

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ

УДК 547.466:547.057: 579.66

*А. Л. МИХАЛЬЧУК¹, Е. В. РУДАК¹, П. В. КУРМАН¹, С. В. БАБИЦКАЯ¹, М. А. КИСЕЛЬ¹,
Н. К. КАЛАНТАРЯН², Л. О. САГАТЕЛЯН², В. Б. ГОГИНЯН²***СИНТЕЗ АЛИФАТИЧЕСКИХ ЭФИРОВ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ ФОТОТРОФНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ***¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by,**²Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН Армении, Ереван, Армения*

Описан метод получения эфиров 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) с алифатическими спиртами (C1–C16). Определены температуры плавления, спектральные и хроматографические параметры полученных эфиров. Для гексилового эфира АЛК и более высших гомологов рассчитаны значения критических концентраций мицеллообразования (ККМ) в водном буферном растворе. Установлен стимулирующий эффект мицеллообразующих эфиров АЛК при концентрации 0,1 мМ на накопление сухой биомассы фототрофных микроводорослей *Chlorella* и *Scenedesmus obliquus* (106–182% к контролю).

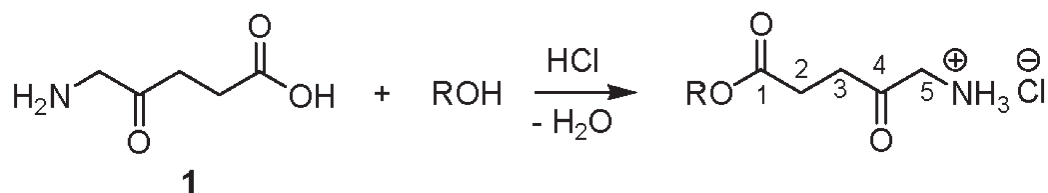
Ключевые слова: эфиры 5-аминолевулиновой кислоты, критическая концентрация мицеллообразования, микроводоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, выход биомассы.

*A. L. MIKHALCHUK¹, E. V. RUDAK¹, P. V. KURMAN¹, S. V. BABITSKAYA¹, M. A. KISEL¹,
N. K. KALANTARYAN², L. H. SAGHATELYAN², V. B. GOGINYAN²***SYNTHESIS OF ALIPHATIC ESTERS OF 5-AMINOLEVULINIC ACID
AND THEIR EFFECT ON THE PHOTOTROPHIC MICROALGAE GROWTH***¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by,**²Scientific and Production Center “Armbiotechnology” of the National Academy of Sciences of Republic of Armenia,
Yerevan, Armenia*

Method for preparation of 5-aminolevulinic acid (ALA) aliphatic esters with aliphatic alcohols (C1–C16) is described. Melting points, spectral parameters and chromatographic characteristics for the esters obtained have been determined. Critical micelle concentration values of ALA hexyl ester and higher homologs in aqueous buffered system have been estimated. The stimulatory effect of micelle forming ALA esters at 0.1 mM concentration on the accumulation of phototrophic microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus obliquus* dry biomass has been established (106–182% of the control).

Keywords: 5-aminolevulinic acid esters, critical micelle concentration, *Chlorella*, *Scenedesmus*, biomass yield.

Унікальнае хімічнае злучэнне 5-амінолевулінавая кіслота (АЛК) – біосінтэтычны прадшэственнік хлорофілла і гемопротеінаў сёння знаходзіць усё большае прымяненне ў медыцыне і сельскай гаспадарцы. Так, апрацоўка раслін растворамі АЛК аказвае стимуляруючае дзеянне на рост і уражайнасць сельскагаспадарчых культур [1–4]. Аднак яе эфектыўнасць абмяжоўваецца малой даступнасцю да клетак раслін з-за высокай гідрофільнасці АЛК, перашкоджаючай пранікненню малекулы праз ліпідны біслой клеточнай мембраны. У работах [5–7] было паказана, што АЛК у выглядзе эфиров з гексиловым і октиловым спиртамі лёгка встраіваецца ў раслінныя клеткі, у якіх магчыма яе высвободжэнне гідролазамаі. У лабараторных і мелкадэлячных эксперыментах на раслінах было ўстаноўлена, што прымяненне



при R = CH₃ (**2**); C₄H₉ (**3**); C₆H₁₃ (**4**);

C₈H₁₇ (**5**); C₁₀H₂₁ (**6**); C₁₂H₂₅ (**7**);

C₁₄H₂₉ (**8**); C₁₆H₃₃ (**9**)

гексилового эфира АЛК приводит к улучшению ряда вегетативных показателей, увеличению содержания хлорофилла, каротиноидов, белка и, в конечном итоге, повышению урожайности. При этом эффект достигается при концентрациях в 5 и более раз меньших, чем при обработке неэтерифицированной АЛК [5–7]. Мы предположили, что аналогичное действие эфиры АЛК могут оказывать на рост микроводорослей *Chlorella* и *Scenedesmus*, культивирование которых используется в сельском хозяйстве, в пищевой промышленности, парфюмерии, фармакологии, медицине и в других областях народного хозяйства [8]. Цель данной работы – получение эфиров АЛК с алифатическими спиртами разной длины углеводородной цепи и за счет этого отличающихся гидрофобно-гидрофильным балансом молекулы, изучение их физико-химических свойств и влияния на рост фототрофных микроводорослей *Chlorella* и *Scenedesmus*.

В литературе описаны методы получения эфиров АЛК с высшими алифатическими спиртами путем взаимодействия АЛК с избытком 1-октанола и более низших гомологов в присутствии хлористого тионила [9, 10]. Этерификация посредством хлористого тионила сопровождается выделением в окружающую среду эквивалентных количеств хлористого водорода и двуокиси серы. Умеренные выходы эфиров АЛК достигаются при использовании больших избытков спирта, которые необходимо удалять из реакционной среды, что является проблематичным в случае длинноцепочечных алканолов. При выполнении этих исследований мы разработали метод получения алифатических эфиров АЛК, заключающийся в конденсации гидрохлорида АЛК с 15–25%-ным мольным избытком выбранного спирта в присутствии каталитического количества (1–3%) концентрированной HCl при перемешивании с нагреванием до 65–105 °С и отводом выделяющейся воды. Выход целевых продуктов составил 72–92%, а непрореагировавшую АЛК практически полностью удается регенерировать при обработке реакционной смеси.

Структура полученных эфиров подтверждена с помощью ИК-спектроскопии, ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии (табл. 1) и хромато-масс-спектрометрии (табл. 2). В ИК-спектрах наблюдаются полосы поглощения при 3438, 2930, 1590 и 1730 см⁻¹, характерные для аминогруппы, метиленовых групп и карбонильных групп соответственно. Отнесения сигналов в спектрах ¹H и ¹³C ЯМР для АЛК и ее эфиров, приведенные в табл. 1, подтверждают структуру полученных эфиров АЛК. Следует отметить, что в спектрах соединений **7–9** наблюдается смещение сигналов C⁵H₂ и C³H₂ при карбонильной группе в область сильного поля на 0,26–0,31 м.д. и 0,23–0,26 м.д. соответственно, а для сигналов протонов алкильных групп такое смещение происходит только для эфира **9**. Наблюдаемое поведение спектрального отклика можно объяснить различиями в надмолекулярной структуре частиц в хлороформе, зависимой от гидрофобно-гидрофильного баланса молекул эфиров.

Установлено, что АЛК и ее эфиры **2** и **3** растворяются в воде, тогда как эфиры более высших спиртов (**4–9**) образуют мицеллярные структуры, для которых определена критическая концентрация мицеллообразования (ККМ). Вклад неполярной составляющей в проявление физико-химических свойств эфиров АЛК в водном растворе хорошо согласуется со значениями времен удерживания при высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) полученных эфиров на обращенно-фазовой колонке (табл. 2).

Т а б л и ц а 1. Положение сигналов ядер ^1H и ^{13}C в спектрах ЯМР 5-аминолевулиновой кислоты и ее эфиров

Группы	Соединения		
	1	2	3-9
^1H ЯМР спектры			
NH_3^+	–	5.16	8.17–8.28
C^5H_2	3.99	4.10	3.96–4.27
C^3H_2	2.376	2.83	2.74–2.91
C^2H_2	2.58	2.61	2.62–2.64
OCH_2	–	–	3.41–4.04
CH_2	–	–	1.53–1.58
$(\text{CH}_2)_n$	–	–	1.18–1.36
CH_3	–	3.60	0.80–0.91
^{13}C ЯМР спектры			
C^5H_2	47.146	47.399	47.122–48.025
C^4O	204.201	202.045	201.334–202.486
C^3H_2	34.401	34.552	34.356–35.082
C^2H_2	27.463	27.225	30.430–32.045
C^1O	176.900	173.174	172.635–172.805
OCH_2	–	–	64.791–65.260
$(\text{CH}_2)_n$	–	–	25.524–29.695
CH_2	–	–	19.076–22.762
CH_3	–	51.900	13.691–14.198

Т а б л и ц а 2. Температура плавления (г.пл.), критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), выходы и хромато-масс-спектрометрические характеристики эфиров АЛК

Соединение	М*, Да	Т.пл.*, °С	ККМ, мМ	Выход*, %	Время удерживания (t_R)	[M] ⁺
1	167,6	156–158	–	–	0,944	132,1
2	181,6	114–117	–	92	5,159	146,1
3	223,7	109–111	–	91	7,393	188,1
4	251,8	97–99	20	89	7,626	216,2
5	279,8	98–99	10	78	9,288	244,2
6	307,9	99–102	2,5	75	10,668	272,3
7	335,9	106–108	0,75	80	11,698	300,3
8	364,0	108–110	н.о.	84	12,057	328,3
9	392,0	109–111	0,3	72	12,587	356,3

П р и м е ч а н и е. *В виде гидрохлорида.

Т а б л и ц а 3. Выход сухой биомассы микроорганизмов в зависимости от концентрации АЛК (1) и ее эфиров (2–9) с разной длиной алкильного радикала

С, мМ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Контроль
Выход сухой биомассы <i>Chlorella vulgaris</i> Pa-001, мг										
0,1	148	115	120	169	152	157,5	159,5	169	150	144
0,01	124	104	107	130	104	146	159	143	121	
Выход сухой биомассы <i>Chlorella emersonii</i> Pa-003, мг										
0,1	102	131	107	84	105	102	101	97	91	72
0,01	80	88	104	83	67	86	91	80	84	
Выход сухой биомассы <i>Scenedesmus obliquus</i> Pa-005, мг										
0,1	91	103	144	140	105	127	108	132	126	98
0,01	87	106	104	136	95	113	127	107	107	

Для установления влияния АЛК и ее сложных эфиров на рост фототрофных микроводорослей *Chlorella* и *Scenedesmus* эффекторы добавляли к соответствующим питательным средам в конечных концентрациях 0,01 и 0,1 мМ, одновременно внося взвесь культуры микроводорослей

в количестве 10% от общего объема среды. В результате экспериментов выявлено, что АЛК и ее эфиры оказывают эффект на формирование и последующее накопление зеленой биомассы исследованных штаммов микроводорослей. Установлено, что максимальный выход сухой биомассы наблюдается при концентрации 0,1 мМ (табл. 3). Кроме того, действие АЛК и ее эфиров на развитие микроводорослей также находится в зависимости от внутривидовых и межвидовых особенностей испытанных штаммов. Так, например, не способные к образованию мицеллярных структур метиловый и бутиловый эфиры (2 и 3) в отличие от мицеллообразующих эфиров 4–9 даже ингибируют накопление сухой биомассы *Chlorella vulgaris*, тогда как таких выраженных различий на других испытанных штаммах не наблюдается (табл. 3).

В целом на основании совокупности полученных данных можно утверждать что АЛК и ее алифатические эфиры оказывают стимулирующий эффект на развитие и рост фототрофных микроводорослей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

5-Аминолевулиновую кислоту (АЛК) получали по технологии, разработанной в Институте биоорганической химии НАН Беларуси (патент BY 10019 от 30.08.2007 г.). Высшие спирты (C8-16) получены из фирмы «Fluka». ИК-спектры регистрировали на FTIR-спектрометре Bomem-Michelson 100 в области частот 700–3600 см⁻¹. ЯМР спектры эфиров АЛК получали на приборе Bruker Avance 500(¹H)/126(¹³C) МГц в растворах CDCl₃ с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. ЯМР спектры АЛК гидрохлорида получены в растворе D₂O в присутствии внутреннего стандарта 3-(триметилсилил)-1-пропансульфоната натрия. Спектры обрабатывали демоверсией программы «MestRe-C». Хромато-масс-спектрометрическое исследование АЛК и ее эфиров выполнено на приборе Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6410 Triple Quad. Условия хроматографии: колонка Zorbax Eclipse XDB-C18; подвижная фаза – 0,05%-ный водный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и ацетонитрил в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0,5 мл/мин; температура колонки – 35 °С; объем вносимого раствора – 2 мкл. Результаты исследований обработаны и визуализированы с помощью программного комплекса прибора.

Синтез эфиров АЛК осуществляли по следующей общей методике. К 20,0 ммоль АЛК гидрохлорида добавляли 22,0–23,0 ммоль соответствующего алканола и 500 мкл концентрированной HCl. Колбу снабжали обратным холодильником, устанавливали на магнитную мешалку, перемешивали при нагревании (85–100 °С) до полной гомогенизации реакционной смеси (3,0–5,5 ч). Затем обратный холодильник заменяли аппаратом Сокслета, снаряженным поглотительным патроном с плавленным сульфатом магния, к реакционной смеси прибавляли хлороформ в объеме, удовлетворяющем условию циркуляции, и продолжали реакцию до прекращения образования азеотропа (7–12 ч). Затем реакционную смесь охлаждали, разбавляли 2–5 объемами хлороформа, выдерживали 1–2 ч, выпавший осадок отфильтровывали. Фильтрат упаривали до начала загустевания кубового остатка, который затем разбавляли 3 объемами ацетона, 5 объемами эфира и 3 объемами гексана и оставляли в холодильнике на 2 ч. Выпавший осадок отделяли фильтрованием, кристаллы промывали на фильтре эфиром и сушили первоначально в токе воздуха на фильтре, а затем в вакуум-эксикаторе до постоянного веса. Получали 15–18 ммоль (72–92%) соответствующего эфира АЛК гидрохлорида (табл. 2).

Для определения критической концентрации мицеллообразования эфиров использовали флуоресцентный метод [11], основанный на изменении интенсивности флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гекса триена (ДГТ) при встраивании его в мицеллы. Для этого к 2 мл раствора эфиров различной концентрации в 0,1 М NaCl добавляли 5 мкл 2 мМ ДГТ, растворенного в тетрагидрофуране. Пробирки выдерживали при комнатной температуре 30 мин в темноте. Затем измеряли интенсивность флуоресценции при 430 нм при возбуждении образца светом с длиной волны 358 нм. Из зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации эфира в растворе определяли значения ККМ эфиров 5-АЛК, представленные в табл. 2.

Для тестирования влияния эфиров АЛК на рост микроводорослей были отобраны альгологически чистые культуры *Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii* и *Scenedesmus obliquus*, выделенные и поддерживаемые в коллекции культур лаборатории фотосинтезирующих микроорганизмов Научно-производственного центра «Армбиотехнология» НАН Армении. Культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus obliquus* выращивали в колбах объемом 250 см³ на питательной среде Тамия, содержащей макроэлементы (г/л): KNO₃ – 2,0, KH₂PO₄ – 0,3, MgSO₄·7H₂O – 0,3 и микроэлементы (мг/л): FeSO₄·7H₂O – 5,0, Co(NO₃)₂·6H₂O – 0,02, CuSO₄·5H₂O – 0,01, ZnSO₄·7H₂O – 0,04, MnSO₄·5H₂O – 1,0, H₃BO₃ – 0,6, (NH₄)₂MoO₇·2H₂O – 1, ЭДТА – 10,0, pH 7,5. Культуру *Chlorella emersonii* культивировали в объеме 120 см³ на среде Болда состава (г/л): NaNO₃ – 25,0, CaCl₂·2H₂O – 2,5, MgSO₄·7H₂O – 7,5, K₂HPO₄ – 7,5, KH₂PO₄ – 17,5, NaCl – 2,5, ЭДТА – 50,0, FeSO₄ – 4,98, H₃BO₃ – 11,42, ZnSO₄·7H₂O – 8,82, MnCl₂·4H₂O – 1,44, MoO₃ – 0,71, CuSO₄·5H₂O – 1,57, Co(NO₃)₂·6H₂O – 0,49. АЛК и ее эфиры в конечных концентрациях 0,01 и 0,1 мМ добавляли к соответствующим питательным средам, одновременно внося взвесь культур микроводорослей в количестве 10% от общего объема среды. Культуры выращивали при стандартных условиях в режиме круглосуточного освещения (освещенность – 1800–2000 люкс, температура – 24–26 °С) на протяжении 49 сут. Динамику накопления биомассы микроводорослей оценивали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность питательных сред при длине волны 600 нм. Сухую биомассу получали путем центрифугирования (8000 об/мин) опытных групп микроводорослей с последующим отделением надосадочной жидкости и высушиванием осадка (культуры) в стерильном ламинарном потоке воздуха при температуре 24–26 °С. Взвешивание сухой биомассы микроводорослей проводили с помощью торсионных весов.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № X14APM-034 и Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения, грант № 13РБ-043.

Список использованной литературы

1. Аверина, Н. Г. Изучение влияния 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская // Физиол. растен. – 1988. – Т. 35, вып. 5. – С. 916–920.
2. Averina, N. G. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth / N. G. Averina, E. B. Yaronskaya // Photosynthetica. – 1991. – Vol. 25, N 1. – P. 27–31.
3. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content and plant growth / Y. Hotta [et al.] // Biosci. Biotech. Biochem. – 1997. – Vol. 61, N 12. – P. 2025–2028.
4. Roy, C. B. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjung*, *V. mungo*, *V. radiata* / C. B. Roy, M. Vivekanandan // Biol. Plantarum. – 1998. – Vol. 41, N 2. – P. 211–215.
5. Стимуляция роста и развития растений ячменя липофильными эфирами 5-аминолевулиновой кислоты / С. Г. Спивак [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 95–99.
6. Влияние липофильных эфиров 5-аминолевулиновой кислоты на рост и развитие растений / С. Г. Спивак [и др.] // Вестн. Алтайского гос. аграр. ун-та. – 2007. – № 7. – С. 28–31.
7. Яронская, Е. Б. Экологически безопасные регуляторы роста растений на основе 5-аминолевулиновой кислоты / Е. Б. Яронская, Н. Г. Аверина, М. А. Кисель // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7, ч. 1. – С. 127–134.
8. Макарова, Е. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем / Е. И. Макарова, И. П. Огурина, А. И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 20. – С. 120–133.
9. Kloek, J. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin / J. Kloek, W. Akkermans, G. M. Beijersbergen van Henegouwen // Photochem. Photobiol. – 1998. – Vol. 67, N 1. – P. 150–154.
10. Comparative effect of ALA derivatives on protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures / A. Casas [et al.] // Br. J. Cancer. – 1999. – Vol. 80. – P. 1525–1532.
11. Chattopadhyay, A. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge / A. Chattopadhyay, E. London // Anal. Biochem. – 1984. – Vol. 139, N 2. – P. 408–412.

Поступила в редакцию 16.02.2016