuteration level 65,5 at.% D) for biomedical use [21], and the use of photosynthetic blue-green *C. vulgaris* was stipulated by the study of biosynthesis of deuterated chlorophyll and carotenoid pigments (deuteration level 95–97 at.% D) on growth media with high D₂O-content.

We used stepwise increasing gradient concentration of D₂O in growth media, because it was assumed that the gradual accustoming of microorganisms to deuterium would have a beneficial effect upon the growth and physiological parameters. The strategy of adaptation to D₂O is shown in Table. 1 on an example of methylotrophic bacterium *B. methylicum*, which deuterated biomass was used in further experiments as a source of deuterated growth substrates for growing of chemoheterotrophic and photo-organotrophic bacteria.

Table 1

The isotopic composition of growth media and growth characteristics of methylotrophic bacterium *B. methylicum* in the process of adaptation to D₂O*

Experiment number	Media components, %		Lag-period, (h)	Yield of biomass, gram from 1 liter of liquid culture	Cell generation time (h)
	H ₂ O	D ₂ O			
1	98,0	0	20,0±1,40	200,02±1.40	20,0±1,40
2	73,5	24,5	34,0±0,89	171,8±1.81	2,6±0,23
3	49,0	49,0	44,0±1,38	121,3±1.83	3,2±0,36
4	24,5	73,5	49,0±0,91	94,4±1.74	3,8±0,25
5	0	98,0	60,0±2,01	60,2±1.44	4,9±0,72
6	0	98,0	40,0±0,88	174,0±1.83	2,8±0,30

Notes: * The data in Expts. 1–5 is submitted for *B. methylicum* at growing on growth media, containing 2 % (v/v) deuterio-methanol and specified amounts (% , v/v) of D₂O.

The data in Expt. 6 is submitted for adapted to D₂O bacterium.

As the control used experiment 1 where used protonated water and methanol.

The adaptation strategy to D₂O consisted in plating of initial cells of microorganisms on Petri dishes with solid 2 % (w/v) agarose growth media with stepwise increasing D₂O-content therein (0; 24,5; 49,0; 73,5 and 98 % (v/v) D₂O), and the subsequent selection of resistant cells to D₂O. Cells grown on media with a low gradient of D₂O concentration were consequently transferred onto media with higher gradient, up to 98 % (v/v) D₂O. At the final stage of this procedure on the maximally deuterated growth medium with 98 % (v/v) D₂O were isolated individual cell colonies representing the progeny of a single cell resistant to the action of D₂O. Then the colonies were transferred onto the liquid growth medium of the same D₂O-content, prepared on the basis of 98 % (v/v) D₂O and grown for 5 days at 34 °C. The survival rate in the maximal deuterated growth

medium was not more than 40 %. The progress of adaptation was observed by the changes of lag-time period, time of cell generation and yield of microbial biomass, as well as by the ability of cells to form single colonies on the surface of solid 2 % (w/v) agarose media with $^2\text{H}_2\text{O}$ and cell counting.

All microorganisms adapted to D_2O retained the ability to grow on growth media with high content of D_2O . The general feature of bacterial growth in D_2O was the proportional increase in duration of the lag-period and time of cellular generation and simultaneous reduction of yields of microbial biomass. These parameter values were correlated with the content of D_2O in growth media with the lowest fixing values of these parameters on maximum deuterated media. The added gradually increasing concentrations of D_2O into growth media caused the proportional increasing lag-period and output of microbial biomass in all isotopic experiments (Table 1). In contrast to the adapted microorganisms, the growth of non-adapted microorganisms on the maximal deuterated media with D_2O was inhibited. The yields of biomass on deuterated growth media were varied 85–90 % for different taxonomic groups of microorganisms. Adapted microorganisms possessed slightly reduced levels of microbial biomass accumulation and increased cell generation times on maximal deuterated media.

The result obtained in experiments on the adaptation of methylotrophic bacterium *B. methylicum* to D_2O allowed to use hydrolysates of biomass of this bacterium obtained in the process of multi-stage adaptation to D_2O , as a source of deuterated growth substrates for the growing of chemoheterotrophic bacterium *B. subtilis* and photo-organotrophic halobacterium *H. halobium*. The assimilation rate of methylotrophic biomass by protozoa and eukaryotic cells amounts to 85–98 %, while the productivity calculated on the level of methanol bioconversion into cell components makes up 50–60 % [22]. While using deuterated biomass of methylotrophic bacteria *B. methylicum* as a source of deuterated growth substrates it was taken into account the ability of methylotrophic bacteria to synthesize large amounts of protein (output, 50 % (w/w) of dry weight), 15–17 % (w/w) of polysaccharides, 10–12 % (w/w) of lipids (mainly, phospholipids), and 18 % (w/w) of ash [23]. The most important fact is that ability is preserved on growth media containing D_2O and [D]methanol. To provide high outputs of these compounds and minimize the isotopic exchange (H–D) in amino acid residues of protein molecules, the biomass was hydrolyzed by autoclaving in 0,5 M DCl (in D_2O) and used for the growing of chemoheterotrophic bacterium *B. subtilis* and photo-organotrophic halobacterium *H. halobium*.

Taking into account the pathways of assimilation of carbon substrates, the adaptation of chemoheterotrophic bacterium *B. subtilis* and photo-organotrophic halobacterium *H. halobium* was carried out *via* plating of initial cells to separate colonies on solid 2 % (w/v) agarose media based on 99,9 at.% D_2O and deuterated hydrolyzate biomass of *B. methylicum*, with the following subsequent selection of the colonies resistant to D_2O . On contrary to D_2O deuterated substrates in composition of deuterated biomass hydrolyzate had no significant negative effect on the growth parameters of the studied microorganisms. Output of deuterated inosine at growth of *B. subtilis* on D_2O -medium was 3,9 g/l, while the level of glucose assimilation from the liquid culture was 40 g/l. The fractionation of inosine from liquid culture was performed by adsorption/desorption on the surface of activated carbon, extraction by 0,3 M NH_4 -formate buffer (pH = 8,9) with subsequent crystallization in 80 % (v/v) ethanol and column ion exchange chromatography on cation exchange resin AG50WX 4 equilibrated with 0,3 M NH_4 -formate buffer with 0,045 M NH_4Cl . Deuteration level of inosine molecule measured by FAB mass spectrometry was five deuterium atoms (62,5 atm.% D) with the inclusion of three deuterium atoms in the ribose and two deuterium atoms in the molecule fragments hypoxanthine.

For adaptation of blue-green algae *C. vulgaris* was used liquid mineral medium containing 25, 50, 75 and 98 % (v/v) D_2O . The levels of deuterium enrichment of carotenoids were In the case of *C. vulgaris* and *H. halobium* used fluorescent illumination, as both microorganisms grown in the presence of light. Individual colonies of cells of these microorganisms resistant to D_2O , allocated by selection were grown on liquid growth media of the same composition with 99,9 at.% D_2O for producing the deuterated biomass.

While growing of photo-organotrophic halobacterium *H. halobium* on D_2O -medium cells synthesized the purple carotenoid pigment, identified as a native BR on the the spectral ratio of protein and chromophore fragments in the molecule ($\text{D}_{280}/\text{D}_{568} = 1,5 : 1,0$). The growth of this bacterium on D_2O -medium was slightly inhibited as compared with the control on protonated

growth medium that simplifies the optimization of conditions for the production of microbial biomass, which consists in the growing of this halobacterium on deuterated growth medium with 2 % (w/v) of deuterated biomass hydrolyzate of *B. methylicum*, isolation of purple membrane fraction, the separation of low- and high-molecular impurities, cellular RNA, pigments (preferably carotenoids) and lipids, protein solubilization in 0,5 % (w/v) SDS-Na, fractionation of solubilized protein by methanol and purification on Sephadex G-200. The total level of deuterium enrichment of the BR molecule, calculated on deuterium enrichment levels of amino acids of the protein hydrolyzate was 95 at.% D.

Our studies indicated that the ability of adaptation to D₂O for different taxonomic groups of microorganisms is different, and stipulated by taxonomic affiliation, metabolic characteristics, pathways of assimilation of substrates, as well as by evolutionary niche occupied by the object. Thus, the lower the level of evolutionary organization of the organism, the easier it adapted to the presence of deuterium in growth media. Thus, most primitive in evolutionary terms (cell membrane structure, cell organization, resistance to environmental factors) of the studied objects are photo-organotrophic halobacteria related to archaebacteria, standing apart from both prokaryotic and eukaryotic microorganisms, exhibiting increased resistance to ²H₂O and practically needed no adaptation to D₂O, contrary to blue-green algae, which, being eukaryotes, are the more difficult adapted to D₂O and exhibit inhibition of growth on 70–75 % (v/v) D₂O.

The composition of growth media evidently plays an important role in process of adaptation to D₂O, because the reason of inhibition of cell growth and cell death can be changes of the parity ratio of synthesized metabolites in D₂O-media: amino acids, proteins and carbohydrates. It is noted that adaptation to D₂O occurs easier on complex growth media than on the minimal growth media with full substrates at a gradual increasing of deuterium content in the growth media, as the sensitivity to D₂O of different vital systems is different. As a rule, even highly deuterated growth media contain remaining protons from 0,2–10 at.%. These remaining protons facilitate the restructuring to the changed conditions during the adaptation to D₂O, presumably integrating into those sites, which are the most sensitive to the replacement of hydrogen by deuterium. Also deuterium induces physiological, morphological and cytological alterations on the cell. There were marked the significant differences in the morphology of the protonated and deuterated cells of blue-green algae *C. vulgaris*. Cells grown on D₂O-media were 2–3 times larger in size and had thicker cell walls, than the control cells grown on a conventional protonated growth media with ordinary water, the distribution of DNA in them was non-uniform. In some cases on the surface of cell membranes may be observed areas consisting of tightly packed pleats of a cytoplasmic membrane resembling mezosomes – intracytoplasmic bacterial membrane of vesicular structure and tubular form formed by the invasion of cytoplasmic membrane into the cytoplasm (Fig. 2). It is assumed that mezosomes involved in the formation of cell walls, replication and segregation of DNA, nucleotides and other processes. There is also evidence that the majority number of mezosomes being absent in normal cells is formed by a chemical action of some external factors – low and high temperatures, fluctuation of pH and other factors. Furthermore, deuterated cells of *C. vulgaris* were also characterized by a drastic change in cell form and direction of their division. The observed cell division cytodieresis did not end by the usual divergence of the daughter cells, but led to the formation of abnormal cells, as described by other authors [24]. The observed morphological changes associated with the inhibition of growth of deuterated cells were stipulated by the cell restructuring during the process of adaptation to D₂O. The fact that the deuterated cells are larger in size (apparent size was of 2–4 times larger than the size of the protonated cells), apparently is a general biological phenomenon proved by growing a number of other adapted to D₂O prokaryotic and eukaryotic cells.

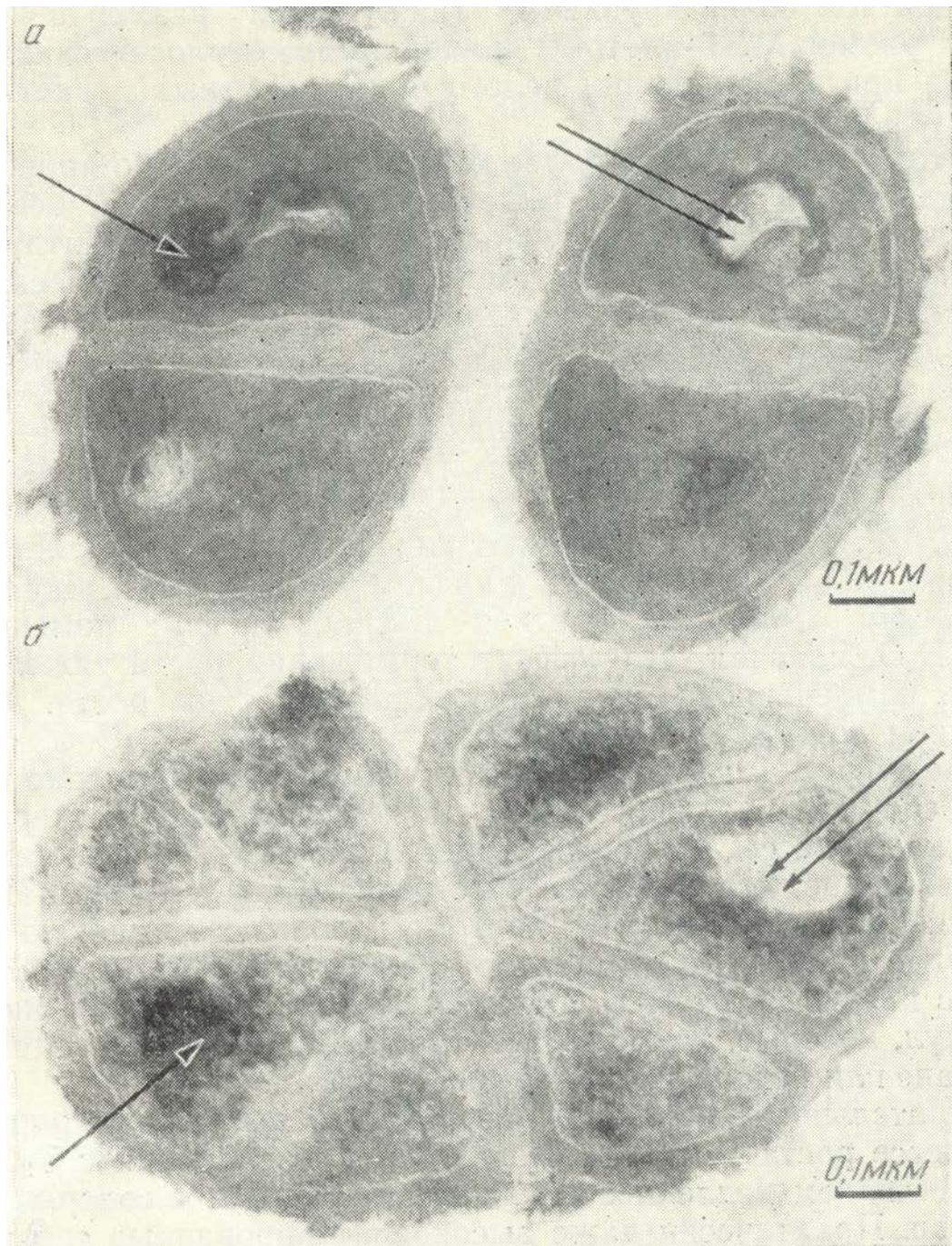


Figure 2. Electron micrographs of *Micrococcus lysodeikticus* cells: a) – protonated cells obtained on H_2O -medium; b) – deuterated cells obtained on D_2O -medium [24]. The arrows show the tightly-packed portions of the membranes

Our data generally confirm a stable notion that adaptation to D_2O is a phenotypic phenomenon as the adapted cells eventually return back to the normal growth after some lag-period after their replacement back onto H_2O -medium. At the same time the effect of reversibility of growth on H_2O/D_2O does not exclude an opportunity that a certain genotype determines the displaying of the same phenotypic attribute in D_2O -media with maximum deuterium content. At placing a cell onto D_2O -media lacking protons, not only H_2O is removed from a cell due to isotopic (H–D) exchange, but also there are occurred a rapid isotopic (H–D) exchange in hydroxyl (-OH), *sulfohydryl* (-SH) and amino (-NH₂) groups in all molecules of organic substances, including proteins, nucleic acids, carbohydrates and lipids. It is known, that in these conditions only covalent C–H bond is not exposed to isotopic (H–D) exchange and, thereof only molecules with bonds such as C–D can be synthesized de novo [25]. Depending on the position of the

deuterium atom in the molecule, there are distinguished primary and secondary isotopic effects mediated by intermolecular interactions. In this aspect, the most important for the structure of macromolecules are dynamic short-lived hydrogen (deuterium) bonds formed between the electron deficient H(D) atoms and adjacent electronegative O, C, N, S- heteroatoms in the molecules, acting as acceptors of H-bond. The hydrogen bond, based on weak electrostatic forces, donor-acceptor interactions with charge-transfer and intermolecular van der Waals forces, is of the vital importance in the chemistry of intermolecular interactions and maintaining the spatial structure of macromolecules in aqueous solutions. Another important property is defined by the three-dimensional structure of D₂O molecule having the tendency to pull together hydrophobic groups of macromolecules to minimize their disruptive effect on the hydrogen (deuterium)-bonded network in D₂O. This leads to stabilization of the structure of protein and nucleic acid macromolecules in the presence of D₂O. That is why, the structure of macromolecules of proteins and nucleic acids in the presence of D₂O is somehow stabilized [26].

Evidently the cell implements a special adaptive mechanisms promoting the functional reorganization of vital systems in D₂O. Thus, for the normal synthesis and function in D₂O of such vital compounds as nucleic acids and proteins contributes to the maintenance of their structure by forming hydrogen (deuterium) bonds in the molecules. The bonds formed by deuterium atoms are differed in strength and energy from similar bonds formed by hydrogen. Somewhat greater strength of D–O bond compared to H–O bond causes the differences in the kinetics of reactions in H₂O and D₂O. Thus, according to the theory of a chemical bond the breaking up of covalent H–C bonds can occur faster than C–D bonds, the mobility of D₃O⁺ ion is lower on 28,5 % than H₃O⁺ ion, and OD⁻ ion is lower on 39,8 % than OH⁻ ion, the constant of ionization of D₂O is less than that of H₂O [27]. These chemical-physical factors lead to a slow down in the rates of enzymatic reactions in D₂O [28]. However, there are also such reactions which rates in D₂O are higher than in H₂O. In general these reactions are catalyzed by D₃O⁺ or H₃O⁺ ions or OD⁻ and OH⁻ ions. The substitution of H with D affects the stability and geometry of hydrogen bonds in an apparently rather complex way and may, through the changes in the hydrogen bond zero-point vibration energies, alter the conformational dynamics of hydrogen (deuterium)-bonded structures of DNA and proteins in D₂O. It may cause disturbances in the DNA-synthesis, leading to permanent changes on DNA structure and consequently on cell genotype. Isotopic effects of deuterium, which would occur in macromolecules of even a small difference between hydrogen and deuterium, would certainly have the effect upon the structure. The sensitivity of enzyme function to the structure and the sensitivity of nucleic acid function (genetic and mitotic) would lead to a noticeable effect on the metabolic pathways and reproductive behaviour of an organism in the presence of D₂O. And next, the changes in dissociation constants of DNA and protein ionizable groups when transferring the macromolecule from H₂O to D₂O may perturb the charge state of the DNA and protein molecules. All this can cause variations in nucleic acid synthesis, which can lead to structural changes and functional differences in the cell and its organelles. Thus, the structural and dynamic properties of the cell membrane, which depends on qualitative and quantitative composition of membrane fatty acids, can also be modified in the presence of D₂O. The cellular membrane in the bacteria is one of the most important organelles for metabolic regulation, combining apparatus of biosynthesis of polysaccharides, transformation of energy, supplying cells with nutrients and involvement in the biosynthesis of proteins, nucleic acids and fatty acids. Obviously, the cell membrane plays an important role in the adaptation to D₂O. But it has been not clearly known what occurs with the membranes – how they react to the replacement of H to D and how it concerns the survival of cells in D₂O-media devoid of protons.

Comparative analysis of the fatty acid composition of deuterated cells of chemoheterotrophic bacteria *B. subtilis*, obtained on the maximum deuterated medium with 99,9 at.% D₂O, carried out by HPLC method, revealed significant quantitative differences in the fatty acid composition compared to the control obtained in ordinary water (Fig. 3 a, b). Characteristically, in a deuterated sample fatty acids having retention times at 33,38; 33,74; 33,26 and 36,03 min are not detected in HPLC-chromatogram (Fig. 3b). This result is apparently due to the fact that the cell membrane is one of the first cell organelles, sensitive to the effects of D₂O, and thus compensates the changes in rheological properties of a membrane (viscosity, fluidity, structuredness) not only by quantitative but also by qualitative composition of membrane fatty acids. Similar situation was observed with

the separation of other natural compounds (proteins, amino acids, carbohydrates) extracted from deuterio-biomass obtained from maximally deuterated D₂O-medium.

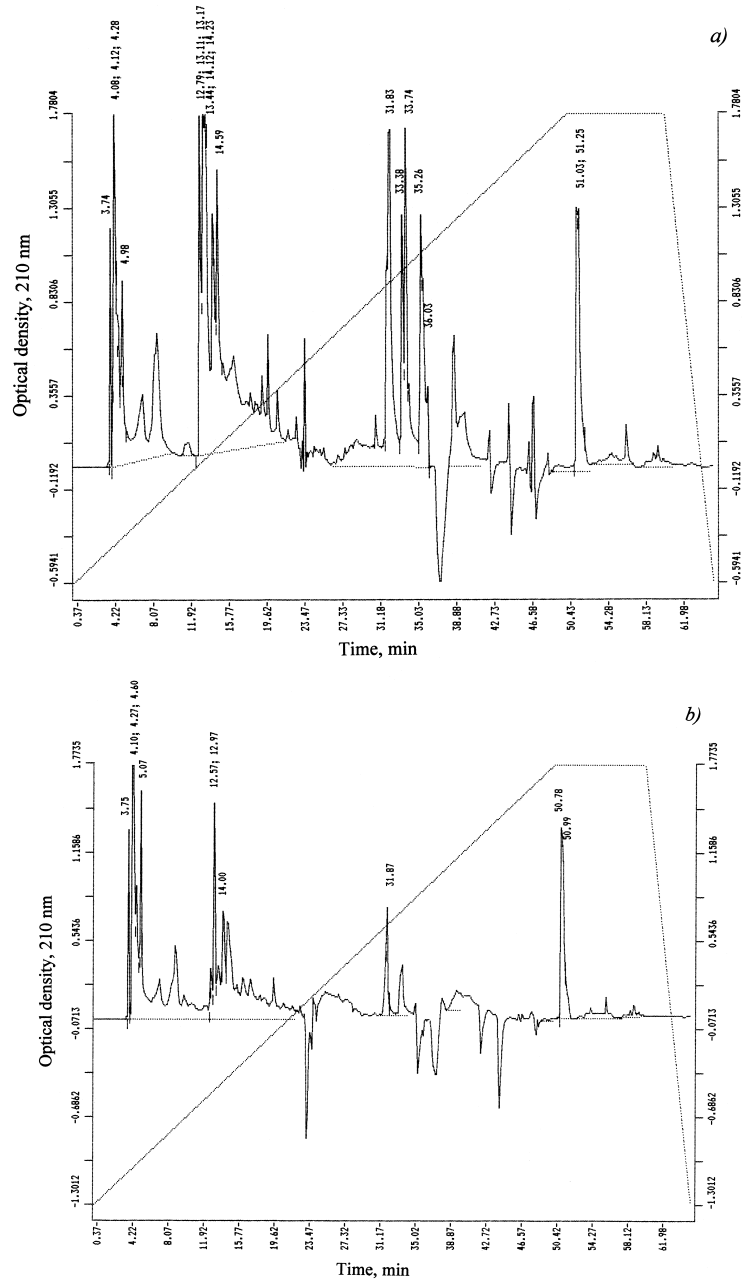


Figure 3. HPLC-chromatograms of fatty acids obtained from protonated (a) and deuterated (b) cells *B. subtilis* on the maximally deuterated D₂O-medium. The peaks on chromatograms with retention time 3,75 min (instead of 3,74 minutes in the control), 4,10; 4,27; 4,60 (instead of 4,08; 4,12; 4,28 in the control), 5,07 (instead of 4,98 in control) 12,57; 12,97 (instead of 12,79; 13,11; 13,17 in control) 14,00 (instead of 14,59 in the control), 31,87 (instead of 31,83 in the control); 33,38; 33,74; 33,26; 36,03; 50,78; 50,99 (instead of 51,03; 51,25 for control) correspond to individual intracellular fatty acids

Amino acid analysis of protein hydrolysates and intracellular carbohydrates isolated from deuterated cells of *B. subtilis*, also revealed the differences in quantitative composition of amino acids synthesized in D₂O-medium. Protein hydrolysates contains fifteen identified amino acids (except proline, which was detected at $\lambda = 440$ nm) (Table 2). An indicator that determines a high efficiency of deuterium inclusion into amino acid molecules of protein hydrolysates are high levels of deuterium enrichment of amino acid molecules, which are varied from 50 at.% for leucine/isoleucine to 97,5 at.% for alanine

Table 2

**Amino acid composition of the protein hydrolysates of *B. subtilis*,
obtained on the maximum deuterated medium and levels
of deuterium enrichment of molecules***

Amino acid	Yield, % (w/w) dry weight per 1 gram of biomass		Number of deuterium atoms incorporated into the carbon backbone of a molecule**	Level of deuterium enrichment of molecules, % of the total number of hydrogen atoms***
	Protonated sample (control)	The sample obtained in 99,9 % D ₂ O		
Glycine	8,03	9,69	2	90,0
Alanine	12,95	13,98	4	97,5
Valine	3,54	3,74	4	50,0
Leucine	8,62	7,33	5	50,0
Isoleucine	4,14	3,64	5	50,0
Phenylalanine	3,88	3,94	8	95,0
Tyrosine	1,56	1,83	7	92,8
Serine	4,18	4,90	3	86,6
Threonine	4,81	5,51	–	–
Methionine	4,94	2,25	–	–
Asparagine	7,88	9,59	2	66,6
Glutamic acid	11,68	10,38	4	70,0
Lysine	4,34	3,98	5	58,9
Arginine	4,63	5,28	–	–
Histidine	3,43	3,73	–	–

Notes:

* The data obtained by mass spectrometry for the methyl esters of N-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl) amino acid derivatives.

** While calculating the level of deuterium enrichment protons (deuterons) at the carboxyl (COOH-) and NH₂-groups of amino acid molecules are not taken into account because of their easy dissociation in H₂O/D₂O

*** A dash means absence of data.

Qualitative and quantitative composition of the intracellular carbohydrates of *B. subtilis* obtained on maximally deuterated D₂O-medium shown in Table. 3 (the numbering is given to the sequence of their elution from the column) contained monosaccharides (glucose, fructose, rhamnose, arabinose), disaccharides (maltose, sucrose), and four other unidentified carbohydrates with retention time 3,08 min (15,63 %); 4,26 min (7,46 %); 7,23 min (11,72 %) and 9,14 min (7,95 %) (not shown). Yield of glucose in deuterated sample makes up 21,4 % by dry weight, i.e. higher than for fructose (6,82 %), rhamnose (3,47 %), arabinose (3,69 %), and maltose (11,62 %). Their outputs are not significantly different from control in H₂O except for sucrose in deuterated sample that was not detected (Table 3). The deuterium enrichment levels of carbohydrates were varied from 90,7 at.% for arabinose to 80,6 at.% for glucose.

Table 3

Qualitative and quantitative composition of intracellular carbohydrates of *B. subtilis* obtained on the maximally deuterated medium and levels of deuterium enrichment of molecules*

Carbohydrate	Content in the biomass, % of the dry weight of 1 g biomass		Level of deuterium enrichment, % of the total number of hydrogen atoms***
	Protonated sample (control)	The sample obtained in 99,9 % D ₂ O**	
Glucose	20,01	21,40	80,6
Fructose	6,12	6,82	85,5
Rhamnose	2,91	3,47	90,3
Arabinose	3,26	3,69	90,7
Maltose	15,30	11,62	–
Sucrose	8,62	ND	–

Notes:

* The data were obtained by IR-spectroscopy.

** ND – not detected

** A dash means the absence of data.

Conclusions.

Our experiments demonstrated that the effects observed at the cellular growth on D₂O possess a complex multifactor character connected to changes of physiological parameters – magnitude of the lag-period, time of cellular generation, outputs of biomass, a ratio of amino acids, protein, carbohydrates and fatty acids synthesized in D₂O, and with an evolutionary level of organization of investigated object as well. The cell evidently implements the special adaptive mechanisms promoting functional reorganization of work of the vital systems in the presence of D₂O. Thus, the most sensitive to replacement of H on D are the apparatus of biosynthesis of macromolecules and a respiratory chain, i.e., those cellular systems using high mobility of protons and high speed of breaking up of hydrogen bonds. Last fact allows the consideration of adaptation to D₂O as adaptation to the nonspecific factor affecting simultaneously the functional condition of several numbers of cellular systems: metabolism, ways of assimilation of carbon substrates, biosynthetic processes, and transport function, structure and functions of macromolecules. It seems to be reasonable to choose as biomodels in these studies microorganisms, as they are very well adapted to the environmental conditions and able to withstand high concentrations of D₂O in the growth media.

References:

1. Ignatov I. Modeling of possible processes for origin of life and living matter in hot mineral and seawater with deuterium / I. Ignatov, O.V. Mosin // Journal of Environment and Earth Science. 2013. Vol. 3, № 14. P. 103–118.
2. Ignatov I. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Basillus subtilis* as model system in heavy water / I. Ignatov, O.V. Mosin // Journal of Natural Sciences Research. 2013. Vol. 3, № 9. P. 65–76.
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. Lis G. High-Precision Laser Spectroscopy D/H and ¹⁸O/¹⁶O Measurements of Microliter Natural Water Samples / G. Lis, L.I. Wassenaar, M.J. Hendry // Anal. Chem. 2008. Vol. 80, № 1. P. 287–293.
5. Lobishev V.N. Isotopic effects of D₂O in biological systems / Ed. V.N. Lobishev, L.P. Kalinichenko. M.: Nauka. 1978. 215 p.
6. Vertes A. Physiological effects of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution / Ed. A. Vertes. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 2004. 112 p.
7. Mosin O.V. Studying of methods of biotechnological preparation of proteins, amino acids and nucleosides, labeled with stable isotopes ²H, ¹³C and ¹⁵N with high levels of isotopic

enrichment: autoref. disser. thesis Ph D: Moscow, M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology. 1996. 26 p.

8. Den'ko E.I. Influence of heavy water (D₂O) on animal, plant and microorganism's cells / E.I. Den'ko // *Usp. Sovrem. Biol.* 1970. Vol. 70, № 4. P. 41–49.

9 Stom D.I. Influence of water with varying content of deuterium on red Californian hybride (*Eusenia fetida Andrei Bouche*) / D.I. Stom, A.K. Ponomareva, O.F. Vyatchina // *Bull. RAS.* 2006. Vol. 6, № 52. P. 167–169.

10. Mosin O.V. Isotope effects of deuterium in bacterial and microalgae cells at growth on heavy water (D₂O) / O.V. Mosin, I. Ignatov // *Voda: Ximia i Ecologija.* 2012. № 3. P. 83–94.

11. Mosin O.V. A strain of Gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis* – producer of [²H]riboxine / O.V. Mosin, I. Ignatov, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Drug development & registration.* 2013. № 4(5). P. 110-119.

12. Mosin O.V. A strain of Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* – producer of [²H]phenylalanine / O.V. Mosin, I. Ignatov, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Drug development & registration.* 2014. № 1(6). P. 58-67.

13. Mosin O.V. 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 / 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.

14. Crespi H.L. Fully deuterated microorganisms: tools in magnetic resonance and neutron scattering. *Synthesis and applications of isotopically labeled compounds.* in: *Proceedings of an International Symposium* / Eds. T. Baillie, J.R. Jones. Amsterdam: Elsevier. 1989. P. 329–332.

15. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / LeMaster D.M // *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1990. Vol. 19. P. 243–266.

16. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment / P. MacCarthy // *J. Chem. Educ.* 1985. Vol. 62. № 7. P. 633–638.

17. Mosin O.V. Mass-spectrometric determination of levels of enrichment of ²H and ¹³C in molecules of amino acids of various bacterial objects / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, V.I. Shvets // *Bioorganic Chemistry.* 1996. Vol. 22, № 10–11. P 856–869.

18. Mosin O.V. Incorporation of [2,3,4,5,6-²H]phenylalanine, [3,5-²H]tyrosine, and [2,4,5,6,7-²H]tryptophan into bacteriorhodopsin molecule of *bacterium halobium* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 1999. Vol. 35, № 1. C. 34–42.

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. Vol. 4, № 1. P. 11–22.

20. Mosin O.V. Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin / O.V. Mosin, E.N. Karnaukhova, A.B. Pshenichnikova, O.S. Reshetova. in: *6th Intern. Conf. on Retinal proteins.* Leiden: Springer Verlag. 1994. 115 p.

21. Mosin O.V. Studying the biosynthesis of ²H-labeled inosine by a Gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis* B-3157 on heavy water (²H₂O) medium / O.V. Mosin, I. Ignatov // *Chemical and Process Engineering Research,* 2013. Vol. 15. P. 32–45.

22. Mosin O.V. Biosynthesis of ²H-labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 1998. Vol. 62, № 2. P. 225–229.

23. Mosin O.V. 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* / O.V. Mosin, I. Ignatov // *International Journal of Biomedicine.* 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.

24. Eryomin V.A. Growth of *Micrococcus lysodeikticus* on a deuterated medium / V.A. Eryomin, L.N. Chekulayeva, E.F. Kharatyan // *Microbiologia.* 1978. Vol. 14. P. 629–636.

25. Mosin O.V. Methods for preparation of proteins and amino acids, labbeled with stable isotopes ²H, ¹³C and ¹⁵N / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Biotechnologia.* 1996. № 3. P. 12–32.

26. P. Cioni, G.B. Strambini. Effect of heavy water on protein flexibility // *Biophysical J.* 2002. V. 82(6). P. 3246–3253.

27. Mosin O.V. Studying of physiological adaptation of microorganisms to heavy water / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Biotechnologia. 1999. № 8. P. 16–23.

28. Cleland W.N. Isotope effects on enzyme-catalyzed reactions / Ed. W.N. Cleland, M.N. O'Leary, D.D. Northrop. Baltimore, London, Tokyo: University Park Press. 1976. 303 p.

УДК 579.871.08+577.385.4.08

Биологическое влияние дейтерия на клетки прокариот и эукариот

¹Олег Викторович Мосин

²Игнат Игнатов

¹Московский 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

²Научно-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

Аннотация. Изучено биологическое воздействие дейтерия (D) на клетки различных таксономических групп прокариотических и эукариотических микроорганизмов, реализующих метилотрофные, хемогетеротрофные, фото-органогетеротрофные и фотосинтетические способы ассимиляции углеродных субстратов при росте на средах с тяжёлой водой (D₂O). Разработан метод ступенчатой адаптации клеток к D₂O, заключающийся в их рассеве на чашках Петри с твердыми (2 %-ный агар) питательными средами при ступенчатом увеличении градиента концентрации D₂O (от 0 до 98 % D₂O) и последующей селекции устойчивых к D₂O клеток. В результате этой техники на максимально дейтерированной среде с 98 % D₂O получены адаптированные к D₂O клетки, биологический материал которых вместо атомов водорода содержит атомы дейтерия с уровнем дейтерированности молекул 92–97,5 ат.% D.

Ключевые слова: дейтерий; тяжелая вода; изотопные эффекты; адаптация; бактерии; сине-зеленые водоросли.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Journal of Molecular Biotechnology
Has been issued since 2013.
ISSN: 2310-6255
Vol. 3, No. 1, pp. 25-40, 2014

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

www.ejournal8.com



UDC 579.871.08+577.385.4.08

Using of Facultative Methylophilic Bacterium *Brevibacterium Methylicum B-5652* With RMP-cycle of Carbon Assimilation for Microbiological Synthesis of [²H]phenylalanine With Different Levels of Deuterium Enrichment

¹ Oleg Mosin

² Ignat Ignatov

³ Dmitry Skladnev

⁴ Vitaly Shvets

¹ Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)
103316, Moscow, Talalikhina ulitza, 33
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

² 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

³ 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

⁴ 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. With using of a strain of of *L*-phenylalanine secreted Gram-positive aerobic facultative methylophilic bacteria *Brevibacterium methylicum B-5652*, assimilating methanol via ribulose-5-monophosphate (RMP) cycle of carbon assimilation it was carried out the preparative microbiological synthesis of phenylalanine and metabolically related amino acids (alanine, valine, leucine/isoleucine in the amount of 5–6 mmol/l), labelled with deuterium (²H). The data on adaptation of *L*-phenylalanine secreted methylophilic bacterium *B. methylicum* to the maximal concentration of deuterium in minimal growth medium M9 with 98 % ²H₂O and 2 % [²H]methanol, and data on biosynthesis of deuterium labelled *L*-phenylalanine with different levels of enrichment are submitted. The developed method for biosynthesis allows to obtain [²H]phenylalanine with different levels of isotopic enrichment, depending on ²H₂O concentration in growth media M9, from 17 % (2 deuterium atoms) (on growth medium with 24,5 % ²H₂O) right up to 75 % (6 deuterium atoms) (on growth medium with 98 % ²H₂O) with introduction of deuterium to benzyl C₆H₅CH₂-fragment of molecule that is confirmed with the data of the electron impact (EI) mass-spectrometry analysis of methyl ethers of N-dimethylamino(naphthalene)-5-

sulfochloride (dansyl) derivatives of [^2H]phenylalanine, isolated from the liquid culture after its separation by RP HPLC.

Keywords: *Brevibacterium methylicum*; L-phenylalanine; biosynthesis; heavy water; electron impact mass spectrometry; RP HPLC.

Введение.

Синтез аминокислот, меченных стабильными изотопами водорода (^2H), углерода (^{13}C), азота (^{15}N) и кислорода (^{18}O) является ключевым звеном в различных биомедицинских и клинических исследованиях с их использованием [1, 2]. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения – спектроскопией ^1H -ЯМР [3], ИК [4] и масс-спектрометрией (МС) [5]. Развитие этих методов детектирования стабильных изотопов за последние годы позволило значительно усовершенствовать проведение многочисленных биологических исследований с участием аминокислот de novo, а также изучать пути их метаболизма [6].

Аминокислоты, меченные стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , широко применяются как в медицинской диагностике, так и в биохимических исследованиях разнообразного характера, включая метаболизм [7], а также в химических синтезах целого ряда изотопно-меченных соединений на их основе, например, [^2H , ^{13}C]фенилаланин в синтезах пептидных гормонов и нейротрансмиттеров [8]. Изотопно-меченные аналоги L-фенилаланина находят всё большее применение в диагностических целях, например, для выявления наследственной фенилкетонурии и других заболеваний, связанных с нарушением метаболизма фенилаланина в организме, когда необходимо выяснить распределение дейтериевой метки в конечных продуктах метаболизма [9]. Поэтому важно разрабатывать новые биотехнологические подходы получения природных изотопно-меченных аналогов фенилаланина, в том числе дейтерированных. Преимущества биотехнологических методов синтеза изотопно-меченных аминокислот по сравнению с химическим синтезом заключаются в высоких выходах синтезируемых соединений и то, что они обладают природной L-конфигурацией.

Перспективными источниками для биосинтеза [^2H]аминокислот признаны метилотрофные бактерии, способные окислять метанол и другие одноуглеродные соединения, содержащие метильную CH_3 -группу до формальдегида по рибулозо-5-монофосфатному и сериновому путям ассимиляции углеродных субстратов [10]. Интерес к использованию метилотрофных бактерий в биотехнологии возрастает благодаря разработке новых перспективных технологий химического синтеза метанола. Благодаря 50 %-ному уровню биоконверсии метанола (при эффективности конверсии 15,5–17,3 г. сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) метилотрофные бактерии рассматриваются как дешевые источники дейтерированного белка и незаменимых аминокислот, а технологические затраты на их получение определяются, в основном, стоимостью $^2\text{H}_2\text{O}$ и [^2H]метанола. Традиционным подходом при этом является выращивание микробных штаммов-продуцентов аминокислот на средах, содержащих [^2H]метанол и $^2\text{H}_2\text{O}$ с последующим фракционированием КЖ с целью выделения [^2H]аминокислот [11]. Ранее нами сообщалось о получении штамма аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* для микробного синтеза L-фенилаланина [12]. В отличие от традиционных штаммов-продуцентов L-фенилаланина, у которых нарушены активности префенат-дегидратазы или 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат синтетазы, уникальность выделенного нами штамма состоит в том, что для биосинтеза L-фенилаланина необходим L-лейцин.

Целью данной работы было изучение биосинтеза дейтерированного L-фенилаланина с высокими уровнями изотопного обогащения за счет выращивания штамма грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* B-5652, продуцента L-фенилаланина на средах с различными концентрациями тяжелой воды (от 24,5 % до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$).

Материалы и методы.

Объектом исследования являлся *L*-лейцин-зависимый (потребность в лейцине 0,01 г/л) штамм аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* B-5652 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), продуцент *L*-фенилаланина (1 г/л), способный ассимилировать в качестве источника углерода метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) циклу фиксации углерода. Исходный штамм был получен из коллекции культур ВКПМ Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,9 ат.% ^2H), ^2HCl (95,5 ат.% ^2H) и ^2H метанол (97,5 ат.% ^2H), полученные из Российского научно-исследовательского центра “Изотоп” (Санкт-Петербург, РФ). Неорганические соли предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H ЯМР-спектроскопией на приборе Brucker WM-250 (“Brucker Daltonics”, ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si). Для синтеза *N*-производных аминокислот использовали 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлорид (дансилхлорид) (“Sigma”, США), карбобензоксихлорид (химзавод им. П.Л. Войкова, РФ) и диазометан (CH_2N_2). Для синтеза CH_2N_2 использовали *N*-нитрозометилмочевину (“Merck”, Германия).

Адаптацию штамма к дейтерию проводили рассевом до отдельных колоний и последующей селекцией на твердых (2 % агар) минимальных средах М9 с добавками 2 % метанола или ^2H метанола, содержащих ступенчато-увеличивающиеся концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 об.%* $^2\text{H}_2\text{O}$) (количества компонентов приведены в г/л): KH_2PO_4 – 3; Na_2HPO_4 – 6; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1; *L*-лейцин – 0,01. Селекцию отдельных колоний проводили по признаку устойчивости к $^2\text{H}_2\text{O}$. За ходом адаптации наблюдали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с $^2\text{H}_2\text{O}$, а также по величине ОП суспензии клеток в жидких средах М9 аналогичного состава, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при $\lambda = 620$ нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Адаптированный к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамм *B. methylicum* выращивали в жидкой максимально дейтерированной среде М9 с 2 % ^2H метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ при 35 °С в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере Biorad (100 об/мин) (“Biorad Labs”, Польша). После 3–4 суток выращивания дейтерированные клетки отделяли на центрифуге Т-24 (“Heraeus Sepatech”, ФРГ) (10000 об/мин, 15 мин), КЖ лиофилизировали в вакууме при 10 мм рт. ст. и использовали для выделения ^2H фенилаланина и сопутствующих ^2H аминокислот.

Для выделения ^2H фенилаланина из КЖ дейтеро-биомассу *B. methylicum*, полученную после выращивания в максимально дейтерированной среде М9 с 2 % ^2H метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$, отделяли от КЖ на центрифуге Т-24 (“Heraeus Sepatech”, ФРГ) при 10000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант лиофилизировали в вакууме при 10 мм рт. ст. К 5 г полученного сухого остатка супернатанта добавляли 30 мг изопропанола, реакционную смесь подкисляли до pH = 2,0 с помощью 5 н. раствора ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$) и выдерживали при 20 °С в течение 4 часов. После отделения неорганических солей центрифугированием (10000 об/мин, 10 мин), супернатант упаривали в роторном вакуумном испарителе РВО-10 (Венгрия) при 10 мм рт. ст. Полученный ^2H фенилаланин (выход 0,65 г/л) перекристаллизовывали из этанола. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 35^{\circ}$ (в этаноле). УФ-спектр (0,1 н. HCl): $\lambda_{\text{max}} = 257,5$ нм, $1,97 \cdot 10^2$ М⁻¹·см⁻¹; масс-спектр ЭУ метилового эфира *N*-Dns- ^2H фенилаланина (70 эВ, 180–200 °С): $[(\text{M}^+) m/z (I, \%)]$: 418 (35 %), 250 (95 %), 234 (21 %), 170 (100 %), 97 (62 %).

Для синтеза *N*-Dns- ^2H аминокислот к 200 мг лиофилизованной КЖ в 5 мл 2 М NaHCO_3 ($2 \cdot 10^{-3}$ моль), pH = 9–10 дробными порциями при перемешивании добавляли 320 мг ($1,2 \cdot 10^{-3}$ моль) дансилхлорида в 5 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при 40 °С в течение часа, затем подкисляли 2 М HCl до pH = 3,0 и

* Здесь и далее использованы % по объему.

экстрагировали этилацетатом (3 раза по 5 мл). Объединенный экстракт промывали водой до pH = 7,0, сушили безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли при 10 мм рт. ст.

Для синтеза метиловых эфиров N-Dns-[²H]аминокислот к 20 мл 40 % KOH в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г нитрозометилмочевины и перемешивали на водяной бане со льдом в течение 15–20 мин. После интенсивного газовойделения эфирный слой отделяли и промывали ледяной водой до pH = 7,0, сушили безводным Na₂SO₄ и обрабатывали им N-Dns-[²H]производные аминокислот в составе КЖ штамма продуцента.

Аналитическое и препаративное разделение метиловых эфиров N-Dns-[²H]аминокислот проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Knauer (“Knauer”, ФРГ), снабженным УФ-детектором и интегратором C-R 3A (“Shimadzu”, Япония). В качестве неподвижной фазы использовали Separon SGX, 18,7 мкм, 150×3,3 мм (“Kova”, Словакия). Элюирование проводили в системе растворителей: (А) – ацетонитрил – трифторуксусная кислота (20 : 80, %) и (Б) – ацетонитрил (100 %). Использовали градиентное элюирование: от 20 % А до 100 % Б в течение 30 мин; при 100 % Б 5 мин; от 100 % Б до 20 % А 2 мин; при 20 % Б 10 мин.

Аналитическое определение L-фенилаланина проводили в пробах КЖ, объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150×150 мм) с закрепленным слоем флуоресцентного носителя Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) в системах растворителей: *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5, %) и изопропанол – аммиак (7 : 3, %). Элюцию пятен проводили 0,1 н. HCl после обработки 0,5 %-м раствором нингидрина в *n*-бутаноле. Поглощение элюатов определяли при λ = 540 нм на приборе Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

Масс-спектры электронного удара (ЭУ) метиловых эфиров N-Dns-[²H]аминокислот получены на приборе “MB-80A” (“Hitachi”, Япония) с двойным фокусированием, снабженным комбинированным вакуумным электронным катодным термоисточником (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, температура катодного источника 180–200 °С). Расчет уровней дейтерированности молекул фенилаланина и сопутствующих аминокислот, выделенных с ²H₂O-содержащих сред, проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов M⁺ производных [²H]аминокислот и контрольных аминокислот, полученных в обычной воде.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы статистического пакета STATISTICA 6, используя критерий t-Стьюдента (при p < 0,05).

Результаты и обсуждение.

Как известно, большинство распространенных в природе микроорганизмов не могут служить хорошими продуцентами ароматических аминокислот, вследствие наличия эффективных механизмов регуляции биосинтеза этих соединений в клетке, хотя эта способность проявляется у ряда их мутантных форм [13]. Эффективными микробными продуцентами L-фенилаланина являются, как правило, мутанты, у которых отсутствует негативный контроль со стороны таких ключевых ферментов биосинтеза этой аминокислоты, как префенат-дегидратаза (EC 4.2.1.51) хоризматмутаза (EC 5.4.99.5) и 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат синтетаза (**EC 2.5.1.54**) [14–16].

Определенный интерес в связи с этим представляет исследование способности продуцировать L-фенилаланин лейцинзависимым грамположительным факультативным метилотрофным мутантом *B. methylicum*, ассимилирующим метанол по NAD⁺ зависимому метанол дегидрогеназному (EC 1.6.99.3) варианту рибулозо-5-монофосфатного (РМФ) цикла фиксации углерода – достаточно удобным, хотя и малоизученным объектом для биотехнологического использования. Поэтому начальный этап биохимических исследований со штаммом метилотрофных бактерий *B. methylicum* был связан с получением ауксотрофных мутантов, для которых в большинстве случаев характерны ограниченный спектр мутантных фенотипов и, кроме того, довольно высокий уровень реверсий [17]. Исходный L-лейцинзависимый штамм *B. methylicum* B-5652, продуцент L-фенилаланина был отобран селекцией в лаборатории генетики метилотрофов “ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов” на предыдущем этапе исследований после обработки родительского штамма нитрозогуанидином. Отбор колоний проводили по

признаку устойчивости к аналогу фенилаланина – *мета*-фторфенилаланину (50 мкг/мл). Выделенные на селективных средах аналого-резистентные мутанты конвертировали метанол и накапливали до 1 г/л *L*-фенилаланина в КЖ. Сравнительные анализы (ТСХ, МС, ЯМР) показали, что *L*-фенилаланин, продуцируемый данным штаммом метилотрофных бактерий полностью идентичен природному *L*-фенилаланину.

С целью увеличения эффективности изотопного мечения *L*-фенилаланина и интенсификации бактериального роста на полностью дейтерированной среде полученный мутант *B. methylicum* был адаптирован к росту и биосинтезу в полностью дейтерированных средах М9 с $^2\text{H}_2\text{O}$ и [^2H]метанолом. Для адаптации клеток к $^2\text{H}_2\text{O}$ использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$, поскольку предполагалось, что постепенное привыкание бактерии к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на ростовые и физиологические параметры.

Адаптация заключалась в рассеве исходного штамма до отдельных колоний на чашках Петри с твердыми агаризованными средами М9 с 2 % агаром при ступенчатом увеличении концентрации тяжелой воды в них (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$) и последующей селекции устойчивых к $^2\text{H}_2\text{O}$ колоний клеток, как показано в таблице 1. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ колонии переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. На конечном этапе на среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию $^2\text{H}_2\text{O}$ (степень выживаемости клеток на конечной полностью дейтерированной среде М9 составила 40 %). Затем их переносили в жидкую минимальную среду М9, приготовленную на основе 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанола, и выращивали в течение 3–4 сут при 35 °С.

Таблица 1

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

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лаг-период, ч	Выход микробной биомассы, г/л	Время генерации, ч
	H_2O	$^2\text{H}_2\text{O}$	метанол	[^2H]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 средах М9, содержащих 2 % метанол/[^2H]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 % [^2H]метанол и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

Как показали эксперименты, замена протонированного метанола [^2H]метанолом при одинаковых концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах приводила к небольшим уменьшениям ростовых характеристик штамма (табл. 1, опыты 2, 4, 6, 8 и 10). Поэтому в дальнейших опытах использовали среды с $^2\text{H}_2\text{O}$ и [^2H]метанолом. На контрольной протонированной среде М9 с водой и метанолом продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации *B. methylicum* составили 20 ч и 2,2 ч, а выход микробной биомассы 200,2 г с 1 л КЖ (табл. 1, опыт 1). В промежуточных опытах (2–10) ростовые параметры изменялись

пропорционально концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в средах. Выявленная закономерность заключалась в увеличении продолжительности лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы с фиксированием самых низких значений этих параметров в максимально дейтерированной среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом (табл. 1, опыт 10). С увеличением концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах до 98 % продолжительность лаг-периода увеличивалась до 60 ч (табл. 1, опыт 10). Отмечено, что длительность времени клеточной генерации с увеличением концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах постепенно увеличивается, достигая 4,9 ч на среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом (табл. 1, опыт 10). В отличие от $^2\text{H}_2\text{O}$, [^2H]метанол не вызывал существенного ингибирования роста и не оказывал влияния на выход микробной биомассы. Напротив, на максимально дейтерированной среде выход микробной биомассы был снижен в 3,3 раза по сравнению с контролем. Важно то, что выход микробной биомассы и уровень накопления *L*-фенилаланина в КЖ при росте адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ микроорганизма в максимально дейтерированной среде изменяются по сравнению с контрольными условиями на 13 % и 5 %, т. е. незначительно (табл. 1, опыт 10').

За ходом процесса клеточной адаптации, условия которой показаны в опыте 10' (табл. 1), наблюдали, исследуя выходы микробной биомассы, продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации (рис. 1). Как видно на рис. 1 выход микробной биомассы у адаптированного штамма *B. methylicum* (в) уменьшался на 13 % по сравнению с контрольными условиями (а) при увеличении времени генерации до 2,8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч. Адаптированный штамм *B. methylicum* возвращался к нормальному росту при переносе в протонированную среду после некоторого лаг-периода, что доказывает фенотипическую природу феномена адаптации, что наблюдалось для других адаптированных нами штаммов метилотрофных бактерий – представителей различных таксономических групп [18]. Эффект реверсии роста в протонированной/дейтерированной средах доказывает, что адаптация к $^2\text{H}_2\text{O}$ является фенотипическим феноменом, хотя не исключается, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же **фенотипического признака** в средах различного изотопного состава. В целом, улучшенные ростовые характеристики адаптированного метилотрофа существенно упрощают схему получения дейтеро-биомассы, оптимальным условиям которой удовлетворяет максимально дейтерированная среда М9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом с инкубационным периодом 3–4 сут при 35 °С.

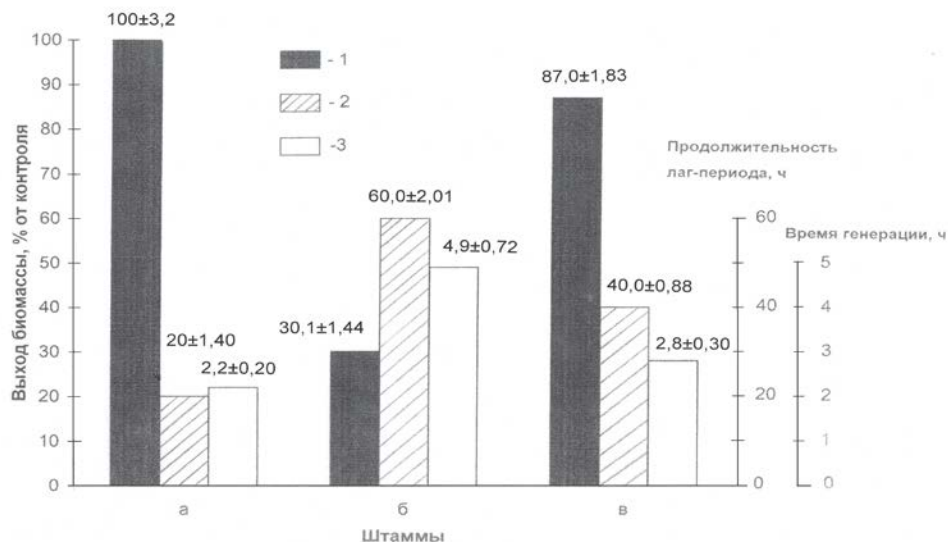


Рис. 1. Выход микробной биомассы *B. methylicum*, величина лаг-периода и время генерации в различных экспериментальных условиях: исходный штамм в протонированной среде М9 с водой и метанолом (а); исходный штамм в максимально дейтерированной среде М9 (б); адаптированный к дейтерию штамм в максимально дейтерированной среде М9 (в):

1 – выход биомассы, % от контроля;

2 – продолжительность лаг-периода, ч; 3 – время генерации, ч.

Динамики роста (1а, 1б, 1в) и накопления *L*-фенилаланина в КЖ (2а, 2б, 2в) исходным (б) и адаптированным к дейтерию (в) штаммом *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9 показаны на рис. 2 относительно контроля (а), полученного в протонированной среде М9. Важной особенностью адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* является то, что он сохранил способность синтезировать и экзогенно продуцировать *L*-фенилаланин в ростовую среду в количестве 0,8 г/л (рис. 2в). В отличие от адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма (в), выход *L*-фенилаланина исходным штаммом *B. methylicum* (б) в максимально дейтерированной среде составил 0,3 г/л, что в 2,6 раза ниже, чем при использовании адаптированного штамма (в) в максимально дейтерированной среде при незначительном уменьшении ростовых характеристик (рис. 2). На рис. 2 видно, что в отличие от адаптированного штамма (в), рост исходного штамма *B. methylicum* (б) в максимальной дейтерированной среде ингибировался дейтерием.

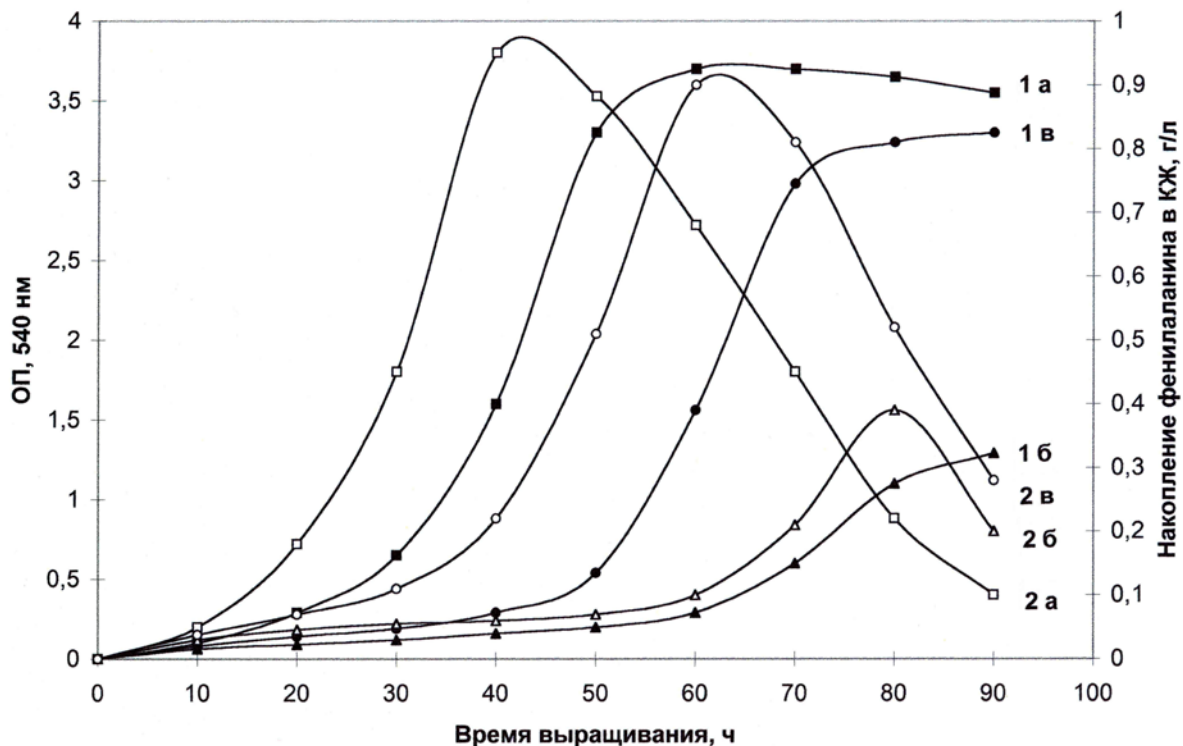


Рис. 2. Динамики роста *B. methylicum* (1а, 1б, 1в) и накопления *L*-фенилаланина в КЖ (2а, 2б, 2в) на средах М9 с различным изотопным составом: а – исходный штамм на протонированной среде М9; в – адаптированный *B. methylicum* на полностью дейтерированной среде М9; б – неадаптированный штамм на полностью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

Общей особенностью биосинтеза *L*-фенилаланина в $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ -средах было увеличение его продукции на ранней фазе экспоненциального роста *B. methylicum*, когда выход микробной биомассы был незначителен (рис. 2а–в). Во всех опытах наблюдалось ингибирование биосинтеза *L*-фенилаланина на поздней фазе экспоненциального роста и снижение его концентрации в ростовых средах. Согласно данным по микроскопическому исследованию растущей популяции микроорганизмов, характер динамики накопления *L*-фенилаланина в КЖ не коррелировал с качественными изменениями ростовых характеристик на различных стадиях роста, что являлось подтверждением морфологической однородности микробной популяции. Скорее всего, накопленный в процессе роста *L*-фенилаланин ингибировал ферменты собственного пути биосинтеза. Кроме того, при выращивании штамма продуцента без рН-статирования может происходить обратное превращение секретируемого *L*-фенилаланина в интермедиаторные соединения его биосинтеза, что отмечено в других работах [19]. Обсуждая механизм биосинтеза

фенилаланина, следует отметить, что он синтезируется в клетках микроорганизмов из общих предшественников ароматических аминокислот – фосфоенолпирувата (ПЕР) и эритрозо-4-фосфата (Е4Р) через стадии образования префеновой кислоты, которая через стадию образования фенилпирувата превращается в фенилаланин под действием клеточных трансаминаз [20].

[²H]фенилаланин в чистом виде был выделен экстракцией лиофилизованной при 10 мм рт. ст. КЖ изопропанолом с последующей перекристаллизацией в этаноле ([²H]фенилаланин был также выделен из КЖ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со степенью хроматографической чистоты 97 % и выходом 85 %). Данные по исследованию КЖ методом ТСХ показали, что кроме фенилаланина штамм *B. methylicum* синтезирует и накапливает в КЖ (на уровне 5–6 ммоль/л) метаболически связанные аминокислоты (аланин, валин, лейцин/изолейцин), присутствие которых подтверждалось масс-спектрометрическим анализом ЭУ метиловых эфиров N-дансилхлоридных (Dns) производных аминокислот, выделенных из КЖ штамма-производителя обращенно-фазовой ВЭЖХ.

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

N-Dns производные аминокислот получали прямой обработкой образцов лиофилизованной КЖ дансилхлоридом (DnsCl). Реакцию замещения аминокислот по аминогруппе DnsCl проводили в щелочной среде в присутствии 2 М NaHCO₃ (pH = 9–10) в водно-органическом растворителе (ацетон) в соотношении дансилхлорид-аминокислота, равным 2 : 1, мас.%. Летучесть N-Dns-производных аминокислот при масс-спектрометрическом анализе повышали за счет дополнительной дериватизации по карбоксильной группе (этерификации) диазометаном. Выбор диазометана как этерифицирующего реагента был обусловлен необходимостью проведения реакции этерификации в мягких условиях, исключающих изотопный (¹H–²H) обмен в ароматическом фрагменте молекулы фенилаланина.

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

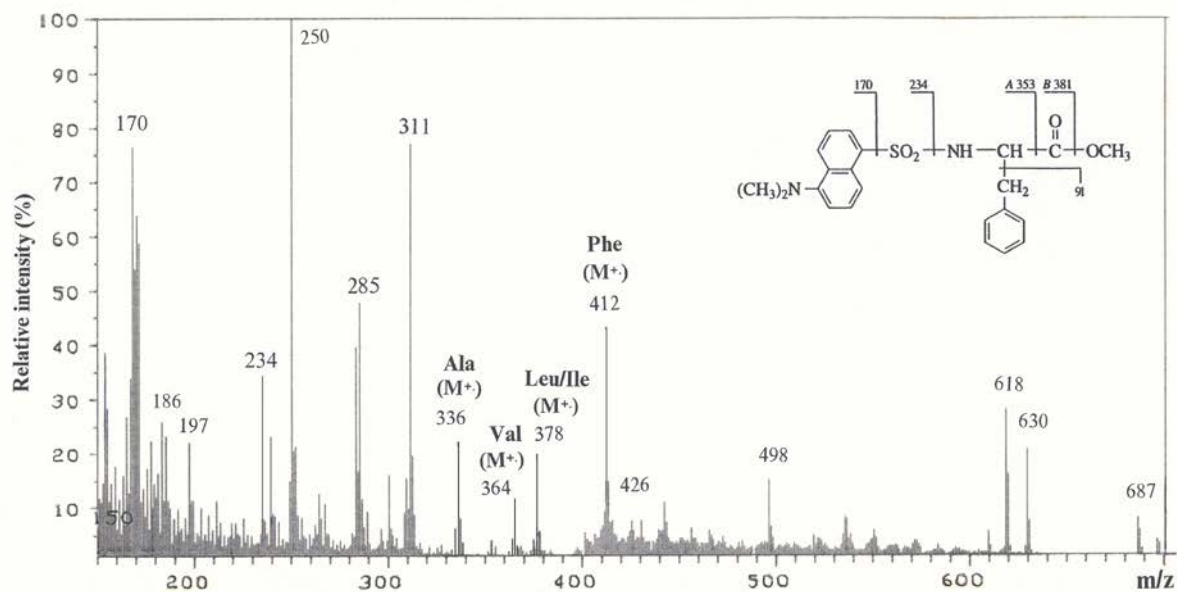


Рис. 4. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот из КЖ *B. methylicum* после обработки дансилхлоридом и диазометаном и фрагментация метилового эфира N-Dns-фенилаланина методом ЭУ. Условия выращивания: 2 % метанол и H₂O (контрольные условия). Символами аминокислот обозначены пики молекулярных ионов (M⁺) метиловых эфиров N-Dns-аминокислот. Интенсивность пиков приведена в %.

Контроль за включением дейтерия в молекулу [²H]фенилаланина за счет конверсии дейтерометанола при росте бактерий в среде, содержащей обычную воду и 2 % [²H]метанол (соответствуют опыту 2, табл. 1) показал незначительное количество дейтерия, поступающее в молекулу фенилаланина вместе с углеродом C²H₃O²H. Уровень дейтерированности фенилаланина был вычислен по величине пика M⁺ ($m/z = 413$) за вычетом вклада пика примеси природного изотопа дейтерия (не более 5 %). Полученный результат объясняется разбавлением дейтериевой метки за счёт протекания биохимических процессов, связанных с распадом C²H₃O²H при его ассимиляции клеткой, так и реакциями изотопного (¹H–²H) обмена и диссоциации в ²H₂O. Так, из четырех атомов дейтерия в молекуле C²H₃O²H, лишь один атом дейтерия при гидроксильной O²H-группе самый подвижный и поэтому легко диссоциирует в водной среде с образованием C²H₃OH. Три оставшихся атома дейтерия в молекуле C²H₃OH входят в цикл ферментативного окисления метанола, который приводит к потере дейтериевой метки за счёт образования соединений более окисленных, чем метанол. В частности, такое включение дейтерия в молекулу [²H]фенилаланина подтверждает классическую схему ферментативного окисления метанола до формальдегида в клетках метилотрофов, который после этого ассимилируется у данного штамма метилотрофных бактерий РМФ-путем фиксации углерода.

Биосинтетически синтезированный [²H]фенилаланин, полученный на средах с различной концентрацией ²H₂O, представлял собой смесь изотопнозамещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пик молекулярного иона фенилаланина (M⁺) полиморфно расщеплялся на отдельные кластеры с примесью молекул со статистическим набором массовых чисел m/z с различным вкладом в суммарный уровень дейтерированности молекулы. Его расчет проводился по усредненной величине наиболее интенсивного пика молекулярного иона (M⁺) (пик с наибольшим вкладом в уровень дейтерированности), зарегистрированным в данных условиях масс-спектрометром. Так, из масс-спектра ЭУ метиловых эфиров Dns-[²H]аминокислот КЖ, полученной со среды, содержащей 49 % ²H₂O (рис. 5) видно, что молекула [²H]фенилаланина содержит шесть изотопнозамещенных форм со средним значением величины пика молекулярного иона (M⁺) с $m/z = 414$, который возрастает по сравнению с контрольными условиями (рис. 4, (M⁺) с $m/z = 412$) на 2 единицы, т. е. 27,5 % от общего количества атомов водорода в молекуле замещены на дейтерий. Уровни включения

дейтерия в молекулы сопутствующих фенилаланину аминокислот – аланина, валина и лейцина/изолейцина, рассчитанные по разнице величин пиков молекулярных ионов дейтерированных и протонированных производных, составили 3 (50 %), 4 (50 %) и 5 (50 %) атомов дейтерия соответственно. Область масс-спектра ЭУ со значениями m/z 90–300 соответствует продуктам дериватизации метаболитов ростовой среды дансилхлоридом и диазометаном. Низкоинтенсивный пик $m/z = 431$, зафиксированный в масс-спектре ЭУ и проявляющийся во всех опытах, соответствует продукту дополнительного метилирования $[^2\text{H}]$ фенилаланина по α -NH-(Dns)-группе. Пик $m/z = 400$ (рис. 5) отвечает продукту отщепления метильной CH_3 -группы от дейтерированного метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина.

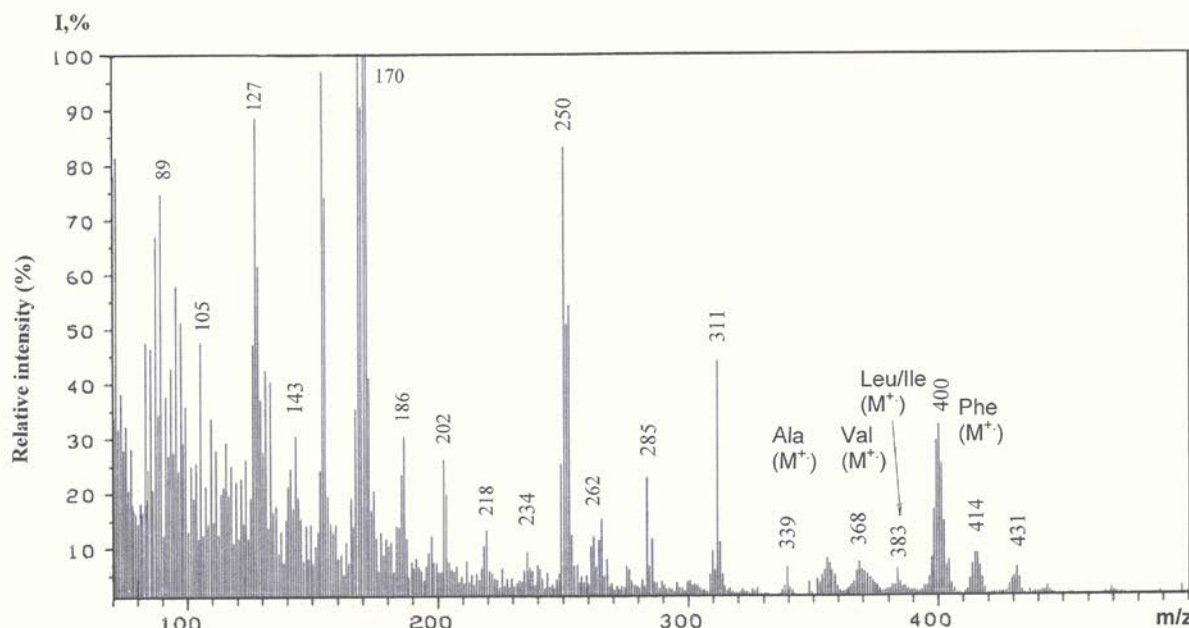


Рис. 5. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % $[^2\text{H}]$ метанол и 49,0 % $^2\text{H}_2\text{O}$.

Аналогичный результат по специфическому увеличению уровней включения дейтерия в молекулу фенилаланина наблюдался во всех опытах, где использовали увеличивающиеся концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде. При выращивании *B. methylicum* в среде, содержащей 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ в молекулу $[^2\text{H}]$ фенилаланина включается четыре атома дейтерия (50 % атомов водорода в молекуле), о чем свидетельствует присутствие в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина из образца КЖ *B. methylicum*, полученной на среде с 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 6) пика молекулярного иона метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина (M^+ , $m/z = 416$) (вместо M^+ , $m/z = 412$ в контрольных условиях (рис. 4)). В молекулы сопутствующих $[^2\text{H}]$ аминокислот – $[^2\text{H}]$ аланина, $[^2\text{H}]$ валина и $[^2\text{H}]$ лейцина/ $[^2\text{H}]$ изолейцина в этих условиях включились три (55 %), четыре (50 %) и пять (50 %) атомов дейтерия соответственно. Очевидно, что вышеобозначенные атомы дейтерия включились в молекулу фенилаланина за счет процесса биосинтеза de novo, т. е. по углеродному скелету молекулы. К легко обмениваемым относятся протоны (дейтероны) при гетероатомах в NH_2 - и COOH -группах $[^2\text{H}]$ аминокислот, которые замещаются за счёт лёгкости диссоциации в H_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$).

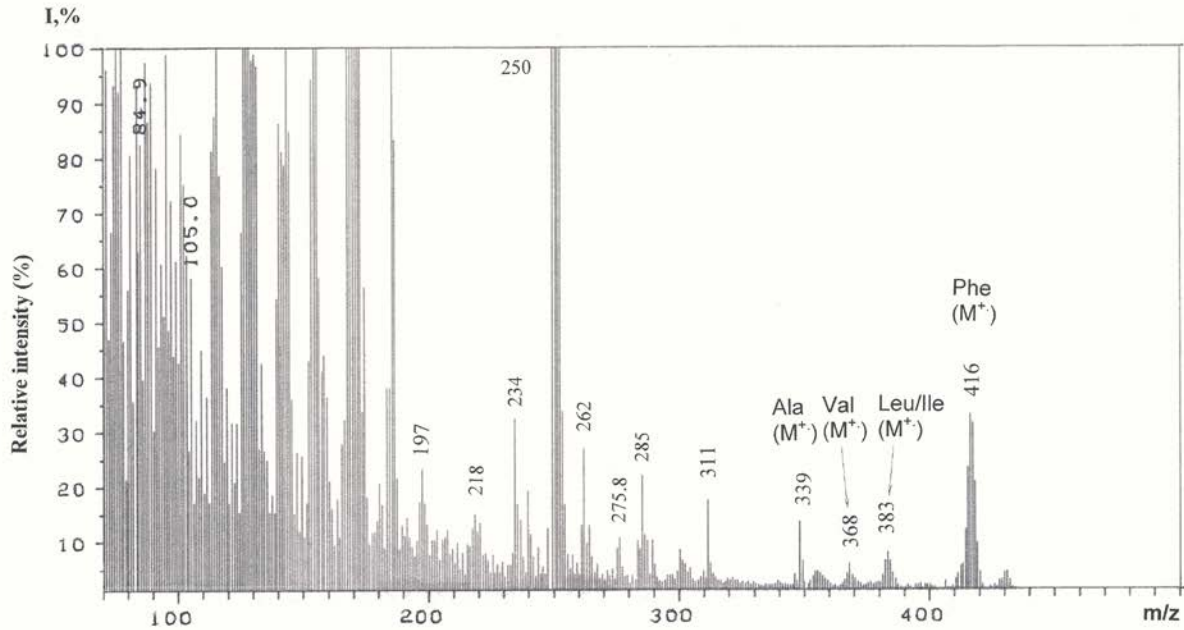


Рис. 6. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % [^2H]метанол и 73,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$.

Во всех опытах наблюдалось пропорциональное возрастание уровней изотопного включения дейтерия в молекулу [^2H]фенилаланина и молекулы сопутствующих [^2H]фенилаланину [^2H]аминокислот при ступенчатом увеличении концентраций тяжелой воды в ростовых средах (табл. 2). Как ожидалось, уровни включения дейтерия в молекулы метаболически близких [^2H]аминокислот семейства пирувата – [^2H]аланина, [^2H]валина и [^2H]лейцина при одинаковых концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах коррелируют между собой. Такой результат зафиксирован во всех изотопных экспериментах с $^2\text{H}_2\text{O}$ (табл. 2).

Таблица 2

Уровни включения дейтерия (%) в молекулы секретируемых [^2H]аминокислот *B. methylicum (данные получены для метиловых эфиров N-Dns-[^2H]аминокислот)**

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

* При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH - и NH_2 -группах аминокислот не учитывались из-за легкости изотопного (^1H – ^2H) обмена.

** Данные по включению дейтерия в молекулы [^2H]аминокислот приведены при выращивании *B. methylicum* на водных средах М9, содержащих 2 % [^2H]метанол и указанное количество (%) $^2\text{H}_2\text{O}$.

В условиях ауксотрофности по лейцину, который добавляли в ростовые среды в протонированном виде, уровни включения дейтерия в молекулы [^2H]аминокислот семейства пирувата, к которым относится аланин, валин и лейцин ниже, чем для фенилаланина (табл. 2). Отмеченная особенность отчетливее всего проявляется на среде с максимальной концентрацией $^2\text{H}_2\text{O}$. Данный результат подтвердил рис. 7, где показан масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот при выращивании бактерий *B. methylicum* в среде с 2 % [^2H]метанолом и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. Величина пика молекулярного иона метилового эфира

N-Dns- ^{2}H фенилаланина (M^+ , $m/z = 418$) увеличивается по сравнению с контрольными условиями (M^+ , $m/z = 412$, рис. 4) на шесть единиц, что соответствует замещению 75 % атомов водорода на дейтерий от общего количества атомов водорода в молекуле ^{2}H фенилаланина. В отличие от ^{2}H фенилаланина уровни включения дейтерия в ^{2}H аланин составили 3 (55 %), ^{2}H валин – 5 (62,5 %), в ^{2}H лейцин/ ^{2}H изолейцин – 5 (50 %) атомов дейтерия. Таким образом, в отличие от ^{2}H фенилаланина, уровни включения дейтерия в сопутствующие ^{2}H фенилаланину ^{2}H аминокислоты – аланин, валин и лейцин/изолейцин сохраняют стабильное постоянство в широком интервале концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$: от 49 % до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (табл. 2). Пик $m/z = 432$, зафиксированный в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^{2}H аминокислот КЖ на рис. 7 соответствует продукту дополнительного метилирования ^{2}H фенилаланина по $\alpha\text{-NH}_2$ -группе. Кроме этого, в масс-спектре ЭУ фиксируется пик обогащенного дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы ^{2}H фенилаланина с $m/z = 97$ (вместо $m/z = 91$ в контроле), что указывает на то, что местами локализации 6 атомов дейтерия в молекуле ^{2}H фенилаланина являются положения С1–С6 ароматических протонов в бензильном $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагменте. Из масс-спектрометрических данных следует, что при других концентрациях $^2\text{H}_2\text{O}$ дейтерий также включается в ароматическое кольцо ^{2}H фенилаланина, так как метаболизм адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ штамма *B. methylicum* не претерпевает существенных изменений в $^2\text{H}_2\text{O}$. Полученный результат важен для его дальнейшего использования в медицинской диагностике, где необходимо использовать ^{2}H аминокислоты с высокими уровнями изотопного обогащения.

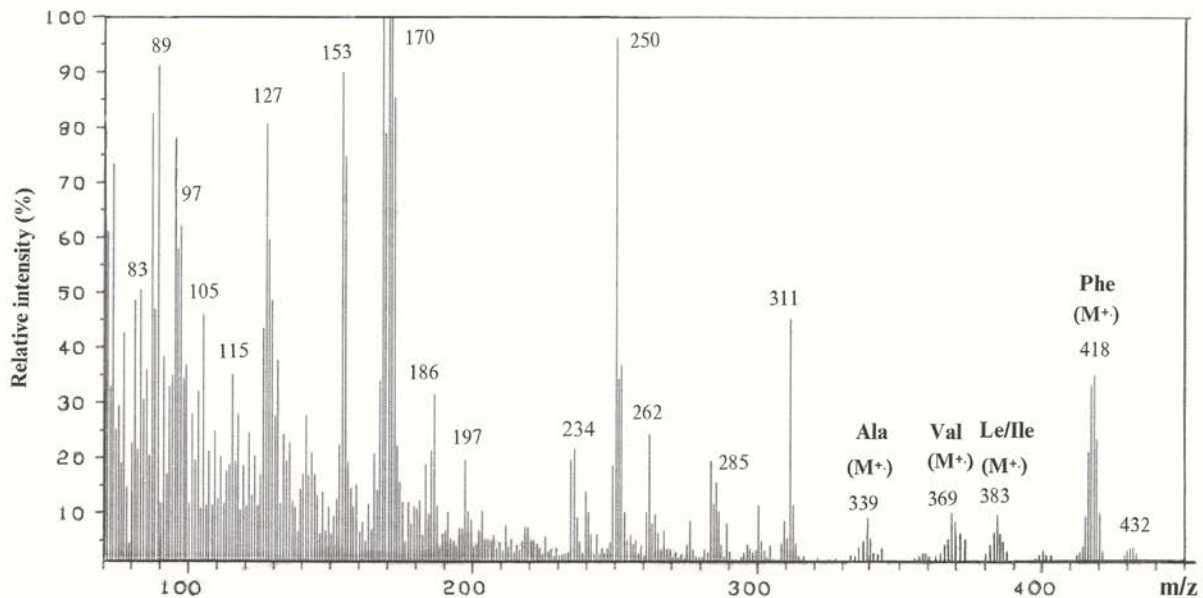


Рис. 7. Масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- ^{2}H аминокислот из КЖ *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 2 % ^{2}H метанол и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (максимально дейтерированная среда).

Суммируя полученные данные по уровням включения дейтерия в молекулы ^{2}H фенилаланина и сопутствующих ^{2}H фенилаланину ^{2}H аминокислот, можно сделать вывод о сохранении минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом лейцина и метаболически родственных с ним аминокислот семейства пирувата – аланина и валина, уровни дейтерированности которых в пределах одинаковых концентраций H_2O находятся в корреляции (фенилаланин относится к семейству ароматических аминокислот, синтезируемых из шикимовой кислоты). Другим объяснением наблюдаемого эффекта, если принять во внимание происхождение лейцина и изолейцина по различным путям биосинтеза (изолейцин принадлежит к семейству аспартата), может быть ассимиляция клеткой немеченого лейцина из ростовой среды на фоне биосинтеза ^{2}H изолейцина *de novo*. Учитывая эти данные, следует подчеркнуть, что для достижения более высокого

уровня дейтерированности конечного продукта биосинтеза необходимо контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов.

Заклучение.

В результате использованного в работе селекционного подхода удалось адаптировать *L*-фенилаланин продуцирующий штамм аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* к высокому содержанию $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде для препаративного микробиологического синтеза [^2H]фенилаланина различного уровня дейтерированности, включая максимально дейтерированный [^2H]фенилаланин. Преимуществами данного штамма для синтеза [^2H]фенилаланина являются его улучшенные ростовые и биосинтетические характеристики на максимально дейтерированной среде. За счет его использования удалось выделить 0,65 г чистого [^2H]фенилаланина (75 % ^2H) из 1 л максимально дейтерированной среды.

Примечания:

1. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / D.M. LeMaster // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1990. Vol. 19, № 2. P. 243–266.

2. 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.

3. Crespi H.L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins // in: *Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds: Proceedings of 2nd International Symposium* / Ed. R.R. Muccino. Kansas City, Missouri, USA., 3–6 September 1985. Amsterbam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier, 1986. P 111–112.

4. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment / P. MacCarthy // *J. Chem. Educ.* 1986. Vol. 62, № 7. P. 633–638.

5. Мосин О.В. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот бактериальных объектов / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, В.И. Швец // *Биоорг. Хим.* 1996. Т. 22, № 10–11. С. 856–869.

6. Ignatov I. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Bacillus subtilis* in heavy water as model system / I. Ignatov, O.V. Mosin // *Journal of Natural Sciences Research.* 2013. Vol. 83, № 8. P. 132–139.

7. Складнев Д.А. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых ^2H - и ^{13}C -аминокислот / Д.А. Складнев, О.В. Мосин, Т.А. Егорова, С.В. Еремин, В.И. Швец // *Биотехнология.* 1996. № 5. С. 25–34.

8. Мосин О.В. Изучение методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C и ^{15}N с высокими степенями изотопного обогащения: автореф. дисс. ...канд. хим. наук: Москва, МГАТХТ им. М.В. Ломоносова, 1996. 26 с.

9. Dewick P.M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach / Ed. P.M. Dewick. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 161 p.

10. Karnaukhova E.N. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* / E.N. Karnaukhova, O.V. Mosin, O.S. Reshetova // *Amino Acids.* 1993. Vol. 5, № 1. P. 125.

11. Мосин О.В. Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* при росте на средах, содержащих тяжелую воду и дейтерометанол / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, А.М. Юркевич, В.И. Швец // *Биотехнология.* 1996. № 3. С. 3–12.

12. Mosin O.V. 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 / 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.

13. Mosin O.V. 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* / O.V. Mosin, I. Ignatov // *International Journal of Biomedicine.* 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.

14. de Boer L. Phenylalanine and tyrosine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia sp.* 239 / L. de Boer, W. Harder, L. Dijkhuizen // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 149. P. 459–465.
15. Herrmann K.M. The shikimate pathway / K.M. Herrmann, L.M. Weaver // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1999. Vol. 50. P. 473–503.
16. Wendisch V.F. Amino acid biosynthesis – pathways, regulation and metabolic engineering / Ed. F. Volker. Helderberg: Springer Verlag. 2007. P. 237–240.
17. Abou-Zeid A. Biosynthesis of L-phenylalanine and L-tyrosine in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica* / A. Abou-Zeid, G. Euverink, G.I. Hessels, R.A. Jensen, L. Dijkhuizen // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 4. P. 1298–302.
18. Mosin O.V. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 1998. Vol. 62, № 2. P. 225–229.
19. Мосин О.В., Игнатов И. Изотопные эффекты дейтерия в клетках бактерий и микроводорослей при росте на тяжелой воде (D_2O) / О.В. Мосин, И. Игнатов // Вода: Химия и Экология. 2012. № 3. С. 83–94.
20. Maksimova N.P. Regulation of phenylalanine biosynthesis in the obligate methylotroph *Methylobacillus M75* / N.P. Maksimova, E.V. Dobrozhinetskaia, Yu.K. Fomichev // Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 1990. № 10. P. 28–30.

References:

1. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / D.M. LeMaster // Annu. Rev. Biophys. Chem. 1990. Vol. 19, № 2. P. 243–266.
2. 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.
3. Crespi H.L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins // in: Synthesis and Applications of Isotopically labeled Compounds: Proceedings of 2nd International Symposium / Ed. R.R. Muccino. Kansas City, Missouri, USA., 3–6 September 1985. Amsterbam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier, 1986. P 111–112.
4. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment / P. MacCarthy // J. Chem. Educ. 1986. Vol. 62, № 7. P. 633–638.
5. Mosin O.V. Mass-spectrometric determination of levels of enrichment of ^2H and ^{13}C in molecules of amino acids of various bacterial objects / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, V.I. Shvets // Bioorganic Chemistry. 1996. Vol. 22, № 10–11. P 856–869.
6. Ignatov I. Possible processes for origin of life and living matter with modeling of physiological processes of bacterium *Bacillus subtilis* in heavy water as model system / I. Ignatov, O.V. Mosin // Journal of Natural Sciences Research. 2013. Vol. 83, № 8. P. 132–139.
8. Mosin O.V. Studying of methods of biotechnological preparation of proteins, amino acids and nucleosides, labeled with stable isotopes ^2H , ^{13}C and ^{15}N with high levels of isotopic enrichment: autoref. disser. thesis Ph D: Moscow, M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology. 1996. 26 p.
9. Dewick P.M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach / Ed. P.M. Dewick. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 161 p.
10. Karnaukhova E.N. Biosynthetic production of stable isotope labeled amino acids using methylotroph *Methylobacillus flagellatum* / E.N. Karnaukhova, O.V. Mosin, O.S. Reshetova // Amino Acids. 1993. Vol. 5, № 1. P. 125.
11. 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.
12. Mosin O.V. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultive 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.
13. Mosin O.V. 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* / O.V. Mosin, I. Ignatov // International Journal of Biomedicine. 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.

14. de Boer L. Phenylalanine and tyrosine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia* sp. 239 / L. de Boer, W. Harder, L. Dijkhuizen // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 149. P. 459–465.

15. Herrmann K.M. The shikimate pathway / K.M. Herrmann, L.M. Weaver // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1999. Vol. 50. P. 473–503.

16. Wendisch V.F. Amino acid biosynthesis – pathways, regulation and metabolic engineering / Ed. F. Volker. Helderberg: Springer Verlag. 2007. P. 237–240.

17. Abou-Zeid A. Biosynthesis of L-phenylalanine and L-tyrosine in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica* / A. Abou-Zeid, G. Euverink, G.I. Hessels, R.A. Jensen, L. Dijkhuizen // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 4. P. 1298–302.

18. Mosin O.V. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 1998. Vol. 62, № 2. P. 225–229.

19. Mosin O.V. Isotope effects of deuterium in bacterial and microalgae cells at growth on heavy water (D_2O) / O.V. Mosin, I. Ignatov // Water: Chemistry and Ecology. 2012, № 3. P. 83–94.

20. Maksimova N.P. Regulation of phenylalanine biosynthesis in the obligate methylotroph *Methylobacillus M75* / N.P. Maksimova, E.V. Dobrozhinetskaia, Yu.K. Fomichev // Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 1990. № 10. P. 28–30.

УДК 579.871.08+577.385.4.08

Использование факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* B-5652 с РМФ-циклом ассимиляции углерода для микробиологического синтеза [^2H]фенилаланина разного уровня дейтерированности

¹Олег Викторович Мосин

²Игнат Игнатов

³Дмитрий Анатольевич Складнев

⁴Виталий Иванович Швец

¹ 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

² 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

³ 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

⁴ Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация

Академик РАН, доктор химических наук, заведующий кафедрой биотехнологии и нанобиотехнологии

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

Аннотация. С использованием штамма аэробных грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* B-5652,

ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) циклу ассимиляции углерода осуществлен препаративный микробиологический синтез фенилаланина и метаболически связанных с ним аминокислот (аланин, валин, лейцин/изолейцин в количестве 5–6 ммоль/л), меченных дейтерием (^2H). Представлены данные по адаптации штамма *B. methylicum* к максимальной концентрации дейтерия в среде культивирования М9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом и биосинтезу [^2H]фенилаланина разного уровня дейтерированности. Разработанный метод микробиологического синтеза позволяет получать [^2H]фенилаланин разного уровня дейтерированности в зависимости от концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах М9: от 17 % (2 атома дейтерия) (на среде с 24,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$) до 75 % (6 атомов дейтерия) (на среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$) с включением дейтерия в бензильный $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмент молекулы, что подтверждено данными масс-спектрометрического анализа электронного удара (ЭУ) метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных [^2H]фенилаланина, выделенных из КЖ штамма-продуцента после разделения методом ОФ ВЭЖХ.

Ключевые слова: *Brevibacterium methylicum*; L-фенилаланин; биосинтез; тяжелая вода; масс-спектрометрия ЭУ; ОФ ВЭЖХ.

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
 European Journal of Molecular Biotechnology
 Has been issued since 2013.
 ISSN: 2310-6255
 Vol. 3, No. 1, pp. 41-48, 2014

DOI: 10.13187/issn.2310-6255
www.ejournal8.com



UDC 628.543

Linen Fire as Biosorbent to Remove Heavy Metal Ions From Wastewater Modeling

Ildar G. Shaikhiev

Kazan national research technology university, Russian Federation
 K. Marks str. 68, Kazan, 420015
 PhD (Technology)
 E-mail: ildars@inbox.ru

Abstract. The possibility of using linen fires – Inopererabotki waste as a sorption material for the extraction of heavy metal ions from wastewater modeling. It is shown that treatment with acid solutions linen fires a low concentration increases the surface area of linen fires and thus sorption capacity for heavy metal ions. The values of the maximum sorption capacity ions Fe (III), Co (II), Ni (II) and Zn (II) under static and dynamic conditions. IR spectroscopy shows that along with the physical sorption process proceeds chemisorption.

Keywords: linen fire; heavy metal ions; removal; acidizing; sorption capacity.

Введение.

В последнее время в России и в мире интенсивно развивается новое направление в области охраны окружающей среды – использование отходов промышленного и сельскохозяйственного производства, а также зеленой и высушенной биомассы для удаления загрязнителей из природных и сточных вод [1-10]. Продукты, образующиеся в результате переработки природного сырья, имеют возобновляемую многотоннажную сырьевую базу, дешевы и эффективны. Их использование позволяет решать двойную природоохранную задачу – перевод отходов производств в разряд вторичных материальных ресурсов и использование для очистки водных сред от загрязнителей. Опубликовано значительное количество работ по исследованию целлюлозосодержащих отходов сельхозпереработки в качестве сорбционных материалов для удаления ионов тяжелых металлов (ИТМ) из загрязненных вод.

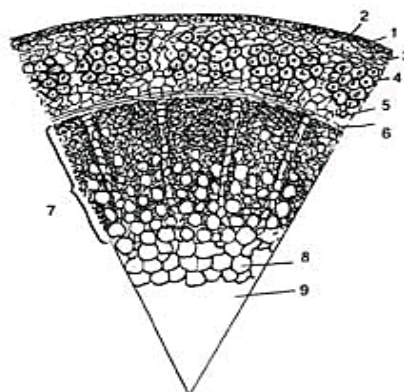
В последние годы наметился рост производства и переработки льна, как в Российской Федерации, так и во всем мире. Данное обстоятельство обусловлено, прежде всего, повышенным интересом к производству и потреблению льняных тканей и одежды, которые обладают повышенными экологическими и эксплуатационными характеристиками. По литературным данным [11] в последние годы в Российской Федерации посевные площади льна-долгунца составляют примерно 110 тыс. га, при этом валовой сбор льна в переводе на волокно составляет 56 тыс. т. При переработке тресты на льноперерабатывающих заводах образуется порядка 110 тыс. т льняной костры (ЛК) ежегодно. Основная доля производства и переработки льна (около 70 %) приходится на Центральный и Западно-Сибирский районы России. В данной работе исследовалась возможность удаления кострой ИТМ из модельных водных растворов и увеличения сорбционной емкости путем обработки растворами серной кислоты малой концентрации.

Материалы и методы исследования.

1. Строение стебля льна. На поперечном срезе стебля льна-долгунца (рис. 1) можно наблюдать наружный слой-кожицу (эпидермис) 1 с поверхностью, покрытой пленкой, пропитанной воскообразными веществами (кутикула) 2.

Рис. 1. Строение стебля льна (срез):

- 1 – кожица (эпидермис),
- 2 – кутикула,
- 3 – кора,
- 4 – лубоволокнистые пучки,
- 5 – проводящая ткань,
- 6 – образовательная ткань,
- 7 – древесина,
- 8 – сердцевина,
- 9 – полость.



Кожица состоит из плотных сосудистых клеток с утолщенными стенками. Кора 3 расположена непосредственно под кожицей. Ее клетки частично заполнены хлорофиллом. Лубо-волоконистые пучки 4 залегают в тканях коры. Они состоят из групп элементарных волокон с толстыми целлюлозными стенками, склеенных между собой срединными пластинками из пектинов и других клеящих веществ. По форме элементарные волокна граненные и склеивание идет по плоскостям – граням волокон. Проводящая ткань 5 состоит из тонкостенных удлинённых клеток. Образовательная ткань (камбий) 6 в виде одно- или двухслойного кольца лежит на границе с древесиной 7. Сердцевина 8 выстилает внутреннюю часть стебля. Полость 9 не заполнена тканями. Примерно треть поперечного сечения стебля (исключая полость и сердцевину) занимают волокнистые и окружающие их ткани. Две трети заполнены древесиной. По массе это 25 – 45 % луб и на 75 – 55 % древесина. Элементарные волокна длиной от 2,5 до 120 мм ориентированы вдоль стебля, имеют заостренную с обоих концов форму и внутри замкнутый со всех сторон канал. Склеенные по граням элементарные волокна образуют пучки технических волокон. Элементарные волокна сдвинуты вдоль пучка и их утоненные концы как бы вклиниваются между соседними. Местами волокнистые пучки (технические волокна) склеиваются между собой, образуя сетчатую структуру (анастомоз).

В процессе мятья и трепания волокна приобретают вид длинных прядей, длина которых приблизительно равна длине стебля. Часть волокон при этом обрывается или откалывается, спутывается и попадает в отходы трепания.

Стебли льна при выделении волокна в процессах мятья и трепания разрушаются, а отпадающие одревесневелые части образуют костру. Размеры этих частиц колеблются от 1 до 10 мм по длине, чаще всего встречаются частицы длиной порядка 5 мм. Толщина колеблется в пределах 0,3-5 мм. По химическому составу ЛК сходна с древесиной. Из литературных данных известен химический состав ЛК, %: целлюлоза – 38-40; лигнин – 23-24; гемицеллюлоза – 14-15; пектины – 2-3; коксовый остаток – 2-3 [11].

2. Методики проведения экспериментов. Для построения изотерм сорбции в четырнадцать плоскодонных колб емкостью 250 мл помещались навески исследуемых образцов ЛК по 1 г. Затем в колбы заливалось по 200 мл растворов, содержащих ионы Fe(III), Co(II), Ni(II) и Zn(II) в концентрациях от 1 мг/дм³ до 4000 мг/дм³. Для имитации кислых гальваностокков модельные растворы подкислялись раствором серной кислоты до достижения pH = 3.

В модельной СВ в качестве загрязнения использовались: Fe₂(SO₄)₃·9H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CoSO₄·7H₂O, NiSO₄·7H₂O. Навески солей брались с учетом кристаллизационной воды.

Колбы с находящимися в них навесками ЛК и соответствующими растворами плотно закрывались пробками и энергично встряхивались в течение 3 часов. Затем образцы ЛК удалялись фильтрацией, а в фильтраатах определялись остаточные концентрации вышеназванных ИТМ согласно стандартным методикам.

Количество ионов металла, сорбированное 1 г ЛК (Γ) в мг/г рассчитывалось по формуле:

$$\Gamma = ((C_0 - C_p) \cdot 200) / (1 \cdot 1000), \quad (1)$$

где C_0 – исходная концентрация ионов металла, мг/дм³; C_p – конечная концентрация ионов металла, мг/дм³; 200 – объем раствора, мл; 1 – вес СМ, г; 1000 – переход от мл к дм³.

Для изучения кинетики сорбции ИТМ в статических условиях в пять плоскодонных колб емкостью 250 мл помещались навески ЛК по 0,1 г. Навески вносились исходя из содержания сорбционного материала в количестве 1 г на дм³ жидкости. Затем в колбы приливалось по 100 мл модельных растворов, содержащих ионы Co(II), Fe(III), Ni(II), Zn(II) в концентрации 100 мг/дм³.

Колбы с находящимися в них навесками ЛК и растворами плотно закрывались пробками и энергично встряхивались на шейкерах в течение заданных промежутков времени: 30 мин., 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов.

Затем образцы ЛК отфильтровывались и в фильтрах определялись остаточные концентрации исследуемых ИТМ фотометрическим методом.

Для изучения кинетики сорбции ИТМ в динамических условиях в адсорбционные колонки набивалось по 5 г ЛК и пропускался раствор с концентрацией ионов Fe(III), Co(II), Ni(II) и Zn(II), равной 100 мг/дм³. Устанавливался определенный расход прохождения модельной СВ через слой ЛК, равный 20 мл/мин. Через определенные промежутки времени определялись остаточные концентрации вышеназванных ионов в воде, прошедшей через слой реагента.

Количество ИТМ, поглощенных 1 г ЛК (M) за определенный промежуток времени в динамических условиях, определялось по формуле:

$$M_i = ((C_0 - C_p) \cdot v \cdot \tau) / (m \cdot 1000), \quad (2)$$

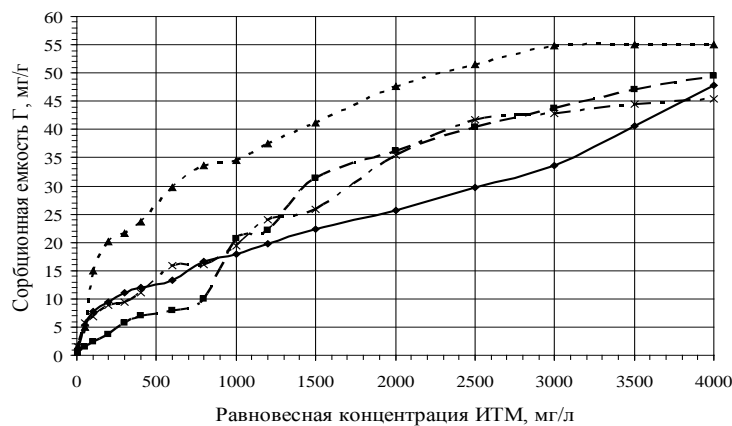
где C_0 – исходная концентрация ионов металла, $C_0 = 100$ мг/дм³; C_p – конечная концентрация ионов металла, мг/дм³; v – скорость прохождения раствора, $v = 20$ мл/мин; m – вес ЛК, $m = 5$ г; τ – интервал пробоотбора, мин; 1000 – переход от мл к дм³.

Суммированием всех значений M за 150 минут определялось значение максимальной сорбционной емкости исследуемых образцов ЛК в заданных одинаковых условиях:

$$M = \sum M_i$$

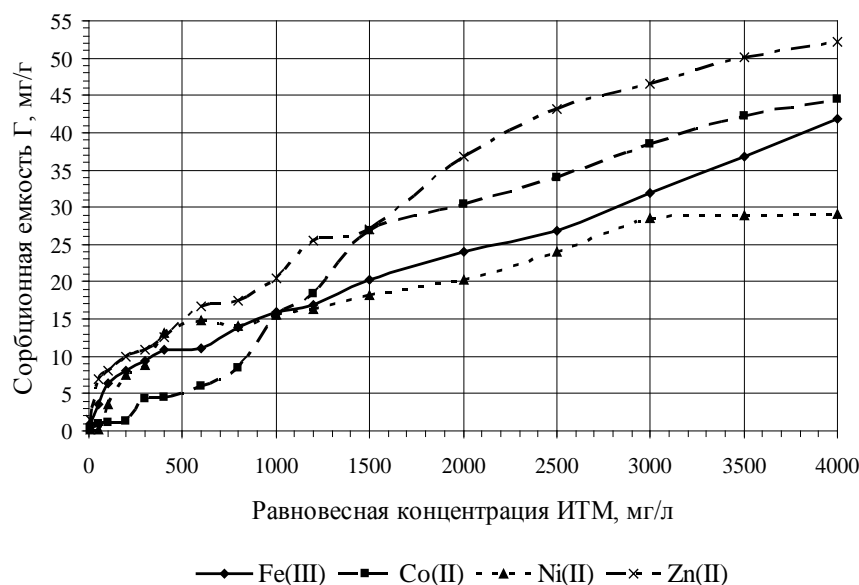
Результаты и обсуждение.

Построенные изотермы сорбции ЛК по отношению к ионам Fe(III), Ni(II), Zn(II) и Co(II) в нейтральной и кислой среде приведены на рис. 2. Очевидно, что в данном случае, применительно к изотермам сорбции названных ИТМ, справедлив закон Генри, т.е. сорбционная емкость пропорциональна конечной концентрации ионов металла в растворе, что соответствует изотермам С-типа. Максимальная сорбционная емкость (Γ) льняной костры по отношению к ионам Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} относительно невелика и составляет 50, 48, 55 и 45 мг/г в нейтральной среде и 45, 42, 29 и 52 мг/г в кислой среде, соответственно, при максимальной концентрации указанных ИТМ в растворе, равной 4000 мг/дм³.



a)

—○— Fe(III) —■— Co(II) —▲— Ni(II) —×— Zn(II)



б)

Рис. 2. Изотермы сорбции ИТМ: а) в нейтральной среде, б) в кислой среде

Найдено, что ионы Co(II) , Fe(III) и Ni(II) имеют более низкие значения параметра Γ в кислой среде, а ионы Zn(II) - в нейтральной.

Следующий этап работы заключался в определении кинетики удаления ИТМ исследуемым сорбционным материалом в статических условиях.

Значения остаточной концентрации ИТМ в модельной воде после 5 часового контакта с исследуемым реагентом приведены в табл. 1.

Таблица 1

Значения остаточной концентрации ИТМ в модельном растворе после 5 часового контакта с кострой

ИТМ	Остаточная концентрация ИТМ в растворе, обработанного кострой в нейтральной среде в статических условиях, мг/дм ³	Остаточная концентрация ИТМ в растворе, обработанного кострой в кислой среде в статических условиях, мг/дм ³
Co^{2+}	76	79
Fe^{3+}	53,9	97,1
Ni^{2+}	43,5	90,2
Zn^{2+}	60	26

Следующий этап экспериментальной работы заключался в изучении кинетики удаления ИТМ из нейтральных и кислых модельных растворов в динамических условиях. Проведенными экспериментами найдено, что сорбционная емкость ЛК по отношению к ионам Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} составляет 20, 41, 38 и 13,4 мг/дм³ в нейтральной среде и 19, 18, 27 и 7,4 мг/дм³ в кислой среде соответственно. Результаты исследований, проведенных в динамических условиях, несколько отличаются от данных, полученных в статических условиях. Отмечено, что сорбционная емкость исследуемых ИТМ в нейтральной среде выше, чем в кислой.

С целью повышения сорбционной емкости костры по отношению к ИТМ в данной работе исследовались в качестве модификаторов костры растворы серной кислоты. Предпосылкой для химической обработки служила работа [12], в которой с целью создания

эффективного и дешевого сырья для очистки сточных вод разработан способ синтеза фосфорнокислого катионита из ЛК. Для синтеза ионитов использована методика фосфорилирования целлюлозы ортофосфорной кислотой в присутствии мочевины. Отмечено, в частности, что полученный фосфорнокислый катионит может быть эффективно использован для очистки воды от солей жесткости при pH = 9 и от ИТМ при pH = 6-9.

В связи с вышеизложенным, определялись сорбционные характеристики модификатов костры в зависимости от концентрации H_2SO_4 (0,5 – 3 %) в растворе, с которым контактирует сорбционный материал. Начальная концентрация ИТМ в растворе составила 300 мг/дм³, время выдержки костры в растворах кислот - 60 минут. Гистограммы зависимости сорбционной емкости ЛК по отношению к ионам Co(II), Fe(III), Ni(II) и Zn(II) от концентрации растворов H_2SO_4 приведены на рис. 3, из которого видно, что обработка серной кислотой приводит к значительному увеличению сорбционной емкости по отношению к ионам Fe^{3+} и Zn^{2+} , незначительному – к ионам Co^{2+} и снижению искомого параметра по отношению к ионам Ni^{2+} .

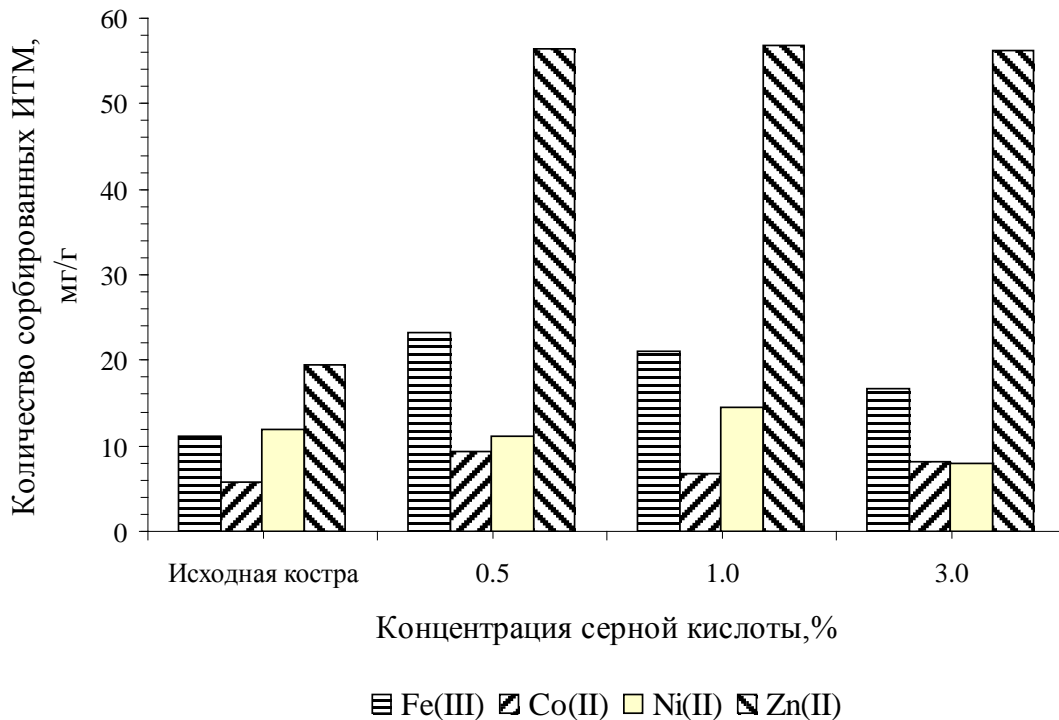


Рис. 3. Зависимость сорбционной емкости костры и ее модификатов По отношению к ИТМ от концентрации серной кислоты в растворе

Кроме того, наблюдается тенденция к снижению сорбционной емкости по отношению к исследуемым ИТМ с увеличением концентрации кислоты в растворе. По всей видимости, увеличение сорбционной емкости по ИТМ связано с увеличением площади поверхности ЛК в результате сернокислотной обработки. Подтверждением данного предположения являются фотографии поверхности исходной ЛК и образца, подвергнутого взаимодействию с малоконцентрированным раствором модификатора (рис. 4).

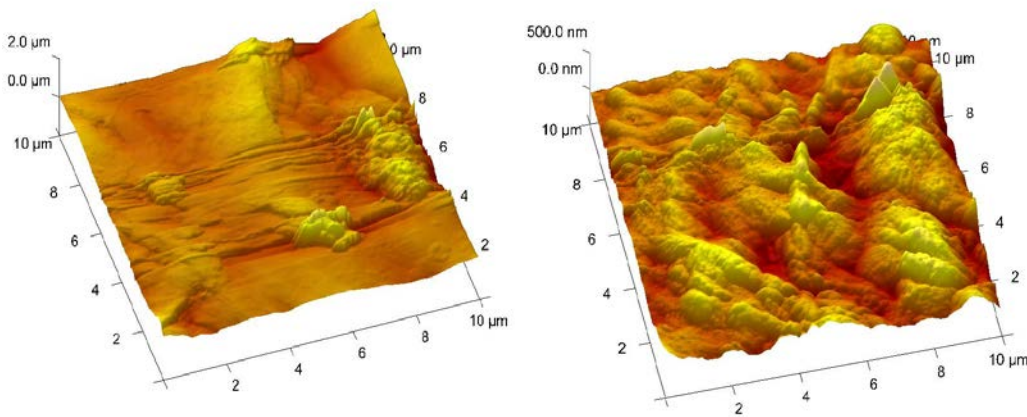


Рис. 4. Фотографии поверхности исходной льняной костры (слева) и после обработки раствором серной кислоты (справа)

Предположительно, удаление названных ИТМ происходит как в результате физической сорбции, так и хемосорбции.

Для подтверждения вышеназванного предположения проведены ИК - спектрометрические исследования образцов костры после взаимодействия с растворами солей металлов. Как было отмечено ранее, основной составляющей льняной костры является целлюлоза – длинноцепной полисахарид, состоящий из гликозидных остатков, связанных между собой эфирными мостиками (1,4-β-гликозидными связями). Для макромолекулы целлюлозы характерны гидроксильная группа и незначительное содержание карбонильных групп. Установлено, что на каждые 1000 глюкозных остатков цепи макромолекулы целлюлозы приходится 2-3 группы С(О)ОН [13].

С целью выявления механизма взаимодействия, исследовались методом ИК-спектроскопии образцы костры, подвергнутые обработке солями металлов, в качестве которых взяты FeCl₃, ZnSO₄, CuSO₄ и CoSO₄. Изменение характера спектра и смещение полосы поглощения в области 1730 см⁻¹ (рис. 5), соответствующей колебаниям С(О)ОН-группы, свидетельствует о том, что последняя вступает во взаимодействие с ИТМ по реакции ионного обмена. Данное обстоятельство подтверждают данные работы [14].

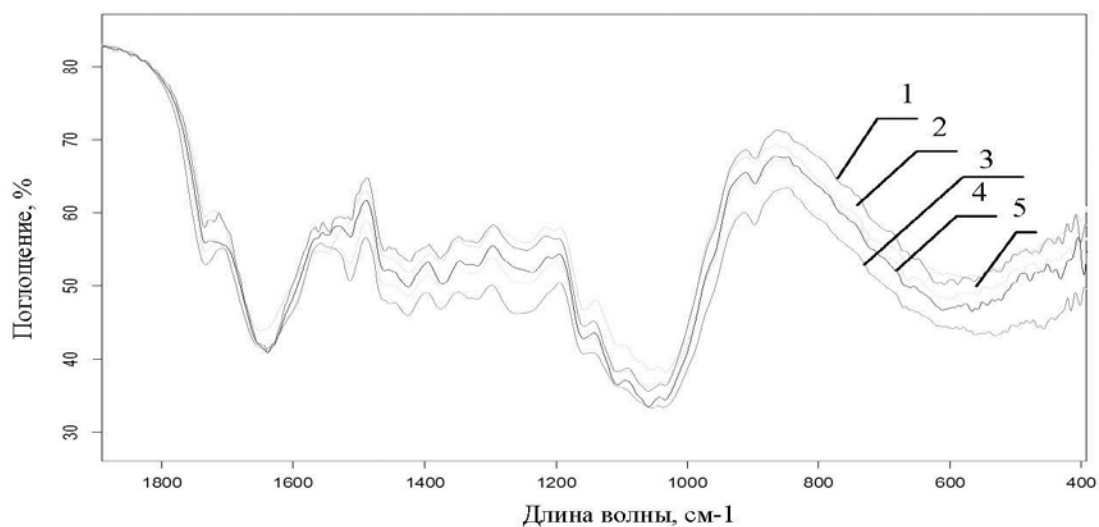


Рис. 5. ИК-спектры поглощения в области 400 – 1900 см⁻¹: 1) исходной костры и обработанной водными растворами: 2) CuSO₄; 3) FeCl₃, 4) CoSO₄, 5) ZnSO₄

Изменение рисунка спектров исходной костры и образцов, подвергнутых обработке растворами солей в области 3000-3600 см⁻¹, характерной для колебаний гидроксильной группы, свидетельствует о том, что в процессе хемосорбции ИТМ кострой участвуют и ОН-группы, входящие в состав биополимеров КР. Данное взаимодействие подтверждается исследованиями, опубликованными в работах [13, 15].

Таким образом, проведенными исследованиями показана возможность использования льняной костры в качестве СМ для удаления ИТМ из модельных растворов, определены сорбционные характеристики в статических и динамических условиях и предложено увеличение последних путем обработки ЛК слабыми растворами серной кислоты.

Примечания:

1. Шайхiev И.Г. (2008) Использование отходов деревопереработки в качестве реагентов для очистки сточных вод. Все материалы: энциклопедический справочник
2. Шайхiev И.Г. (2010) Использование растительных сельскохозяйственных отходов для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов. ч. I. Все материалы: энциклопедический справочник. 3, с. 15-25.
3. Шайхiev И.Г. (2010) Использование растительных сельскохозяйственных отходов для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов. ч. II. Все материалы: энциклопедический справочник. 34, с. 30-40.
4. Hubbe M.A., Hasan S.H., Ducoste J.J. (2011) Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous system: a review. 1. Metals. *BioResources*. 6(2). pp. 2161-2287.
5. Alpana S. (2008) Chromium adsorption on agro based waste materials: a review. *Res. J. Biotech*. 2. pp. 207-209.
6. Шайхiev И.Г., Минлигулова Г.А. (2010) Очистка водных объектов от ионов хрома с использованием отходов промышленного и сельскохозяйственного производства. Часть. 2. Удаление ионов хрома отходами промышленного производства. *Вода и экология: проблемы и решения*. 4, с. 59-72.
7. Шайхiev И.Г., Минлигулова Г.А. (2011) Очистка водных объектов от ионов хрома с использованием отходов промышленного и сельскохозяйственного производства. Часть. 3. Удаление ионов хрома отходами переработки сельскохозяйственного сырья. *Вода и экология: проблемы и решения*. 1, с. 33-44.
8. Kumar P., Agnihotri R., Wasewar K.L., Uslu H., Yoo C.K. (2012) Status of adsorptive removal of dye from textile industry effluent. *Desalination and water treatment*. 50 (1-3). pp. 226-244.
9. Geethakarathi A., Phanikumar B.R. (2011) Industrial sludge based adsorbents/ industrial byproducts in the removal of reactive dyes – A review. *Int. J. of Water Resources and Environ. I Eng*. 3(1), pp. 1-9.
10. Собгайда Н.А., Ольшанская Л.Н. Сорбенты для очистки вод от нефтепродуктов. Саратов: СГТУ, 2010. 108 с.
11. Живетин В.В., Гинзбург Л.Н., Ольшанская О.М. Лен и его комплексное использование. М.: Информ-Знание, 2002. 400 с.
12. Елинсон И.С. (1998) Синтез и свойства новых сорбционных материалов на основе льняной костры. *Труды 3 научно-техн. конф. «Ресурсосберегающие и экологически чистые технологии»*, Гродно. с. 169-174.
13. Никифорова Т.Е. (2009) Сорбционные свойства и природа взаимодействия целлюлозосодержащих полимеров с ионами металлов. *Химия растительного сырья*. 1. с. 5-14.
14. Гусев С.С., Ермоленко И.Н. (1966) Частоты карбоксилатных ионов и структура солей карбоксилсодержащих полисахаридов. *Известия АН БССР. Серия химические науки*. 4. с. 105-107.
15. Грунин Ю.Б., Иванова В.Л. (1985) Характер взаимодействия в системе «целлюлоза – водный раствор электролита». *Бумажная промышленность*. 2. с. 10-11.

References

1. Shaikhiev I.G. (2008) Ispol'zovanie otkhodov depevopepepabotki v kachestve peagentov dlya ochistki stochnykh vod. Vse materialy: entsiklopedicheskii spravochnik
2. Shaikhiev I.G. (2010) Ispol'zovanie rastitel'nykh sel'skokhozyaistvennykh otkhodov dlya ochistki stochnykh vod ot ionov tyazhelykh metallov. ch. I. Vse materialy: entsiklopedicheskii spravochnik. 3, s. 15-25.
3. Shaikhiev I.G. (2010) Ispol'zovanie rastitel'nykh sel'skokhozyaistvennykh otkhodov dlya ochistki stochnykh vod ot ionov tyazhelykh metallov. ch. II. Vse materialy: entsiklopedicheskii spravochnik. 34, s. 30-40.
4. Hubbe M.A., Hasan S.H., Ducoste J.J. (2011) Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous system: a review. 1. Metals. *BioResources*. 6(2). pp. 2161-2287.
5. Alpana S. (2008) Chromium adsorption on agro based waste materials: a review. *Res. J. Biotech*. 2. pp. 207-209.

6. Shaikhiev I.G., Minligulova G.A. (2010) Ochistka vodnykh ob'ektov ot ionov khroma s ispol'zovaniem otkhodov promyshlennogo i sel'skokhozyaistvennogo proizvodstva. Chast'. 2. Udalenie ionov khroma otkhodami promyshlennogo proizvodstva. Voda i ekologiya: problemy i resheniya. 4, s. 59-72.
7. Shaikhiev I.G., Minligulova G.A. (2011) Ochistka vodnykh ob'ektov ot ionov khroma s ispol'zovaniem otkhodov promyshlennogo i sel'skokhozyaistvennogo proizvodstva. Chast'. 3. Udalenie ionov khroma otkhodami pererabotki sel'skokhozyaistvennogo syr'ya. Voda i ekologiya: problemy i resheniya. 1, s. 33-44.
8. Kumar P., Agnihotri R., Wasewar K.L., Uslu H., Yoo C.K. (2012) Status of adsorptive removal of dye from textile industry effluent. Desalination and water treatment. 50 (1-3). pp. 226-244.
9. Geethakarathi A., Phanikumar B.R. (2011) Industrial sludge based adsorbents/ industrial byproducts in the removal of reactive dyes – A review. Int. J. of Water Resources and Environ. I Eng. 3(1), pp. 1-9.
10. Sobgaida N.A., Ol'shanskaya L.N. Sorbenty dlya ochistki vod ot nefteproduktov. Saratov: SGTU, 2010. 108 s.
11. Zhivetin V.V., Ginzburg L.N., Ol'shanskaya O.M. Len i ego kompleksnoe ispol'zovanie. M.: Inform-Znanie, 2002. 400 s.
12. Elinson I.S. (1998) Sintez i svoystva novykh sorbtsionnykh materialov na osnove l'nyanoi kostry. Trudy 3 nauchno-tekhn. konf. «Resursosberegayushchie i ekologicheskie chistye tekhnologii», Grodno. s. 169-174.
13. Nikiforova T.E. (2009) Sorbtsionnye svoystva i priroda vzaimodeystviya tsellyulozosoderzhashchikh polimerov s ionami metallov. Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 1. s. 5-14.
14. Gusev S.S., Ermolenko I.N. (1966) Chastoty karboksilatnykh ionov i struktura solei karboksilsoderzhashchikh polisakharidov. Izvestiya AN BSSR. Seriya khimicheskie nauki. 4. s. 105-107.
15. Grunin Yu.B., Ivanova V.L. (1985) Kharakter vzaimodeystviya v sisteme «tsellyuloza – vodnyi rastvor elektrolita». Bumazhnaya promyshlennost'. 2. s. 10-11.

УДК 628.543

Льняная костра в качестве биосорбента для удаления ионов тяжелых металлов из модельных сточных вод

Ildar G. Shaikhiev

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Российская Федерация
Ул. К. Маркса, 68, Казань, 420015
Заведующий кафедрой Инженерной экологии, доктор технических наук
E-mail: ildars@inbox.ru

Аннотация. Исследована возможность использования льняной костры – отхода льнопереработки в качестве сорбционного материала для извлечения ионов тяжелых металлов из модельных сточных вод. Показано, что обработка льняной костры растворами кислот малой концентрации способствует увеличению площади поверхности льняной костры и, соответственно, сорбционной емкости по ионам тяжелых металлов. Определены значения максимальной сорбционной емкости по ионам Fe(III), Co(II), Ni(II) и Zn(II) в статических и динамических условиях. Методом ИК-спектроскопии показано, что наряду с физической сорбцией протекает процесс хемосорбции.

Ключевые слова: льняная костра; ионы тяжелых металлов; удаление; кислотная обработка; сорбционная емкость.