



Перспективы получения 5-аминолевулиновой кислоты микробиологическим способом

Виген Гогинян

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА
ЛАБОРАТОРИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭНЕРГИИ

Ереван, 2023

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛАБОРАТОРИИ

- Изучение биоразнообразия фотосинтезирующих микроорганизмов (микроводоросли, цианобактерии, пурпурные фотосинтезирующие бактерии. Систематика. Вторичный метаболизм. Коллекция культур.
- Изучение биоразнообразия симбиотических (клубеньковых) азотфиксирующих бактерий родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* и др. Коллекция культур.
- Возобновляемые источники биомассы для производства биотоплив (дизель, водород) и ценных биологически активных соединений (липиды, жирные кислоты, белки, аминокислоты, углеводы, пигменты).
- Утилизация отходов производств, очистка сточных вод.
- Биологические удобрения. Восстановление засоленных почв.

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ЛАБОРАТОРИИ

Пурпурные несерные фотосинтезирующие бактерии (около 70 штаммов)

Rhodospirillum rubrum
Rhodopseudomonas palustris
Rhodoblastus acidophilus
Rhodobacter sphaeroides
Rba. capsulatus
Rba. azotoformans
Rba. maris
Rba. viridis
Rba. azollae
Rba. johrii
Rhodobacter sp.

Микроводоросли (свыше 30 культур)

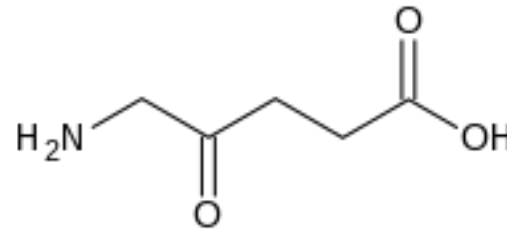
Auxenochlorella protothecoides
Auxenochlorella pyrenoidosa
Chlamydomonas reinhardtii
Chlorella vulgaris
Chlorococcum acidum
Coelastrella terrestris
Dunaliella peircei
Graesiella emersonii
Haematococcus sp.
Microchloropsis gaditana
Nannochloropsis oceanica
Neochloris oleoabundans

Parachlorella kessleri
Porphyridium cruentum
Scenedesmus obliquus
Scotiellopsis reticulata

Цианобактерии (свыше 10 штаммов)

Arthrospira platensis
Limnospira maxima
Synechocystis sp.
Nostoc sp.

5-АМИНОЛЕВУЛИНОВАЯ КИСЛОТА



Что это?

- Эндогенная небелковая аминокислота,
- ключевой предшественник биосинтеза циклических (хлорофиллы, гем, корриноиды) и линейных (билины, фикобилины) тетрапиррольных соединений,
- играет важную роль в метаболизме у растительных, животных и бактериальных организмов.

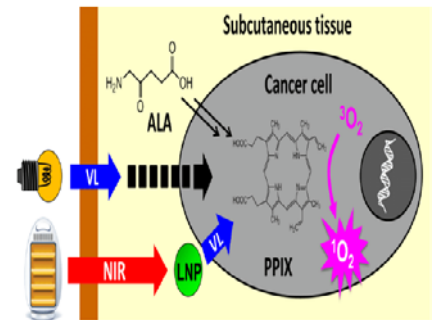
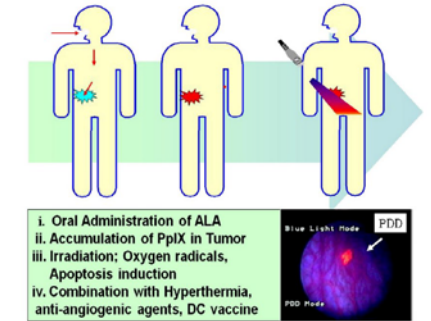
Применение:

- **В медицине.** Одобрен в качестве препарата для прогнозирования / диагностики / лечения злокачественных опухолей (US FDA, 2017)..

Как работает? Поглощается клетками и действует как фотосенсибилизирующий агент. В частности, на поверхности кожи под воздействием света, фотосенсибилизирующий агент активируется и вступает в реакцию с кислородом в клетках. Образующиеся реактивные формы кислорода усиливают окислительный стресс и селективно нейтрализуют патологические клетки.

- **В сельском хозяйстве.** Являясь легко разлагаемым соединением, широко используется как гербицид, инсектицид и стимулятор роста растений, повышает их устойчивость к засоленным почвам и низким температурам.
- **В косметике.** Средство от выпадения волос.

PDD & PDT

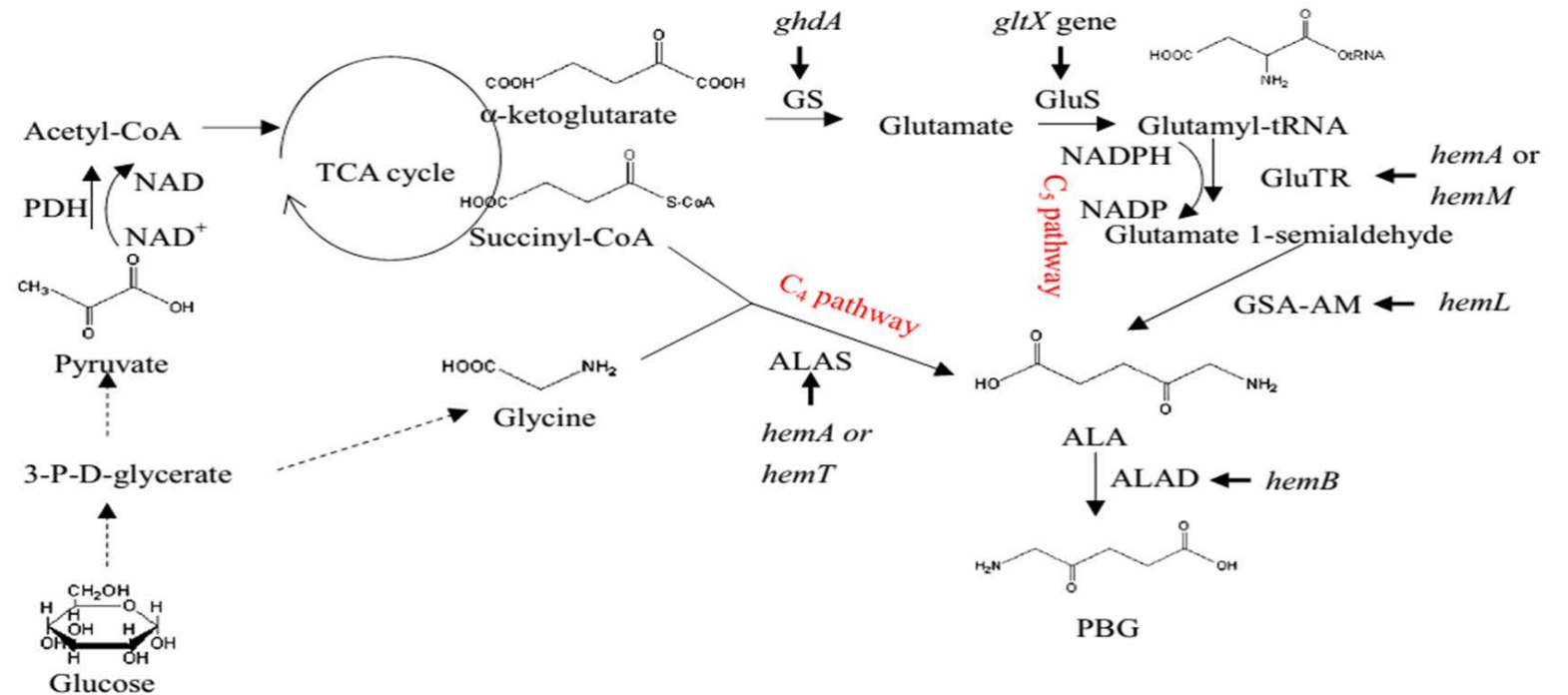


ПУТИ БИОСИНТЕЗА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Путь C4 (путь Шемина) – выражен у животных, дрожжей, простейших и пурпурных фотосинтезирующих бактерий.

Биосинтез протекает под действием пиридоксальфосфат-зависимого фермента δ-аминолевулинатсинтазы из глицина и сукцинил-КоА

Митохондриальный синтез



Путь C5 - присутствует у высших растений, водорослей и многих бактерий. Образуется из глутаминовой кислоты через промежуточные глутамил-тРНК и глутамат-1-полуальдегид.

ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель:

Конструирование рекомбинантных цианобактериальных штаммов *Synechocystis* PCC 6803 как перспективных продуцентов 5-аминолевулиновой кислоты, с использованием гена *hemA* из пурпурной несерной фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides* MDC¹ 6510.

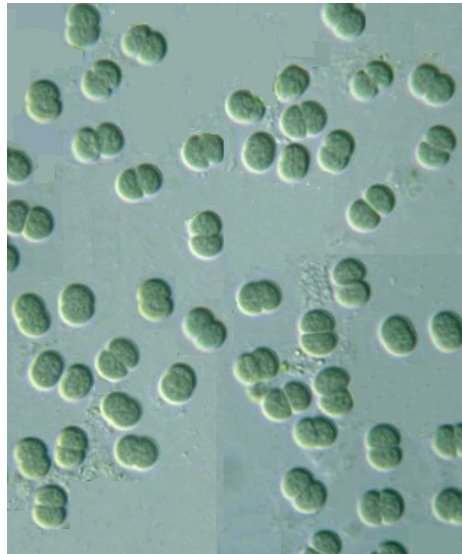
Задачи:

- Дизайн специфических олигонуклеотидов для амплификации генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе 5-аминолевулиновой кислоты. Формирование генетических конструкций, содержащих интересующие гены.
- Трансформация компетентных клеток-реципиентов для получения рекомбинантных штаммов *Synechocystis*, синтезирующих 5-аминолевулиновую кислоту.
- Изучение биологических свойств полученных генно-инженерным путем штаммов.
- Изучение влияния различных факторов (составы питательных сред, pH, t⁰C, период культивирования и др.) на синтез 5-аминолевулиновой кислоты.

¹ MDC (Microbial Depository Center) – акроним Национальной Коллекции культур микроорганизмов НПЦ «Армбиотехнология» НАН.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Synechocystis sp. PCC (Pasteur Culture Collection (PCC), Paris, France) 6803 – одноклеточная азот не фиксирующая пресноводная цианобактерия.

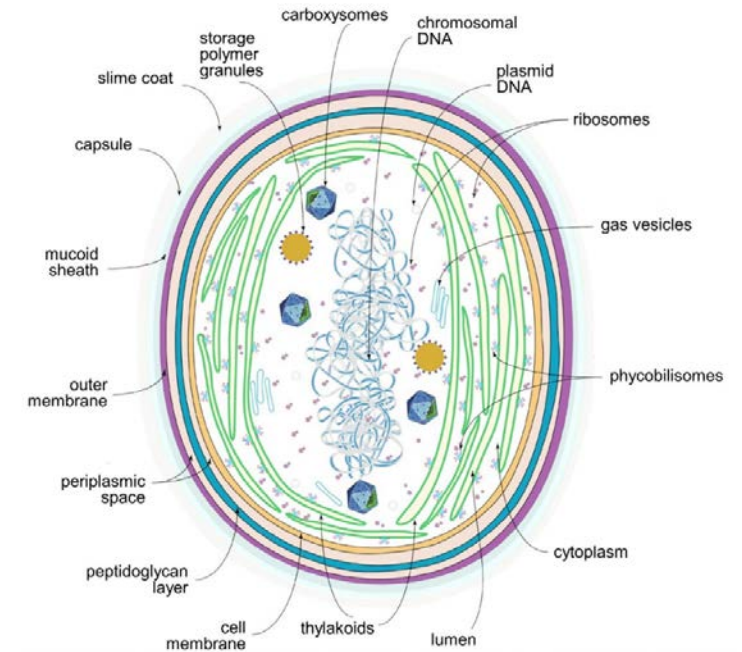


Rhodobacter sphaeroides MDC 6510 – пурпурная несерная фотосинтезирующая бактерия. Выделена из минерального источника Джермук, Армения [Малатян и др., 1982). Источник гена *hemA*. Природный продуцент 5-аминолевулиновой кислоты [Арутюнян, 2018; Гогинян и др., 2021]

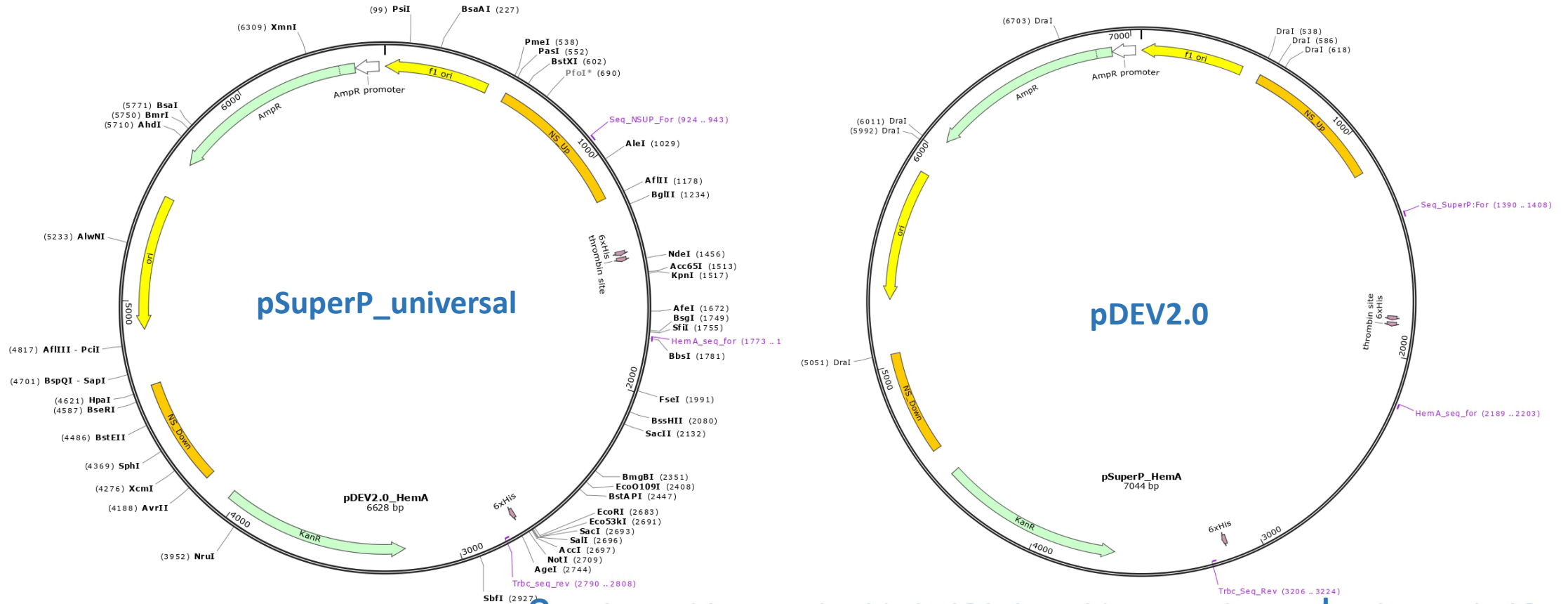


Почему *SYNECHOCYSTIS*?

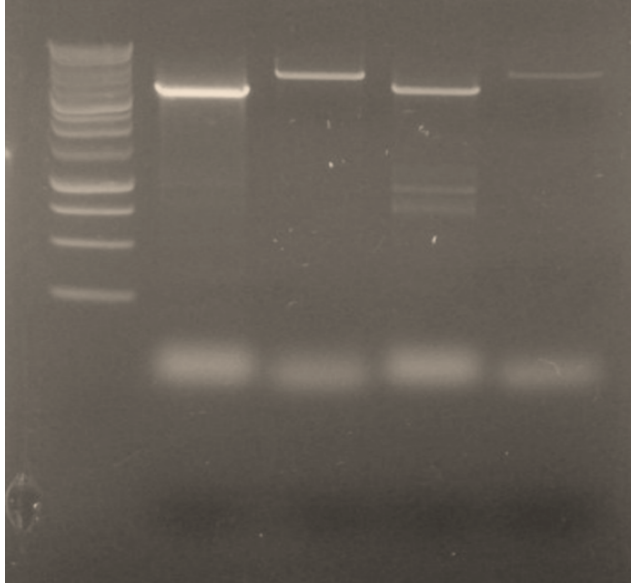
- Один из наиболее изученных и применимых в исследованиях модельных организмов.
- Первая фотоавтотрофная цианобактерия, чей геном полностью секвенирован. Содержит кольцевую хромосому (размеры: 3,6 МБ) с семью эндогенными плазмидами.
- Полиплоидный организм - клетка содержит 12 - 200 хромосом.
- Способен к росту не только в автотрофных, но и миксо- и гетеротрофных условиях в присутствии источника органического углерода.
- Естественно компетентный и легко трансформируемый организм, заранее предрасположенный к генетическим модификациям [Григорьева, Шестаков, 1982].



ВЕКТОРА ПЛАЗМИД: pSuperP_universal и pDEV2.0, сконструированные для экспрессии гетерологичных белков в *Synechocystis* (Elisabetta Bergantino, 2021).

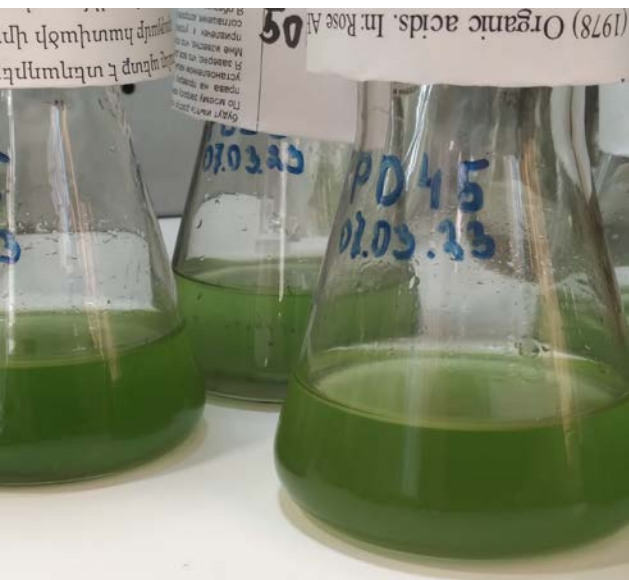


Олигонуклеотидные последовательности для амплификации генов hemA из *Rba. sphaeroides*: hemA_up TGG CCG ATT GAC GCA GGG AC и hemA_down TTT ACC CCG GCC GGT TGC TT.



ОТБОР ПОЗИТИВНЫХ КЛОНОВ *SYNECHOCYSTIS*

- Выделение гена *hemA* из *Rba. sphaeroides*, его амплификация и секвенирование.
- Применение двух различных векторов pSuperP и pDEV2.0 для клонирования гена *hemA* в *Synechocystis* sp. PCC 6803.
- Конструирование и трансформация векторов pSuperP_*hemA* и pDEV2.0_*hemA*, несущих гены *hemA* в *Synechocystis* sp. PCC 6803.
- Отбор и субклонирование положительно рекомбинированных колоний для достижения гомоплазии на питательной среде BG-11 (blue-green) с канамицином.
- ПЦР-детерминация/контроль интеграции генов *hemA* в мутантные геномы.
- Отбор позитивных клонов, несущих вектора syn_pSuperP_*hemA* и syn_pDEV2.0_*hemA*.



СИНТЕЗ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПУРПУРНОЙ НЕСЕРНОЙ БАКТЕРИЕЙ *RVA. SPHAEROIDES* MDC 6510 В БИОРЕАКТОРАХ



Аэробное, без освещения

биомасса (г/л)	5-АЛК (г/л)
----------------	-------------

2,22

0,290

Условия выращивания:

рН - 7.0,

Температура - 30°C,

Скорость перемешивания – 400 об/мин,

Интенсивность освещения – 1800-2000 люкс.



Аэробное, с освещением

биомасса (г/л)	5-АЛК (г/л)
----------------	-------------

2,65

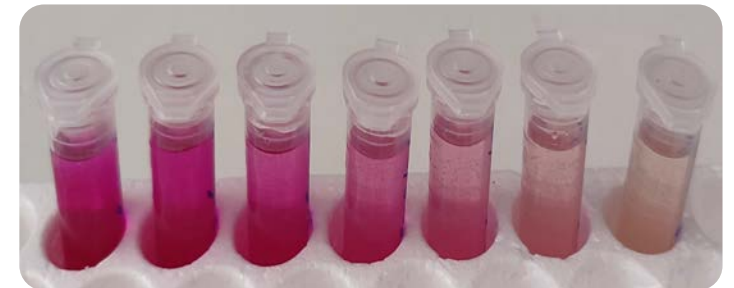
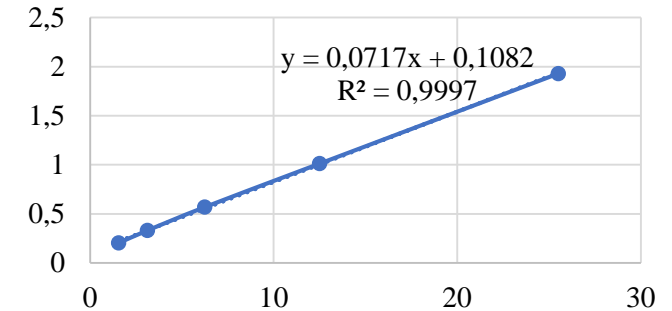
0,579

СИНТЕЗ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ *SYNECHOCYSTIS*

- Позитивные клоны выращивали в фотоавтотрофных и миксотрофных условиях. Миксотрофное выращивание проводили в присутствии 5 мМ глюкозы.
- Температура выращивания - 30°C, освещение – флюоресцентный белый свет (40 μM фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Оценку роста культуры проводили спектрофотометрически.
- По окончании экспоненциальной фазы роста в среду добавляли 30 мМ глицина, 30 мМ янтарной и 15 мМ левулиновой кислоты в качестве предшественника 5-АЛК и ингибитора АЛК-дегидратазы.
- Синтез 5-АЛК детектировали колориметрически с помощью модифицированного реактива Эрлиха.
- По результатам сравнительной характеристики клон №2 Syn_SP_hemA и клон №4 Syn_PD_hemA отобраны в качестве перспективных продуцентов 5-АЛК.

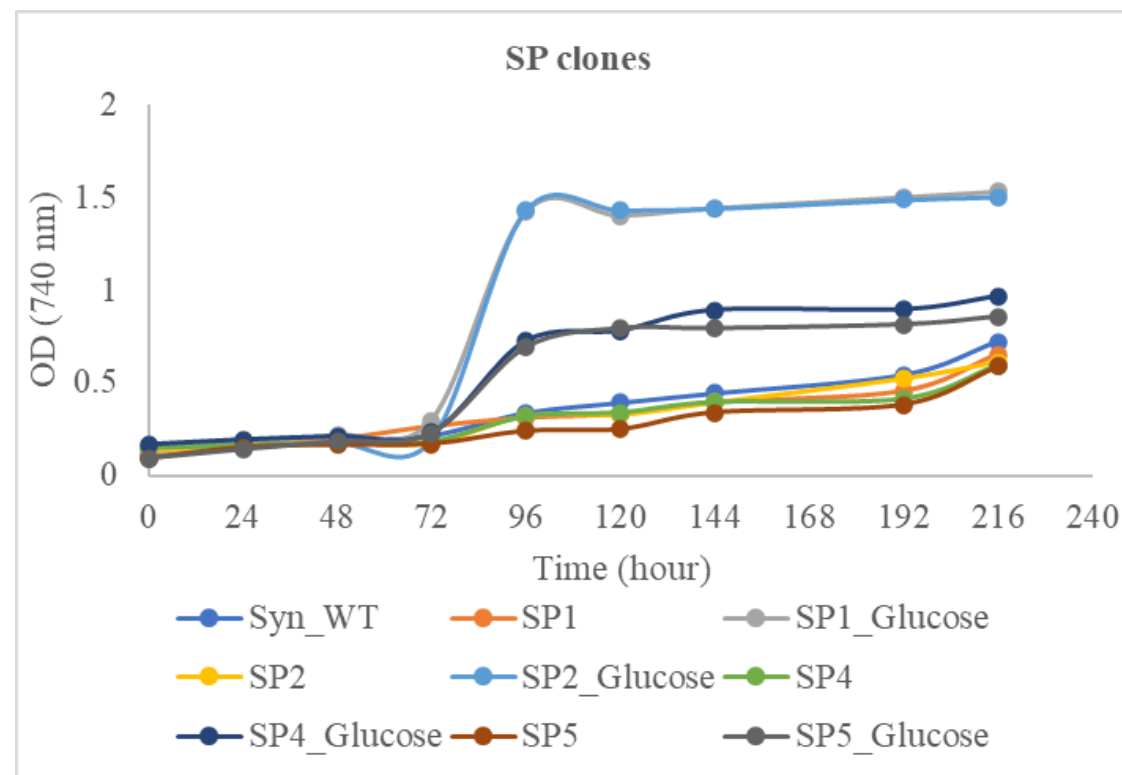
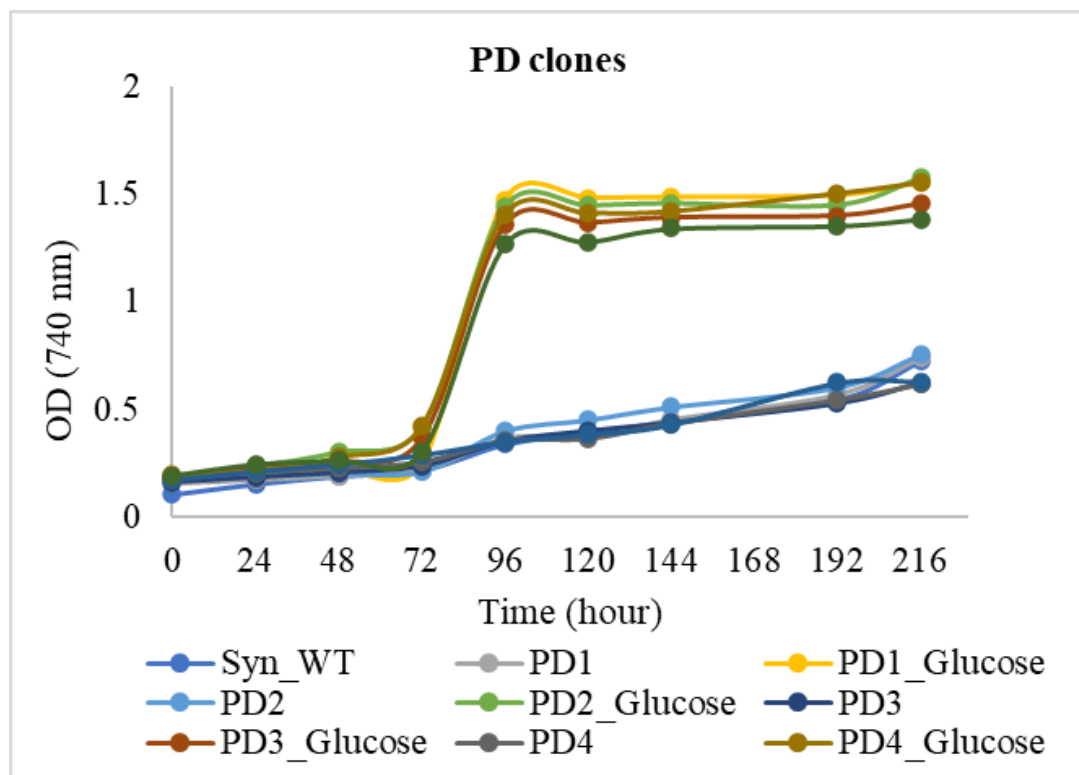


Стандартная кривая 5-АЛК



РОСТ КЛОНОВ SP И PD В ПРИСУТСТВИИ И БЕЗ ГЛЮКОЗЫ

Все клоны, культивируемые на питательной среде BG-11 в присутствии глюкозы накапливают большее количество биомассы.



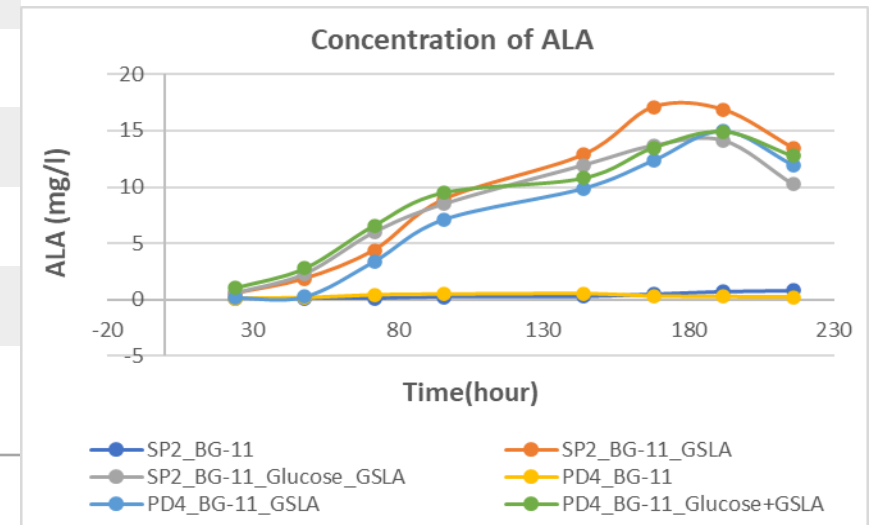
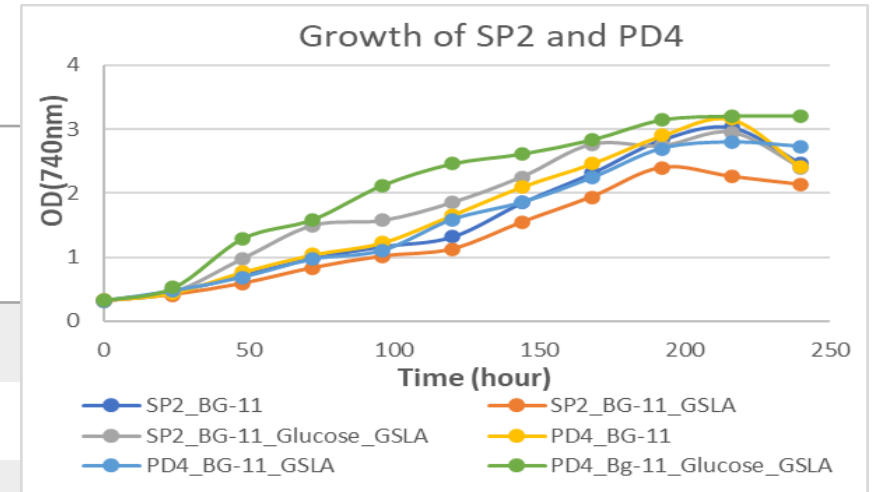
СИНТЕЗ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ КЛОНАМИ *SYNECHOCYSTIS*

Период культивирования, ч	Синтез 5-АЛК клоном SP2, мг/л					
	BG-11	BG-11 с GS	BG-11 с GSLA	BG-11 с Glu	BG-11 с Glu и GS	BG-11 с Glu и GSLA
24	0.352	6.710	3.197	0.441	1.883	5.405
48	1.228	7.534	5.830	1.526	1.662	9.165
72	1.207	6.788	8.856	1.875	2.743	12.899

Период культивирования, ч	Синтез 5-АЛК клоном PD4, мг/л					
	BG-11	BG-11 с GS	BG-11 с GSLA	BG-11 с Glu	BG-11 с Glu и GS	BG-11 с Glu и GSLA
24	0.296	0.337	0.039	0.619	0.626	1.275
48	0.410	0.649	0.844	0.750	0.828	2.600
72	1.239	1.379	4.342	1.455	1.449	2.901
96	1.208	1.500	7.330	1.416	1.492	6.750

СИНТЕЗ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ КЛОНАМИ *SYNECHOCYSTIS* ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Время, ч	SP2_В G-11	SP2_BG- 11_GSLA	SP2_BG- 11_Glucose_ GSLA	PD4_BG- 11	PD4_BG- 11_GSLA	PD4_BG- 11_Glucose + GSLA
24	0.114	0.5624	0.6253	0.1289	0.1658	1.0694
48	0.126	1.874	2.327	0.146	0.258	2.802
72	0.127	4.405	6.021	0.437	0.981	6.605
96	0.246	8.900	8.520	0.507	4.698	9.506
144	0.289	12.858	11.953	0.553	6.342	10.787
168	0.479	17.069	13.669	0.316	9.077	13.477
192	0.715	16.837	14.134	0.263	14.97	14.902
216	0.802	13.448	10.254	0.222	9.310	12.746



Научно-исследовательские проекты, выполняемые по текущей тематике

Республиканские

- 13РБ-043 (2014-16) «Экологические и биологические аспекты исследований микроводорослей и цианобактерий – продуцентов ненасыщенных жирных кислот под влиянием эфиров 5-аминолевулиновой кислоты» (рук.: В. Гогинян):
- 16А-1f37 (2016-17) «Изучение особенностей биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты фотосинтезирующими бактериями» (исп.: Б. Арутюнян):
- 18Т-1F118 (2018-20) «Исследование систематики и таксономической принадлежности культур пурпурных фотосинтезирующих бактерий» (рук.: В. Гогинян).
- 21Т-2I172 (2021-23) «Конструирование рекомбинантных цианобактериальных штаммов для производства 5-аминолевулиновой кислоты» (рук.: В. Гогинян).

Международные

- CA 21146 - Fundamentals and applications of purple bacteria biotechnology for resource recovery from waste (PURLEGAIN) (2022-26) (PI: V. Goginyan).
- Coimbra Group Scholarships Programme for Young Professors and Researchers from European Neighborhood (2021-22) “Possibility of construction of 5-aminolevulinic acid recombinant producers using cyanobacterium *Synechocystis* as host strains” (executor: В. Harutyunyan).
- HORIZON2020-MSCA-RISE-2015 (2016-2019) «People for the European bio-ENERgy mIX», Phoenix №690925 project (PI: V. Goginyan).



Благодарности:

Фонды:

- Комитет по науке МОНКР РА,
- HORIZON2020-MSCA-RISE EU Research and Innovation Funding Programme,
- Coimbra Group Scholarships Programme for Young Professors and Researchers from European Neighborhood,
- European Cooperation in Science and Technology, COST Action project 21146 - Fundamentals and applications of purple bacteria biotechnology for resource recovery from waste

Люди:

- Лаборатория альтернативных источников энергии НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА,
- Д.х.н. Кисель М.А., Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
- Prof. E. Bergantino, Department of Biology, University of Padova, Italy,
- Dr. M. Novak, Dr. M. Pavlecic, Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology, Department of Biochemical Engineering, University of Zagreb, Croatia.

Организация:

- Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН РА «Армбиотехнология» НАН РА.