



Биолог. журн. Армении, 2 (70), 2018

## ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ СРЕДИ КУЛЬТУР ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Б.А. АРУТЮНЯН

Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА,  
лаборатория альтернативных источников энергии  
*Baghish91@mail.ru*

Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выявлены продуценты 5-аминолевулиновой кислоты среди культур пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий. Показано, что в жидкой питательной среде Ормеруда при стандартных условиях культивирования штаммы *Rhodobacter capsulatus* В-6508, *Rh. sphaeroides* В-6509, *Rh. sphaeroides* В-6511 и *Rh. palustris* В-6506 синтезируют 2,5, 13,0, 1,8 и 13,3 мг/л 5-аминолевулиновой кислоты, соответственно.

*Фотосинтезирующие бактерии – 5-аминолевулиновая кислота – синтез – ВЭЖХ*

Բարձր արդյունավետության հեղուկային բրոմատոգրաֆիայի (ԲՎՋԶ) մեթոդով հայտնաբերվել են 5-ամինալևուլինաթթվի արտադրիչ հանդիսացող ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաներ՝ *Rhodobacter capsulatus* В-6508, *Rh. sphaeroides* В-6509, *Rh. sphaeroides* В-6511 և *Rh. palustris* В-6506, որոնք ստանդարտ կուլտիվացման պայմաններում Օրմերուդի հեղուկ սննդամիջավայրում սինթեզել են համապատասխանաբար 2,5, 13,0, 1,8 և 13,3 մգ/լ 5-ամինալևուլինաթթու:

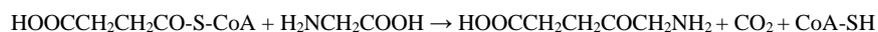
*Ֆոտոսինթեզող բակտերիաներ – 5-ամինալևուլինաթթու – սինթեզ – ԲՎՋԶ*

Methods of high-performance liquid chromatography (HPLC) revealed producers of 5-aminolevulinic acid among cultures of purple non-sulfur photosynthesizing bacteria. It was shown that strains of *Rhodobacter capsulatus* В-6508, *Rhodobacter sphaeroides* В-6509, *Rhodobacter sphaeroides* В-6511 and *Rhodospseudomonas palustris* В-6506 under standard cultivation conditions synthesized, respectively, 2.5, 13.0, 1.8 and 13.3 mg/L of 5-aminolevulinic acid in the Ormerod liquid nutrient medium.

*Photosynthetic bacteria – 5-aminolevulinic acid – synthesis – HPLC*

δ-Аминолевулиновая кислота (дельта- или 5-аминолевулиновая кислота, 5-АЛК, C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>3</sub>) является эндогенным соединением – биологическим предшественником порфиринов у живых организмов и растений.

Известны два пути биосинтеза 5-АЛК. У нефотосинтезирующих организмов (животных, грибов и простейших) 5-АЛК образуется под действием пиридоксаль-фосфатзависимого фермента 5-аминолевулинатсинтазы из глицина и сукцинил-СоА в результате реакции, известной как путь Шемина:



У растений, водорослей, бактерий (кроме группы  $\alpha$ -протеобактерий) и архей 5-АЛК образуется из глутаминовой кислоты через промежуточные глутамил-тРНК и глутамат-1-полуальдегид. В синтезе участвуют ферменты глутамил-тРНК-синтаза, глутамил-тРНК-редуктаза, глутамат-1-полуальдегидаминотрансфераза. Реакция известна как C<sub>5</sub>-путь или путь Биля [7].

Очевидная перспективность использования 5-АЛК обусловила выраженный интерес к ее производству во многих странах мира. Так, например, 5-АЛК предложено применять в качестве стимулятора роста растений и гербицида [2]. Кроме того, 5-АЛК способна накапливаться в клетках опухоли, превращаясь в протопорфин IX - фотосенсибилизатор, генерирующий синглетный кислород при облучении видимым светом. Поэтому 5-АЛК предложено применять для фотодиагностики и фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей различной локализации, а также для лечения кожных заболеваний неопухоловой природы [14]. Особый интерес вызывает возможность использования 5-АЛК-индуцированной флюоресценции для интраоперационной диагностики местной распространенности злокачественного опухолевого процесса и последующего контроля за эффективностью специфического лечения.

Известен ряд синтетических методов получения этого продукта. Наиболее частым синтетическим предшественником 5-АЛК является эфир 5-бромлевулиновой кислоты [8, 10]. Несмотря на сложности с получением бромпроизводных, эти методы не утратили своей актуальности по настоящее время и даже получили свое дальнейшее развитие [4, 18, 19].

Биологический способ получения 5-АЛК является альтернативным, поскольку является менее затратным по сравнению с химическим синтезом. Пурпурные несерные фотосинтезирующие бактерии (роды *Rhodobacter*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*), наряду с рядом других микроорганизмов, способны накапливать и в коммерчески рентабельных количествах выделять в питательную среду 5-аминолевулиновую кислоту. Одним из эффективных продуцентов 5-АЛК в настоящее время считается *Rhodobacter sphaeroides*, выход целевого продукта у которого колеблется в пределах от 0,26 до 2 мМоль на литр [6, 9, 15].

Настоящая работа посвящена сравнительной характеристике синтеза 5-АЛК у некоторых диких штаммов пурпурных несерных фотосинтезирующих *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospseudomonas palustris* в стандартных условиях культивирования культур.

**Материал и методика. Отбор штаммов.** Отбор штаммов *Rhodobacter capsulatus* ИНМИА В-6508, *Rhodobacter sphaeroides* ИНМИА В-6509 и ИНМИА В-6511, *Rhodospseudomonas palustris* ИНМИА В-6506 из коллекции культур лаборатории обусловлен предварительным анализом многочисленных литературных данных, подтверждающих перспективность исследования этих культур в качестве потенциальных продуцентов 5-аминолевулиновой кислоты.

Питательные среды. Культуры пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий выращивали на жидкой питательной среде Ормеруда состава (г/л): MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0.2, CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O – 0.08, FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0.01, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.6, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1.25, ЭДТА – 0.02, Na-малат – 2.0, дрожжевой экстракт – 0.1, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0.028, MnSO<sub>4</sub> x 4H<sub>2</sub>O – 0.021, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 0.075, ZnSO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 0.0024, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 3H<sub>2</sub>O – 0.01, pH 6.8-7.3 [13].

**Условия культивирования штаммов.** Культуры выращивали в 0,1 л колбах Эрленмейера (рабочий объем 0,03 л), в микроаэрофильных условиях, при освещении 2000 лк и температуре 28<sup>0</sup>С, в стационарной фазе роста в течение 15 сут.

**Тонкослойная хроматография (ТСХ).** Образцы проб, предположительно содержащие аминокислоты и 5-АЛК, разделяли на тонкослойных хроматографических пластинках с силикагелем (Sorbfil) в хроматографической системе *n*-бутанол-вода-уксусная кислота в соотно-

шении 12:5:3. Искомые соединения проявляли опрыскиванием пластинок 0,2%-ным раствором нингидрина в бутаноле с последующим прогреванием в сушильном шкафу при 100<sup>0</sup>С в течение 1 мин. Хроматографическую подвижность 5-АЛК и ее липофильных эфиров определяли посредством кохроматографии с аутентичными свидетелями. Присутствие 5-АЛК в соответствующих фракциях супернатанта определяли качественной реакцией с помощью модифицированного реактива Эрлиха [3].

*Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).* Дериватизацию образцов проводили согласно протоколу [17]. ВЭЖХ выполняли в модификации по S. Namjoshi *et al.*, 2007 [11] на высокоэффективном жидкостном хроматографе „Waters“ (Separation Module 2695), снабженном флуоресцентным детектором. Разделение проб осуществляли на колонке „Altima“ C18, 5  $\mu$ m, 250 мм x 4.6 мм. Интеграцию проводили с помощью программного обеспечения „Empower<sup>®</sup>“. Элюирование проб выполняли при комнатной температуре, скорость потока элюента – 1 мл/мин, детектирование проводили при длине волны 350 нм /440 нм. В качестве подвижной фазы использовали А: ацетонитрил (0,1% TFA) – 30% и В: вода (0,1% TFA), в соотношении А:В – 30% : 70%, соответственно [12]. В качестве стандарта анализируемой пробы использовали коммерческий реагент гидрохлорида 5-аминолевулиновой кислоты (Sigma-Aldrich). Объем инжестируемой пробы – 10 мкл. Концентрации 5-АЛК в исследуемых пробах оценивали, согласно предварительно подготовленной калибровочной кривой.

**Результаты и обсуждение.** Пурпурные фотосинтезирующие бактерии – небольшая группа (около 30 видов) граммотрицательных одноклеточных эубактерий, большинство из которых обладают подвижностью, благодаря наличию жгутикового аппарата. Все представители пурпурных бактерий способны к росту в анаэробных условиях в присутствии света и углекислого газа как источника углерода, используя в качестве доноров электронов восстановленные соединения серы, органические соединения, водород.

В наших исследованиях мы изучали представителей пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий видов *Rhodobacter capsulatus* ИНМИА В-6508, *Rhodobacter sphaeroides* ИНМИА В-6509 и ИНМИА В-6511, *Rhodopseudomonas palustris* ИНМИА В-6506, ранее выделенных в нашей лаборатории из различных источников минеральных вод Армении [1].

Поскольку пурпурные несерные бактерии особенно активно развиваются в фотоорганогетеротрофных условиях, то наиболее оптимальной питательной средой, как для их поддержания и хранения, так и культивирования, является жидкая среда, предложенная Ормерудом в 1961 году [13], где в качестве основного источника углерода присутствует натриевая соль яблочной кислоты в количестве 2,0 г/л. При этом контроль над накоплением биомассы бактерий осуществляли спектрофотометрическими методами исследований при длине волны  $\lambda=520$  нм. Тем не менее, при аналогичных условиях выращивания (освещенность 2000 лк, температура – 28<sup>0</sup>С, среда Ормеруда, длительность, период инкубации 15 сут) отобранные культуры, в силу своих штаммовых различий, проявляли различную динамику накопления биомассы, как показано на рис. 1.

Таким образом, согласно полученным данным (рис. 1), за один и тот же период времени культуры *Rhodobacter capsulatus* В-6508 и *Rhodopseudomonas palustris* В-6506 накапливают биомассу гораздо интенсивнее, чем штаммы культур *Rhodobacter sphaeroides* В-6509 и В-6511.

Дальнейшие исследования были направлены на обнаружение 5-аминолевулиновой кислоты в жидкой питательной среде Ормеруда в процессе культивирования диких штаммов пурпурных несерных бактерий *Rhodobacter capsulatus* В-6508, *Rhodobacter sphaeroides* В-6509, В-6511 и *Rhodopseudomonas palustris* В-6506.

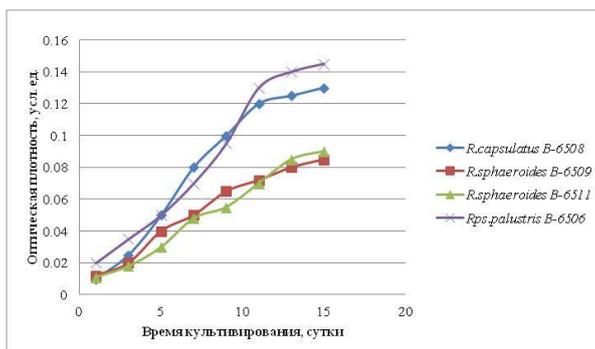


Рис. 1. Кривые роста культур несерных фотосинтезирующих бактерий

С этой целью на первом этапе были подготовлены калибровочные растворы химически чистого коммерческого гидрохлорида 5-аминолевулиновой кислоты [Sigma-Aldrich] для построения калибровочной кривой и определения концентраций вещества в экспериментальных пробах калориметрическим методом Эрлиха (рис. 2) [16].

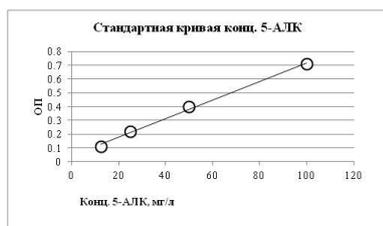


Рис. 2. А – Калибровочная кривая для расчета концентрации 5-АЛК, определяемая калориметрическим методом Эрлиха (спектрофотометр,  $\lambda=553$  нм), В – Окрашивание образца с известными концентрациями 5-АЛК после реакции Эрлиха (слева направо: 200 мг/л; 100 мг/л; 90 мг/л; 70 мг/л; 50 мг/л; 25 мг/л; 15 мг/л).

Экспресс-анализ, направленный на предварительное определение присутствия 5-аминолевулиновой кислоты в экспериментальных пробах культуральных жидкостей, проводили методом тонкослойной хроматографии [3]. На рис. 3. визуализированы результаты ТСХ-анализа коммерческого реагента гидрохлорида 5-АЛК и культуральной жидкости на примере штамма *Rhodobacter sphaeroides* B-6509.

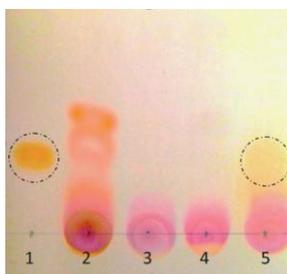
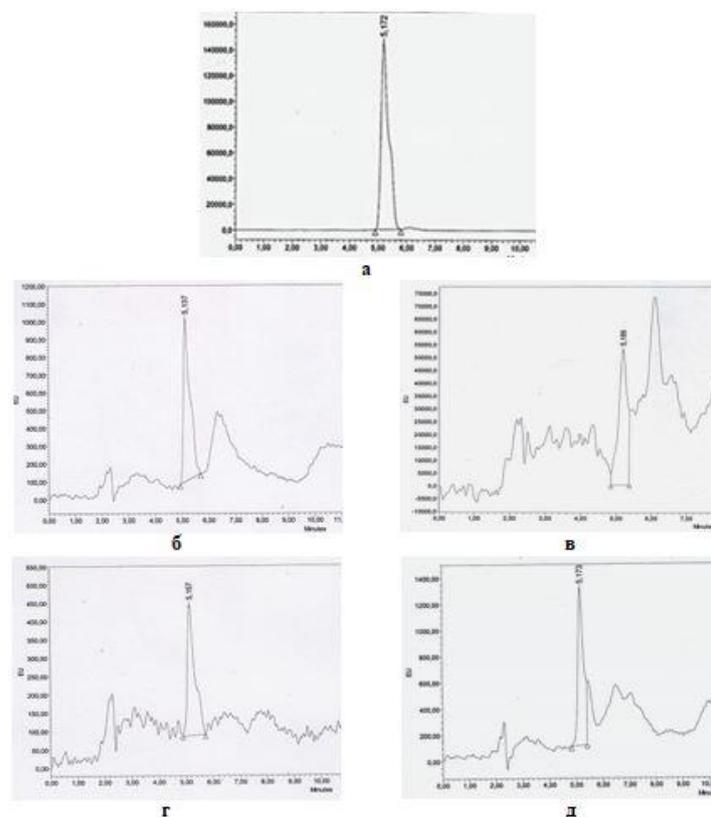


Рис. 3. Визуализация 5-АЛК методом тонкослойной хроматографии  
 1. Контроль: коммерческий реагент 5-АЛК, х.ч.а. 2. Контроль: смесь белковых аминокислот (валин, метионин, пролин, фенилаланин). 3. Контроль: среда Ормеруда. 4. Продукт метаболизма *R. sphaeroides* шт. Pб-017. 5. Продукт метаболизма *R. sphaeroides* B-6509.

На ТС хроматограмме (рис. 3) видно, что метка №1 (коммерческий реагент гидрохлорида 5-АЛК) и метка №5 (продукт метаболизма *R.sphaeroides* В-6509) реагируют с реагентом Эрлиха, обуславливающим желто-оранжевое окрашивание 5-АЛК в случае, если последняя присутствует в исследуемой пробе. Между тем, именно наличие нитрогруппы у 5-АЛК, в отличие от используемых в качестве контроля белковых аминокислот (метка 2), обеспечивает взаимодействие с реагентом Эрлиха и подтверждает специфичность реакции для визуального экспресс обнаружения 5-АЛК в биологических жидкостях.

ВЭЖХ-анализ показал, что время выхода 5-АЛК на хроматограммах в среднем составляет 316 сек. (рис. 4а). Исследуемое вещество хорошо детектируется, что позволяет использовать данный метод как для целей идентификации, так и количественной оценки содержания 5-АЛК в продуктах метаболизма исследуемых культур пурпурных бактерий.

Одновременно после соответствующей предварительной обработки к анализу были подготовлены продукты метаболизма (культуральная жидкость) отобранных культур – потенциальных продуцентов 5-АЛК *Rhodobacter capsulatus* В-6508, *R.sphaeroides* В-6509 и В-6511, *Rhodopseudomonas palustris* В-6506. На рис. 5 (а, б, в, г) представлены ВЭЖХ-анализы метаболитов указанных штаммов, из которых видно, что объекты исследований содержат 5-АЛК аналогично стандарту.



**Рис. 4.** а - ВЭЖХ-хроматограмма стандартного образца гидрохлорида 5-АЛК (конечная концентрация 2 мг/л), ВЭЖХ-хроматограмма культуральных жидкостей пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий (б – *R.sphaeroides* В-6509; в – *R.sphaeroides* В-6511; г – *R. capsulatus* В-6508; д – *Rhodopseudomonas palustris* В-6506)

С использованием полученных данных (рис. 4. – б, в, г, д) были рассчитаны значения концентраций 5-аминолевулиновой кислоты (табл. 1).

**Таблица 1.** Концентрации 5-АЛК в культуральных жидкостях пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий, выращенных на среде Ормеруда

№	Штамм-продуцент 5-АЛК	Концентрация 5-АЛК в культуральной жидкости, мг/л	Время удержания пробы, с
1.	<i>R.sphaeroides</i> B-6509	13,0	313,7
2.	<i>R.sphaeroides</i> B-6511	1,8	318,6
3.	<i>R.capsulatus</i> B-6508	2,5	315,7
4.	<i>Rps.palustris</i> B-6506	13,3	317,3

Таким образом, установлено, что изученные штаммы пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий, культивированные на жидкой среде Ормеруда, в стандартных условиях выращивания синтезируют 5-аминолевулиновую кислоту. Наилучшими продуцентами по результатам анализа являлись культуры *R.sphaeroides* B-6509 и *Rps.palustris* B-6506, синтезирующие 13 и 13,3 мг/л 5-АЛК. Эти штаммы отобраны нами для дальнейших исследований, направленных на увеличение выхода целевого продукта.

Исследование выполнено при поддержке ГКН МОН РА в рамках научного проекта №16А-1f37.

Автор выражает благодарность заведующему Лабораторией очистки и сертификации биологически активных соединений НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, к.х.н. А. Цатуряну за помощь в проведении ВЭЖХ-анализов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Պարոնյան Ա.Խ. «Հայաստանում տարածված ֆոտոսինթետիկ բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկությունները և նրանց կիրառման հեռանկարները», Երևան, «Գիտություն», 296, 76-82, 2010:
2. Европейский патент, EP №514776, 1992.
3. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования, под ред. Биргера М.О., М., с. 191, 1982.
4. Тростянка И.В., Долгопалец В.И., Кисель М.А., Лахвич Ф.А. Препаративные методы синтеза 5-аминолевулиновой кислоты. Вести НАН Беларуси, №1, Серия химических наук, 77-82, 2009.
5. Уайт А. Основы биохимии, М., 1, с., 43, 108; 2, с. 964, 1981.
6. Anderson, T., Briseid, T., Nesbakken, T., Ormerod, J., Sirevaag, R. and Thorud, M. Mechanism of synthesis of 5-aminolevulinic acid in purple, green and blue-green bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 19, 303-306, 1983.
7. Beale, S. “Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigment Precursor, delta-Aminolevulinic Acid, from Glutamate”. Plant Physiol., 93, 4, 1273-9, 1990.
8. Ha, H.J., Lee, S.K., Ha, Y.J., Park, J.W. Synth. Commun., 24, 18, 2557- 2562, 1994.
9. Ishii, K., Hiraishi, A., Arai, T., Kitamura, H. Light dependent porphyrin production by suspended and immobilized cells of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Ferment. Bioeng., 60, 26-32, 1990.
10. Morton, H.E., Leanna, M.R. Tetrahedron Lett., 34, 28, 4481-4484, 1993.

11. *Namjoshi, S., Caccetta, R., Edwards, J., Benson, H.* Liquid chromatography assay for 5-aminolevulinic acid: application to *in vitro* assessment of skin penetration via dermaportation. *J. Chromatography B*, 852, issue 1-2, pp. 49-55, 2001.
12. *Oishi, H., Nomiyama, H., Tomokuni, K.* Fluorometric HPLC determination of delta-aminolevulinic acid (ALA). *J. Anal. Toxicol.*, 20, 106-110, 1996.
13. *Ormerod, J.G. Ormerod, K.S., Gest, H.* Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 94, p. 449. 1961.
14. *Peng, Q., Berg, K., Moan, J.* 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer*, 79, 12, 2282-2308, 1997.
15. *Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., Hayashi, M.* Enhanced production of 5-aminolevulinic acid by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 403-406, 1991.
16. *Sato, K., Ishida, K., Shirai, M., Shimizu, S.* Occurrence and some properties of two types d-aminolevulinic acid synthase in a facultative methylotrophe, *Protaminobacter ruber*. *Agricultural and biological chemistry*, 49, 3423-3428, 1981.
17. *Suwansaard, M.* Production of Hydrogen and 5-Aminolevulinic Acid by Photosynthetic Bacteria from Palm Oil Mill Effluen. PhD Thesis, 2010, 237 pp.
18. US Pat. 5907058; *Chem. Abstrs.*, 130, 352547. 1999.
19. US Pat. 6583317; *Chem. Abstrs.*, 136, 340394. 2002.

*Поступила 19.02.2018*