

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ

ՍՈՂՈՄՈՆՅԱՆ ՏԻԳՐԱՆ ՄԵՐՈՒԺԱՆԻ

BACILLUS ՑԵՂԻ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻՑ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱՐԺԵՔ
ՈՒՆԵՑՈՂ ՌԵԿՈՄԲԻՆԱՆՏ α -ԱՄԻԼԱԶՆԵՐԻ
ՇՏԱՄ-ԱՐՏԱԴՐԻԶՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ
ՀԱՄԱՊԱՏԱՍԽԱՆ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2024

SPC «ARMBIOTECHNOLOGY» NAS RA

SOGHOMONYAN TIGRAN MERUZHAN

PRODUCTION OF TECHNOLOGICALLY VALUABLE RECOMBINANT α -AMYLASE
STRAINS-PRODUCERS FROM BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* AND
CHARACTERIZATION OF THE CORRESPONDING ENZYMES

SYNOPSIS

of dissertation for conferring of scientific degree of
Candidate of Biological Science (PhD)
in the specialty 03.00.07 – «Microbiology. biotechnology»

YEREVAN – 2024

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ -ում:

Գիտական ղեկավար՝ Կ.գ.թ. Արթուր Ալբերտի Համբարձումյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.գ.դ., պրոֆեսոր
Հրաչյա Գարեգինի Հովհաննիսյան
Կ.գ.թ. Վարդան Կառլենի Գասպարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2024թ. հոկտեմբերի 18-ին
ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-ի
Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան 14, հեռ./ֆաքս՝ (+374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2024թ. սեպտեմբերի 18-ին:

018 մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, Կ.գ.թ.՝

Գ.Ե. Ավետիսովա

The theme of dissertation has been approved at SPC "Armbiotechnology" NAS RA.

Scientific supervisor: PhD of Biological Sciences Artur Hambardzumyan

Official opponents: Dr. of Biological Sciences, Prof. Hrachya Hovhannisyan

PhD of Biological Sciences Vardan Gasparyan

Leading organization: Institute of Molecular Biology NAS RA

The defense of the dissertation will be held on 18th of October, 2024, at 15⁰⁰ at the
session of 018 Specialized Council on Biotechnology of HESC of RA at SPC
"Armbiotechnology" NAS RA.

Address: 0056, RA, Yerevan, 14 Gyurjyan str., tel./fax (+374 10) 65 41 80.

The dissertation is available at the library of SPC "Armbiotechnology" NAS RA.

The synopsis has been sent on 18th of September, 2024.

Scientific Secretary of 018 Specialized Council, PhD

G.E. Avetisova

ՆԵՐԱՄՈՒԹՅՈՒՆ

Ատենախոտության թեմայի արդիականությունը: α -Ամիլազները (E.C. 3.2.1.1.) օսլան քայքայող ֆերմենտներ են, որոնք հիդրոլիզում են պոլիսախարիդների ներքին α -1,4-Օ-գլիկոզիդային կապերը՝ պահպանելով պրոդուկտների α -անոմերային կոնֆիգուրացիան: α -Ամիլազների մեծ մասը մետաղաֆերմենտներ են, որոնք իրենց ակտիվության, կառուցվածքային ամբողջականության և կայունության համար պահանջում են կալցիումի իոններ (Ca^{2+}): Ըստ ամինաթթվային հաջորդականությունների նմանության դրանք պատկանում են գլիկոզիդ հիդրոլազային ֆերմենտների 13 (GH-13) ընտանիքին [Henrissat, 1991]: Ամիլազներն ամենակարևոր արդյունաբերական ֆերմենտներից են, որոնք ունեն լայն կիրառություն՝ սկսած օսլայի փոխակերպումից շաքարային օշարակների մինչև դեղագործական արդյունաբերության համար ցիկլոդեքստրանների արտադրություն: Դրանք ֆերմենտների համաշխարհային արտադրության 30 %-ն են կազմում [Van der Maarel et al., 2002]: Լուծվող օսլայի, ամիլոզի, ամիլոպեկտինի, գլիկոզենի, մալտոդեքստրինի, ցիկլոդեքստրինների և այլ սուբստրատների նկատմամբ ամիլազների սուբստրատային սպեցիֆիկությունների հետազոտությունները ներկայումս էլ արժեքավոր գիտական հետազոտությունների առարկա են հանդիսանում [Aguilar et al., 2000, Kunamneni and Singh, 2005]: Հում օսլան հիդրոլիզող նոր α -ամիլազների փնտրտուքը (դրանք կիրառող տեխնոլոգիաներում բացակայում է օսլայի դոնորդացման էներգատար էտապը) ժամանակակից կենսատեխնոլոգիայի հրատապ խնդիրներից է [Okolo et al, 1995, Puspasari et al., 2013, Mitsui et al., 2005]:

Տարբեր արտադրություններում տարաբնույթ ֆիզիկաքիմիական և կենսաքիմիական բնութագրերով α -ամիլազների պահանջարկը պայմանավորում է ռեկոմբինանտ տեխնոլոգիաների [Kaneko et al., 1996, Knox et al., 2004, Filler et al., 1998, Leveque et al., 2000] և ֆերմենտային ինժեներիայի կիրառմամբ նոր բնութագրերով ֆերմենտների նպատակային փնտրտուքը [Chen et al., 2015, Liu et al. 2015]: Այսպես, կետային մուտագենեզի կիրառմամբ *B. stearothermophilus*-ի α -ամիլազի արգինին179 և գլիցին180 ամինաթթուների դելեցիայի արդյունքում ստացվել և նկարագրվել է բարելավված բնութագրերով ռեկոմբինանտ ֆերմենտ (բարձր ջերմակայունություն, ցածր pH-ում աշխատելու ունակություն, Ca-ի պահանջարկի նվազում) [Gai et al., 2018]: *B. stearothermophilus*-ի α -ամիլազի ազոսնշանային պեպտիդի օպտիմալացման և համապատասխան շապերոնի գերեքսպրեսիայի շնորհիվ հնարավոր է եղել հասնել արտազատվող ֆերմենտի գերեքսպրեսիային (9200 միավոր/մլ) [Yao et al., 2019]:

Այսպիսով, օսլա պարունակող հումքի վերամշակման պրոցեսներում լայն կիրառություն ունեցող նոր, բարելավված բնութագրերով α -ամիլազների ռեկոմբինանտ շտամ-արտադրիչների և ֆերմենտային ձևերի ստացումն ու բնութագրումն արդիական խնդիր է, և այս ուղղությամբ կիրառվող ջանքերը շարունակում են պահանջված մնալ կենսատեխնոլոգիական արտադրությունների կողմից:

Աշխատանքի նպատակը *Bacillus* ցեղի մանրէներից տեխնոլոգիական արժեք ունեցող, նոր, արտազատվող, ռեկոմբինանտ α -ամիլազների շտամ-արտադրիչների և ֆերմենտային պատրաստուկների ստացումն է, դրանց բնութագրումն ու արտադրության տեխնոլոգիաների մշակումը:

Նպատակի իրականացման համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ Մանրէների ավանդադրման կենտրոն հիմնարկի (ՄԱԿ) *Bacillus amyloliquefaciens* MDC 1974 և *Bacillus subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեների մոլեկուլային կլոնավորում *Escherichia coli* / *B. subtilis* pBE-S մաքրքային վեկտորի կազմում:
- Ստացված ռեկոմբինանտ պլազմիդներով *B. subtilis* RIK 1285 շտամի բջիջների տրանսֆորմացմամբ *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեները կրող շտամների ստացում:
- Ստացված ռեկոմբինանտ շտամների աճի միջավայրերի և պայմանների օպտիմալացում՝ նպատակային ամիլազների առավելագույն քանակների ստացման նպատակով: Կուլտուրալ հեղուկներից ռեկոմբինանտ α -ամիլազների մասնակի մաքրման մեթոդների մշակում:
- Մինթեզված արտազատվող ռեկոմբինանտ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնութագրերի ուսումնասիրում (ֆերմենտների մոլեկուլային բնութագրում, ջերմաստիճանային և pH-օպտիմումների, ջերմակայունության և pH-ից ջերմակայունության կախման հետազոտում, ամիլազների բնութագրում ըստ սուբստրատային սպեցիֆիկության, հում օսլան քայքայելու ունակության, ռեակցիայի տարման խորության և այլն):
- Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների փորձարարական (100 μ) արտադրության արդյունավետ տեխնոլոգիաների (աերացիայի ռեժիմ, ջերմաստիճանային ռեժիմ, ֆերմենտացիայի տևողություն), ֆերմենտների անջատման և պահպանման տեխնոլոգիաների մշակում:

Աշխատանքի գիտական նորոյթը

- «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ Մանրէների ավանդադրման կենտրոնի *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեների հիման վրա մեր տարածաշրջանում առաջին անգամ *B. subtilis* RIK 1285 շտամի հիման վրա ստեղծվել են մինչև 2000 միավոր/մլ ակտիվությամբ համապատասխան ֆերմենտներն արտազատող ռեկոմբինանտ շտամ-արտադրիչներ:
- ՀՀ-ում առաջին անգամ ներդրվել է օղակաձև ԴՆԹ-ի մոլեկուլում գեների համակցման Գիբսոնի մեթոդը (այս մեթոդով են կառուցվել նպատակային ամիլազների գեները կրող ռեկոմբինանտ պլազմիդները):
- Մոդիֆիկացվել և էականորեն բարելավվել է Միլերի ռեդուկցող շաքարների չափման դինիտրոսալիցիլաթթվի մեթոդը:
- Օպտիմալացվել են α -ամիլազների ստացված շտամ-արտադրիչների աճի պայմանները: Մշակվել են կուլտուրալ հեղուկներից ռեկոմբինանտ α -ամիլազների մասնակի մաքրման մեթոդներ:
- Ուսումնասիրվել են արտազատվող ռեկոմբինանտ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնութագրերը:
- Մշակվել են ռեկոմբինանտ α -ամիլազների պիլոտային (փորձարարական) արտադրության, անջատման և պահպանման արդյունավետ տեխնոլոգիաներ:

Աշխատանքի գործնական նշանակությունը.

- *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեները կրող *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 ռեկոմբինանտ շտամներն ավանդադրվել են ՄԱԿ-ում, համապատասխանաբար, MDC 11327 և MDC 11328 համարների ներքո և կարող են հիմք հանդիսանալ համապատասխան բնութագրերով ֆերմենտների արտադրությունների կազմակերպման համար:
- Օդակաձև ԴՆԹ-ի մոլեկուլում գեների համակցման Գիբսոնի մեթոդը կարող է լայնորեն օգտագործվել միևնույն վեկտորի կազմում՝ ինչպես առանձին գեների, այնպես էլ գեների խմբի մոդուլային կլոնավորման նպատակով:
- Դինիտրոսալիցիլաթթվի հիման վրա ռեդուկցող շաքարների չափման մոդիֆիկացված մեթոդը կարող է հաջողությամբ կիրառվել գիտության և արդյունաբերության ամենատարբեր բնագավառներում:
- Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների շտամ-արտադրիչների օպտիմալացված աճի պայմանների մասշտաբավորմամբ կարելի է մշակել անհրաժեշտ քանակի ֆերմենտների ստացման տեխնոլոգիաներ: Մաքրման մեթոդների մասշտաբավորմամբ կուլտուրալ հեղուկներից կարելի է ստանալ անհրաժեշտ մաքրության ռեկոմբինանտ α -ամիլազների պատրաստուկներ:
- Ռեկոմբինանտ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնութագրերի իմացությունը կարող է հիմք հանդիսանալ այդ α -ամիլազների նպատակային կիրառման համար:
- Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների փորձարարական արտադրության, անջատման և պահպանման մշակված տեխնոլոգիաները կարող են հիմք հանդիսանալ այս ֆերմենտների ստացման տեխնոլոգիական գործընթացների համար:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները.

- *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեների մոլեկուլային կլոնավորումը *E. coli* / *B. subtilis* pBE-S մաքրքային վեկտորի կազմում:
- *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների արտազատվող α -ամիլազի գեները կրող *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 շտամների ստացումը:
- *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 շտամների աճի միջավայրերի և պայմանների օպտիմալացումը նպատակային ամիլազների առավելագույն քանակների ստացման նպատակով:
- Կուլտուրալ հեղուկներից ռեկոմբինանտ α -ամիլազների մասնակի մաքրման մեթոդների մշակումը:
- Մինթեզված արտազատվող ռեկոմբինանտ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնութագրերի ուսումնասիրումը:
- Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների փորձարարական արտադրության արդյունավետ տեխնոլոգիաների մշակումը:
- Ֆերմենտների անջատման և պահպանման տեխնոլոգիաների մշակումը:

Ատենախոսական աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքը կատարվել է բազային ֆինանսավորմամբ թեմայի, ինչպես նաև ՀՀ ԿԳՄՄՆ Բարձրագույն կրթության և գիտության կոմիտեի գիտական և գիտատեխնիկական պայմանագրային (թեմատիկ) ֆինանսավորման 13-2I359, Երիտասարդ գիտնականների աջակցության 16YR-2I016 և Ասպիրանտների և երիտասարդ հայտարարների հետազոտությունների աջակցության 21AA-2I029 դրամաշնորհների շրջանակներում:

Հրատարակված աշխատությունները: Ատենախոսության մեջ շարադրված հետազոտության արդյունքները հրատարակված են 4 գիտական աշխատանքներում՝ 3 հոդվածներ, որոնցից մեկը առանց համահեղինակների և 1 միջազգային գիտաժողովի թեզիս:

Աշխատանքի կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսական աշխատանքը շարադրված է 128 էջի վրա, ներառում է 43 նկար և 9 աղյուսակ, 2 հավելված: Ատենախոսությունը կազմված է «Հապավումների ցանկ», «Ներածություն», «Գրականության ակնարկ», «Հետազոտության նյութեր և մեթոդներ», «Արդյունքներ և քննարկում», «Ամփոփում», «Եզրակացություններ», «Գրականության ցանկ» բաժիններից:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գլուխ 1-ում ներկայացված է ածխաջրերի վրա ներգործող ֆերմենտների (CAZY) տեսակները, դասակարգումը, առանձնահատկությունները, գլիկոզիդ հիդրոլազների ընտանիքները, ենթաընտանիքները և α -ամիլազը, որպես այդ ընտանիքի անդամ: Նկարագրվել են α -ամիլազների ֆունկցիոնալ և կառուցվածքային առանձնահատկությունները, բջջից արտազատման մեխանիզմները: Մանրամասնորեն ներկայացվել մանրէային ծագման α -ամիլազների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնորոշագրերը: Ներկայացված են նաև ռեկոմբինանտ α -ամիլազների ստացման մեթոդները, ինչպես նաև մեծածավալ արտադրության հիմնական տեխնոլոգիական մոտեցումները:

ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Հետազոտության օբյեկտները: Որպես α -ամիլազի գենի կրող միկրոօրգանիզմներ են հանդիսացել «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոնի կողմից տրամադրված *B. amyloliquefaciens* MDC1974 և *B. subtilis* MDC3500 շտամները: «Takara Bio» ընկերությունից ձեռք բերված ցածր պրոտեազային ակտիվությամբ *B. subtilis* RIK 1285 շտամը, օգտագործվել է որպես էքսպրեսիոն վեկտորի ռեցիպիենտ շտամ: *E. coli* Top10 շտամը օգտագործվել է էքսպրեսիոն վեկտորի նախնական տրանսֆորմացման և բազմացման նպատակով: pBE-S մաքրաքային վեկտորն օգտագործվել է α -ամիլազի գենի կլոնավորման և արտաբջջային էքսպրեսման համար:

ԴՆԹ-ի անջատում և նպատակային գեների կլոնավորում pBE-S վեկտորի կազմում: Շտամներից գենոմային ԴՆԹ-ների անջատումներն իրականացվել է «Monarch»-ի գենոմային ԴՆԹ-ի անջատման լրակազմով համաձայն արտադրողի հրահանգների: α -Ամիլազի *amy1974* և *amy3500* (սեփական ազդանշանային պեպտիդի առկայության դեպքում համապատասխանաբար *amy1974sig* և *amy3500sig*) Benchling ծրագրի

կիրառամաբ նախագծված պրայմերների գույգերը օգտագործվել են գենոմային ԴՆԹ-ներից ամիլազի գեների ՊՇՌ ամպլիֆիկացման համար: Կլոնավորումն իրականացվել է Գիբսոնի համակցման մեթոդով [Gibson et al., 2009]: Սկզբում pBE-S վեկտորը կրկնակի ռեստրիկցիայի է ենթարկվել NdeI և XbaI ռեստրիկտազների ազդեցությամբ համաձայն արտադրողի ցուցումների (New England Biolabs): Գծայնացված վեկտորը և ամպլիֆիկացված գեները ռեակցիոն խառնուրդ են ներմուծվել առաջարկվող հարաբերակցությամբ և 10 մկլ վերջնական ծավալով: Այնուհետև, α -ամիլազի գեների կլոնավորման ռեակցիան իրականացվել է NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix-ի միջոցով 50°C ջերմաստիճանում՝ հետևելով արտադրողի հրահանգներին:

B. subtilis RIK 1285 շտամի բջիջների տրանսֆորմացում ստացված ռեկոմբինանտ պլազմիդներով և նպատակային շտամ-արտադրիչների ստացում: Ստացված pBE-S_amy1974sig, pBE-S_amy1974, pBE-S_amy3500sig և pBE-S_amy3500 ռեկոմբինանտ պլազմիդներն անմիջապես կլոնավորման ռեակցիոն խառնուրդներից ջերմային շոկի մեթոդով տրանսֆորմացվել են *E. coli* Top 10-ի բջիջներում: Նպատակային գեները կրող բջիջներն ընտրվել են գաղութային ՊՇՌ-ի մեթոդով: Ընտրված գաղութներից ռեկոմբինանտ պլազմիդներն անջատվել են «QIAGEN»-ի QIAprep Spin Miniprep լրակազմով ըստ արտադրողի հրահանգների: Ստացված ռեկոմբինանտ պլազմիդներով *B. subtilis* RIK 1285 շտամի բջիջների տրանսֆորմացիայով ստացվել են ամիլազի գեները կրող ռեկոմբինանտ շտամները:

Ռեկոմբինանտ ամիլազային շտամների ֆերմենտացման միջավայրերի և պայմանների օպտիմալացում: Ռեկոմբինանտ շտամների α -ամիլազների առավելագույն էքսպրեսիայի հասնելու համար օգտագործվել են 5 տարբեր ֆերմենտացման միջավայրեր, որոնք ունեցել են նույն կազմը, տարբերվելով միայն օրգանական ազոտի աղբյուրներով: Ֆերմենտացումներն իրականացվել են 80ժ, 33°C ջերմաստիճանում, pH 7,2, 220 պտույտ/րոպե պայմաններում: Ամիլազի էլքի վրա սեփական ազդանշանային պեպտիդի առկայության, միջավայրի աերացիայի ինտենսիվության և կանամիցինի կոնցենտրացիայի ազդեցության փորձերում օգտագործվել է ընտրված օպտիմալ T9 սննդամիջավայրը: Աերացիայից կախված ամիլազի սինթեզն ուսումնասիրելու համար ստացված ռեկոմբինանտ շտամները նշված պայմաններում ֆերմենտացվել են 10, 20 և 70 մլ ծավալով միջավայր պարունակող կոլբաներում: Միջավայրում կանամիցինի կոնցենտրացիայից կախված ամիլազի արտադրության մակարդակը գնահատելու համար (վերը նշված պայմաններում), 20 մլ սննդամիջավայրում՝ կանամիցինի 10 մգ/լ, 30 մգ/լ և առանց կանամիցինի առկայության պայմաններում իրականացվել է ստացված շտամ-արտադրիչների ֆերմենտացում:

Ֆերմենտային ակտիվության և սպիտակուցի քանակի որոշման մեթոդներ: Կուլտուրալ հեղուկում արտազատվող ֆերմենտային ակտիվությունը որոշվել է ըստ օպալի հիդրոլիզի ընթացքում առաջացող ռեդուկցող խմբերի քանակի: Այդ նպատակով օգտագործվել է Միլլերի եղանակի մոդիֆիկացված տարբերակը [Soghomonyan, 2024]: Սպիտակուցի քանակությունը գնահատվել է Գրովսի և Դելվիսի մեթոդով [Peterson 1983]: Բակտերիալ կենսազանգվածի չոր քաշը որոշվել է կշռային եղանակով, 80°C ջերմաստիճանում 12 ժամ չորացնելուց հետո [An et al., 2018]:

α-Ամիլազի ֆիզիկաքիմիական բնութագրերի որոշման մեթոդներ: Բոլոր չորս ռեկոմբինանտ α-ամիլազները ենթարկվել են մասնակի մաքրման, որն իրականացվել է Bio-Rad-ի FPLC NGC Quest 10 Plus համակարգով՝ հիդրոքսիլապատիտային աշտարակով: SDS PAGE էլեկտրոֆորեզն իրականացվել է 0,1% SDS պարունակող 12,5% պոլիակրիլամիդային գելում (pH 8,3), Bio-Rad-ի ընթացակարգերի համաձայն: Amy1974 և Amy3500 ամիլազների զիմոգրամն իրականացվել է օգտագործվելով է 7,5% Նատիվ PAGE, էլեկտրոդների խցիկներում օգտագործվել է տրիս-գլիցինի բուֆեր՝ pH 8,3: Էլեկտրոֆորեզից հետո 0,5% լուծվող օսլա պարունակող 1% ազարոզային գելը 2-3 մմ շերտով ավելացվել է պոլիակրիլամիդային գելի վրա: Ստացված երկշերտ գելը բաժանվել է երկու մասի և ինկուբացվել է 55 °C ջերմաստիճանում 10 և 20 րոպե: Ինկուբացումից հետո այն 5 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում թողնվել է Լուցոլի լուծույթում (յոդ - 5գ/լ, կալիումի յոդիդ - 10գ/լ): Գելի շերտերի մուգ կապույտ ֆոնի վրա պարզ սպիտակ-դեղնավուն գոտիների հայտնվելը համարվել է α-ամիլազային ակտիվության ցուցանիշ:

α-Ամիլազի կատալիտիկ բնութագրերի որոշման մեթոդներ: Ֆերմենտի ակտիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից որոշելու համար ակտիվությունը չափվել է 35°C-ից մինչև 80°C ջերմաստիճաններում: Ֆերմենտի ակտիվության կախվածությունը pH-ից որոշվել է ցիտրատի, ֆոսֆատի և բորատի բուֆերային լուծույթներում (յուրաքանչյուրը 50 մՄ)՝ pH-ի 2-10 միջակայքում: Ջերմային կայունությունը որոշելու համար ֆերմենտային պատրաստուկը 20 րոպե ինկուբացվել է 35°C-ից մինչև 80°C ջերմաստիճաններում, այնուհետև սառեցվել մինչև 4°C, իսկ մնացորդային ակտիվությունները չափվել են վերը նկարագրված պայմաններում: Ֆերմենտի pH-ից կախված ջերմակայունությունը որոշվելու համար ֆերմենտային պատրաստուկը 20 րոպե ինկուբացվել է ցիտրատ, ֆոսֆատ և բորատ պարունակող բուֆերային լուծույթներում (յուրաքանչյուրը 20 մՄ)՝ pH-ի 2-10 միջակայքում, այնուհետև սառեցվել է մինչև 4°C, իսկ մնացորդային ակտիվությունը չափվել է վերը նկարագրված մեթոդով: Ուսումնասիրված ֆերմենտային պատրաստուկներով իրականացվող հիդրոլիզի ռեակցիայի խորությունը որոշելու համար կատարվել է 15% եգիպտացորենի օսլայի լուծույթի հիդրոլիզ 1 մՄ CaCl₂-ի առկայությամբ (pH 6,0):

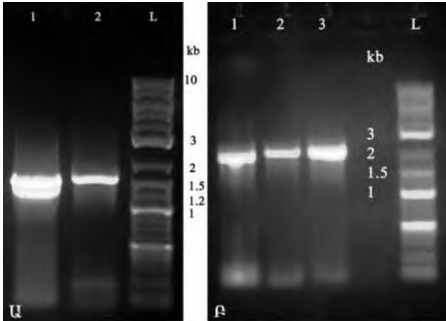
Արտադրական պայմաններում α-ամիլազի շտամ-արտադրիչների ֆերմենտացման, ֆերմենտների անջատման և վերջնական ապրանքային տեսքի բերման պայմանները: Ռեկոմբինանտ α-ամիլազների պիլոտային արտադրությունը, կոլտուրալ հեղուկի խտացումը, մասնակի մաքրումը և չորացումը կատարվել է «Վիպեկո ԱՄ» ՄՊԸ-ի արտադրական բազայի հենքի վրա [<https://www.vipeco.am/hy>]: Ֆերմենտացիայի ավարտից հետո կոլտուրալ հեղուկը ցենտրիֆուգվել է հետագա փուլում արտաբջջային ֆերմենտ պարունակող հեղուկը ենթարկվել է ուլտրաֆիլտրացիայի, այնուհետև փորձարկվել են խտացված հեղուկի չորացման երկու եղանակներ՝ հեղուկացրային և լիոֆիլ չորացումներ: Ֆերմենտի կայունությունը բարձրացնելու նպատակով ֆերմենտային հեղուկին մինչև հեղուկացրային կամ լիոֆիլ չորացումը ավելացվել է 2% սախարոզ կամ 2% օսլա [Beek et al., 2015]: Իրականացվել է նաև ամոնիումի սուլֆատով ֆերմենտային հեղուկի ֆրակցիոնացում:

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

B. amyloliquefaciens MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեների կենսահինֆորմատիկական վերլուծություն: *B. subtilis* շտամի ZJ-1 α -ամիլազի գենի հիման վրա (GenBank-ի մուտքային համարը JX081246) նախագծված պրայմերային զույգերի միջոցով *B. amyloliquefaciens* MDC1974 շտամից (*amy1974*) մեկուսացված ԴՆԹ-ի ամպլիֆիկացմամբ սինթեզվել են նույն չափի ամպլիկոն: Հետագոտվող *amy1974* գենի Eurofins-ի վերծանած նուկլեոտիդային հաջորդականության համաձայն *amy1974* գենը 99% նույնականություն է ցուցաբերել *amyZJ-1* գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ (նկար 9), մինչդեռ նույն գեների կոդավորած սպիտակուցների ամինաթթվային հաջորդականությունների BLAST վերլուծությունը 100% նույնականություն է ցուցաբերում համապատասխան սպիտակուցների ամինաթթվային հաջորդականությունների միջև (GenBank մուտքային համարը AFN57616): Ըստ InterPro վերլուծության, *amy1974* գենը պատկանում է ջերմակայուն α -ամիլազների ընտանիքին (IPR013776): Այն պարունակում է ազդանշանային պեպտիդ (SIGNALP_GRAM_POSITIVE SignalP-TM), գլիկոզիլ հիդրոլազային 13 ընտանիքի կատալիտիկ դոմեն (IPR006047) և պրոկարիոտ α -ամիլազների հետ համընկնող C-ծայրային ամբողջովին բետա տիրոյթ (IPR015237) [Paysan-Lafosse et al., 2022]: Բացի այդ, իրականացված անալիզը ցույց է տալիս, որ այս սպիտակուցը պատկանում է գլիկոզիլ հիդրոլազների գերընտանիքին (IPR017853): *Amy1974sig*-ը (ազդանշանային պեպտիդով տարբերակ) պարունակում է 514 ամինաթթուներ և ունի 5,74 տեսական pI և 58,4 կԴա մոլեկուլային կշիռ, մինչդեռ *Amy1974*-ը (առանց ազդանշանային պեպտիդի) պարունակում է 483 ամինաթթուներ և ունի 54,8 կԴա մոլեկուլային կշիռ և 5,31 իզոէլեկտրիկ կետ, ըստ Expasy-ի հաշվարկների (https://web.expasy.org/compute_pi/): Այս հաշվարկները հիմնված են ազդանշանային պեպտիդների կտրման վայրի որոշման վրա SignalP-5.0 ծրագրաշարով (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>), [Nielsen: et al., 2019]: Ստացված տեղեկատվությունն օգտագործվել է պրայմերային զույգեր կառուցելու նպատակով՝ *amy1974* գենը կլոնավորելու համար սեփական ազդանշանային պեպտիդով և առանց դրա:

B. subtilis MDC3500 շտամի 16S rRNA գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը (GenBank՝ MT534524) 99% նույնականություն է ցուցաբերում *Bacillus* sp-ի KBS0812 շտամի համապատասխան ամինաթթվային հաջորդականության հետ (նկար 11), որի ամբողջական գենոմը հայտնի է (GenBank CP041757.1): *Bacillus* sp-ի KBS0812 շտամի ամբողջական գենոմից վերցված α -ամիլազի գենի հիման վրա ստեղծված պրայմերների զույգի կիրառմամբ *B. subtilis* MDC3500 (*amy3500*) շտամի ԴՆԹ-ից հնարավոր է եղել ամպլիֆիկացնել ֆունկցիոնալ թթվային α -ամիլազ: Այդ գենի Eurofins-ի վերծանած նուկլեոտիդային հաջորդականության համաձայն *amy3500* գենը 98% նույնականություն է ցուցաբերել համեմատած *Bacillus* sp. KBS0812 շտամի α -ամիլազի գենի հետ (նկար 13), մինչդեռ նույն գեների կոդավորած սպիտակուցների ամինաթթվային հաջորդականությունների BLAST վերլուծությունը 98% նույնականություն է ցուցաբերում համապատասխան սպիտակուցների ամինաթթվային հաջորդականությունների միջև (GenBank-ի մուտքային համարը OK490393):

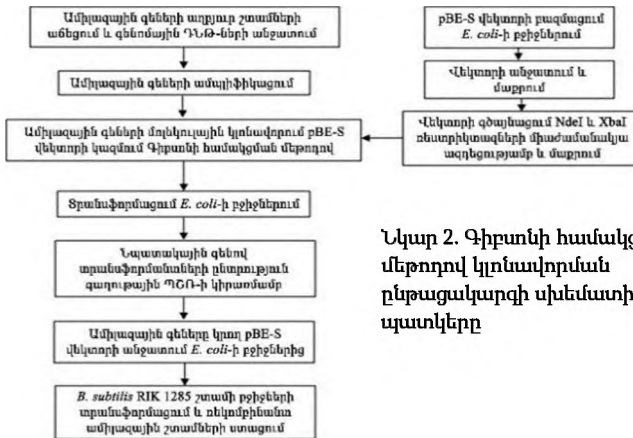
B. amyloliquefaciens MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեների մոլեկուլային կլոնավորում *E. coli* / *B. subtilis* pBE-S մաքրքային վեկտորի կազմում: α -Ամիլազի գեների կլոնավորման համար գենի աղբյուր հանդիսացող *B. amyloliquefaciens* MDC1974 և *B. subtilis* MDC3500 շտամերից նախ անջատվել են գենոմային ԴՆԹ-ները, հետագայում նախագծված պրայմերային զույգերի կիրառմամբ ՊՇՌ-ի մեթոդով հաջողությամբ ամպլիֆիկացվել են համապատասխան ամիլազի գեները (նկար 1 Ա, Բ):



Նկար 1. Կլոնավորվող *amy1974*, *amy1974sig* (Ա) և *amy3500*, *amy3500sig* (Բ) գեների ամպլիֆիկացման էլեկտրաֆորեզամբ:

Ա - (1- *amy1974*, 2- *amy1974sig*, 3-ԴՆԹ լադեր՝ NebTriDye™ 1 kb Plus), Բ - (1 - *amy3500*, 2, 3 - *amy3500sig*, L - ԴՆԹ լադեր): *amy1974* - 1449 ն.գ., *amy1974sig* - 1542 ն.գ. *amy3500* - 1878 ն.գ., *amy3500sig* - 1974 ն.գ.

Ստացված ամպլիկոններն օգտագործվել են pBE-S վեկտորի կազմում բուրբ չորս տիպի α -ամիլազի գեների կլոնավորման համար: *B. amyloliquefaciens* MDC1974 շտամի *amy1974sig* և *amy1974* և *B. subtilis* MDC3500 շտամի *amy3500sig* և *amy3500* α -ամիլազի գեների pBE-S մաքրքային վեկտորի կազմում կլոնավորումն իրականացվել է Գիբսոնի համակցման մեթոդի միջոցով, որի մեր կողմից մշակված և օպտիմալացված տարբերակի ընդհանուր ընթացակարգը սխեմատիկորեն ներկայացված է նկար 2-ում:

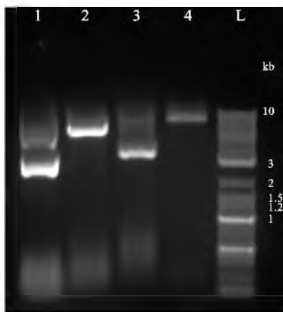


Նկար 2. Գիբսոնի համակցման մեթոդով կլոնավորման ընթացակարգի սխեմատիկ պատկերը

Նախապես յուրաքանչյուր գենի դեպքում որոշվել են ՊՇՌ-ի իրականացման պայմանները: Ռեկոմբինանտ պլազմիդների յուրաքանչյուրի կառուցման նպատակով

Էքսպրեսիոն մաքրային վեկտորը գծայնացվել է XbaI և NdeI ռեստրիկցիոն ֆերմենտներով, ընդ որում փորձարկվել են 2 ռեստրիկտազների միաժամանակյա և հերթականությամբ ռեակցիան իրականացնելու պայմանները: NdeI ռեստրիկտազով 37°C ջերմաստիճանում 1 ժ տևողությամբ ռեակցիայի արդյունքում գծայնացված վեկտորը հետագայում XbaI ֆերմենտով ռեստրիկցիայի է ենթարկվել նույն պայմաններում: Ռեակցիաների ավարտից հետո ռեստրիկտազները ինակտիվացվել են 65°C ջերմաստիճանում 20 րոպե տևողությամբ ինկուբացմամբ: Կլոնավորման ռեակցիոն խառնուրդում գծայնացված վեկտորը և ամպլիֆիկացված գենը խառնվել են 1:2 մոլային հարաբերակցությամբ, համապատասխանաբար 0,03 և 0,06 պիկոմոլ ռեակցիոն խառնուրդի 10 մկլ-ում: Այնուհետև իրականացվել է α -ամփլազի գենի կլոնավորման ռեակցիան՝ օգտագործելով NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix-ը 50°C ջերմաստիճանում, ըստ արտադրողի ցուցումների:

Արտադրողի կողմից առաջարկված 15 րոպե ինկուբացման ժամկետը մեր փորձերում անբավարար է եղել: Լրացուցիչ փորձերի արդյունքում արտադրողի կողմից առաջարկվող ռեակցիայի իրականացման 15 րոպեն երկարացվել է մինչև 40 րոպե: Ռեակցիան կանգնեցվել է սառցային բաղնիքում: Արդյունքում ստացվել են pBE-S_amy1974sig, pBE-S_amy1974, pBE-S_amy3500sig և pBE-S_amy3500 չորս տեսակի ռեկոմբինանտ պլազմիդները: *E. coli* Top10-ի բջիջներում բազմացված pBE-S և pBE-S_amy1974 պլազմիդների էլեկտրոֆորեզրամաները ներկայացված են նկար 3-ում:

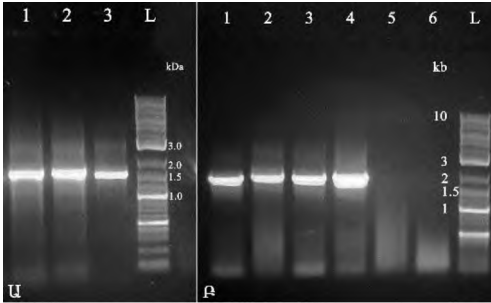


Նկար 3. *E. coli*-ի բջիջներում բազմացված pBE-S և pBE-S_amy1974 օղակաձև և գծայնացված պլազմիդների էլեկտրաֆորեզրամաները

(1)–ամբողջական pBE-S վեկտոր, (2)–XbaI ռեստրիկտազով կտրված pBE-S վեկտոր, (3)–pBE-S_amy1974 վեկտոր, (4)–XbaI ռեստրիկտազով կտրված pBE-S_amy1974 վեկտոր, (L)– λ -Ծ լադեր: pBE-S վեկտոր – 5938 ն.գ., pBE-S_amy1974 – 7387 ն.գ.

B. subtilis RIK 1285 շտամի բջիջների տրանսֆորմացմամբ *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների արտազատվող α -ամփլազի գեները կրող *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 ռեկոմբինանտ շտամների ստացում: α -Ամփլազն արտազատող շտամ-արտադրիչների ստացման նպատակով *E. coli*-ի բջիջներում բազմացված pBE-S_amy1974sig, pBE-S_amy1974, pBE-S_amy3500sig և pBE-S_amy3500 պլազմիդներով տրանսֆորմացվել են *B. subtilis* RIK1285 շտամի բջիջները: Հաշվի առնելով, որ *B. subtilis* RIK1285 շտամն ունի աուքոտրոֆություն լիզին և տրիպտոֆան ամինաթթուների նկատմամբ, այդ շտամի կոմպետենտ բջիջներ ստանալու փուլում «Takara Bio»-ի առաջարկված կազամինաթթուները փոխարինվել են 40-ական մգ/լ L-լիզինով և L-տրիպտոֆանով: Մեթոդի համաձայն կոմպետենտ բջիջներին ավելացվում է օղակաձև պլազմիդը և 90ր դանդաղ թափահարվում պտտական ճոճանակի վրա: Մեր կողմից իրականացված բազմաթիվ փորձերը ցույց են

տվել, որ տրանսֆորմացում տեղի է ունենում միայն 90 րոպե թափահարելուց հետո ևս 60 րոպե ստատիկ պայմաններում թողնելու պարագայում:

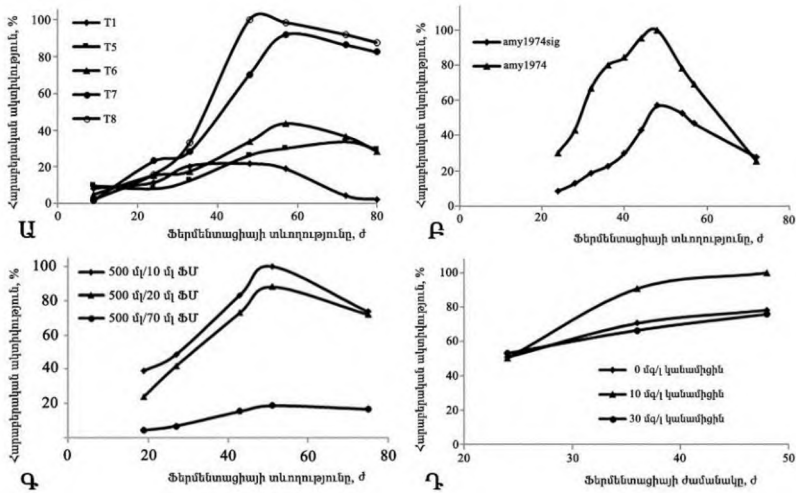


Նկար 4. *B. subtilis* RIK1285_amy1974sig, *B. subtilis* RIK1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK1285_amy3500sig և *B. subtilis* RIK1285_amy3500 տրանսֆորմանտների գաղութային ՊՇՈ-ի արդյունքները
 Ա-(1, 2) – amy1974sig, (3) – amy1974, (L) – Դ.Ն.Թ լաղեր, Բ-(1) – amy3500, (2-4) – amy3500sig, (L) – Դ.Ն.Թ լաղեր: amy1974sig – 1542 ն.գ., amy1974 – 1449 ն.գ., amy3500 – 1878 ն.գ., amy3500sig – 1974 ն.գ.

Նպատակային ամիլազների առավելագույն քանակների ստացման նպատակով *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 շտամների աճի միջավայրերի և ֆերմենտացման պայմանների օպտիմալացում: Ֆերմենտացման սննդամիջավայրի բաղադրության և պայմանների օպտիմալացումն ու ընտրությունն իրականացվել է օգտագործելով pBE-S_amy1974 առանց սեփական ազդանշանային պեպտիդ կրող շտամ-արտադրիչը [Soghomonyan, 2024]: Ֆերմենտացման միջավայրի և պայմանների օպտիմալացումը ներառում է ազոտի օրգանական աղբյուրի ընտրությունը, աերացիայի ինտենսիվությունը, կանամիցինի կոնցենտրացիան և ֆերմենտացման տևողությունը: Քանի որ նպատակային ամիլազների մյուս գեները կրող շտամ-արտադրիչները նույնպես կառուցվել են օգտագործվող էքսպրեսիոն համակարգի կիրառմամբ (pBE-S վեկտոր և *B. subtilis* RIK 1285 ռեցիպիենտ), ընտրված օպտիմալ պայմանները կիրառվել են ռեկոմբինանտ ամիլազների բոլոր շտամ-արտադրիչների դեպքում:

Նկար 5-ում ներկայացված են ռեկոմբինանտ շտամ արտադրիչների աճի և α -ամիլազի էքսպրեսիայի օպտիմալ պայմանների որոշման գրաֆիկները: Նկարից հետևում է, որ T7 և T8 միջավայրերը, համեմատած մյուս միջավայրերի հետ, ֆերմենտի զգալիորեն ավելի բարձր էքսպրեսիա են ապահովում: Ամիլազի ծավալային ակտիվությունը T8 սննամիջավայրում 48 ժամ անց հասնում է 740 միավոր/մլ արժեքին: Ստացված արդյունքներից հետևում է նաև, որ բոլոր հետազոտված միջավայրերում 48-րդ ժամի մոտակայքում ֆերմենտի ծավալային ակտիվության առավելագույն արժեք է դիտարկվում, որը հետագայում աստիճանաբար նվազում է: Նկար 5 Ա-ից հետևում է նաև, տրիպտոնի վրա հիմնված միջավայրերը (համեմատաբար ավելի մեծ չափսերի պեպտիդներ է պարունակում) համարժեք պայմաններում առավելություն ունեն պեպտոնի վրա հիմնված միջավայրերի նկատմամբ: Հետագայում որպես հիմք է ընդունվել ֆերմենտի առավելագույն էքսպրեսիա ապահովող խմորասնկային ավտոլիզատի վրա հիմնված T8 սննամիջավայրը: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ սեփական ազդանշանային պեպտիդի առկայության դեպքում (ամալիֆիկացվող գենում միաժամանակ առկա են լինում վեկտորից և ամիլազի գենից եկող ազդանշանային պեպտիդները) ֆերմենտի էքսպրեսիան մոտ երկու անգամ նվազում է: Դա կարող է կապված լինել կամ միևնույն արտազատման համակարգում երկու տարբեր ազդանշանային պեպտիդների պրոցեսինգի բարդությամբ, կամ էլ

տարբեր ֆերմենտների համար տեր օրգանիզմի կողմից տարբեր արտազատման համակարգերի գործարկմամբ:



Նկար 5. *Bacillus amyloliquefaciens* MDC1794 շտամի α -ամիլազի էքսպրեսիայի կախումը (Ա) – ֆերմենտման միջավայրում ազոտի աղբյուրի բնույթից, (Բ) – կլոնավորված գենում սեփական ազոտաշնային պեպտիդի առկայությունից, (Գ) – ֆերմենտման միջավայրի աերացիայի ինտենսիվությունից և (Դ) – միջավայրում կանամիցինի կոնցենտրացիայից
 (Ա) – 100 % ակտիվությունը համապատասխանում է *Amy1974*-ի 740 միավոր/մլ ծավալային ակտիվությանը, (Բ) – 100 % ակտիվությունը համապատասխանում է *Amy1974*-ի 1100 միավոր/մլ ծավալային ակտիվությանը, (Գ) – 100 % ակտիվությունը համապատասխանում է *Amy1974*-ի 1300 միավոր/մլ ծավալային ակտիվությանը, (ՏՄ՝ ֆերմենտման միջավայր) (Դ) – 100 % ակտիվությունը համապատասխանում է *Amy1974*-ի 1410 միավոր/մլ ծավալային ակտիվությանը:

Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ աերացիայի ինտենսիվությունը էապես նպաստում է *B. amyloliquefaciens* MDC1794 շտամի ռեկոմբինատ α -ամիլազի էքսպրեսմանը 51-րդ ժամին 500 մլ կուլթայում 10 մլ ֆերմենտման միջավայրի դեպքում հասնելով 1300 միավոր/մլ: Նկար 26-ում ներկայացված է α -ամիլազի էքսպրեսման կախումը կանամիցինի կոնցենտրացիայից: Սննդարար միջավայրում 10 մգ/լ կանամիցինի առկայության դեպքում 48-րդ ժամին դիտվել է 1410 միավոր/մլ ամիլազային ակտիվություն, իսկ առանց կանամիցինի և 30 մգ/լ կանամիցինի առկայության դեպքում դիտվել է այդ ակտիվության 75 %-ից ավելին, ինչը վկայում է «Takara Bio»-ի pBE-S վեկտորի վրա հիմնված էքսպրեսիոն համակարգի բարձր սեղրեզացիոն և կառուցվածքային կայունության մասին:

Ստացված α -ամիլազային չորս շտամները ֆերմենտացվել են ընտրված օպտիմալ պայմաններում, 48 ժ տևողությամբ: *B. subtilis* RIK1285 ռեցիպիենտ շտամի էլային ամիլազային ակտիվությունը գնահատելու համար, այն ֆերմենտացվել է մինևայն պայմաններում (բացի սննդարար միջավայրում կանամիցինի առկայությունից): Ստացված արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

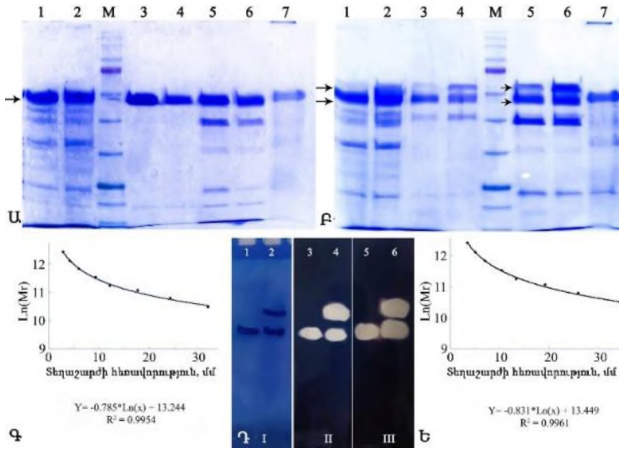
**Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների ստացված ակտիվությունները կուլտայում 48 ժամ
ֆերմենտացումից հետո**

Շտամ	α -ամիլազային	ակտիվություն
	Միավոր/մլ	Միավոր/մգ
<i>B. subtilis</i> RIK 1285_amy1974	1834±91	229,2±11.4
<i>B. subtilis</i> RIK 1285_amy1974sig	978±49	122,2±6.1
<i>B. subtilis</i> RIK 1285_amy3500	702±61	87,8±7.6
<i>B. subtilis</i> RIK 1285_amy3500sig	753±47	94,1±5.9
<i>B. subtilis</i> RIK 1285	25±7	3,1±0.9

Հետաքրքիր է, որ *B. subtilis* RIK 1285_amy1974-ի α -ամիլազային ակտիվությունը գրեթե կրկնակի ավել է եղել, համեմատած *B. subtilis* RIK 1285_amy1974sig-ի ակտիվության հետ: Պարզվել է, որ *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500sig շտամների ակտիվությունները մոտ են իրար: Այնուամենայնիվ, ստացված բոլոր չորս շտամներն էլ զգալիորեն ավելի բարձր α -ամիլազային ակտիվություն են ցուցաբերել ռեցիպիենտ շտամի համեմատ:

Կուլտուրալ հեղուկներից ռեկոմբինանտ α -ամիլազների մասնակի մաքրման մեթոդների մշակում: α -Ամիլազային պատրաստուկների մասնակի մաքրումը կատարվել է FPLC սարքավորմամբ ստացված բոլոր ֆրակցիաներում չափվել են ֆերմենտային ակտիվությունները: Ամիլազներից Amy1974 և Amy1974sig տարբերակներում հիմնական ֆերմենտային ակտիվությունը (ավելի քան 90%) դիտվել է 7-րդ և 8-րդ ֆրակցիաներում, ընդ որում 7-րդ ֆրակցիան ավելի շատ ակտիվություն է ցուցաբերել, Amy1974-ը՝ 1400 միավոր/մգ, իսկ Amy1974sig-ը՝ 1000 միավոր/մգ: Ամիլազներից Amy3500 և Amy3500sig տարբերակներում համանման ձևով հիմնական ֆերմենտային ակտիվությունը (ավելի քան 90%) դիտվել է 7-րդ և 8-րդ ֆրակցիաներում, ընդ որում 7-րդ ֆրակցիան ավելի շատ ակտիվություն է ցուցաբերել, որտեղ տեսակարար ակտիվությունների հետևյալ արժեքներն են գրանցվել Amy3500-ի դեպքում 500 միավոր/մգ, Amy3500sig-ի դեպքում 600 միավոր/մգ:

FPLC-ով մասնակիորեն մաքրված Amy1974-ի α -ամիլազները, համապատասխան ստուգիչների հետ միասին, բնութագրվել են SDS-PAGE եղանակով: Amy1974 և Amy3500 ռեկոմբինանտ ամիլազների զիմոգրամն իրականացվել է կուլտեր և մեթոդներ բաժնում նկարագրված ընթացակարգի համաձայն: Որպես նմուշներ ընտրվել են երկու ֆերմենտների FPLC-ով մաքրված 7-րդ ֆրակցիաները: α -Ամիլազների SDS-PAGE և զիմոգրամի արդյունքները ներկայացված են նկար 6-ում:

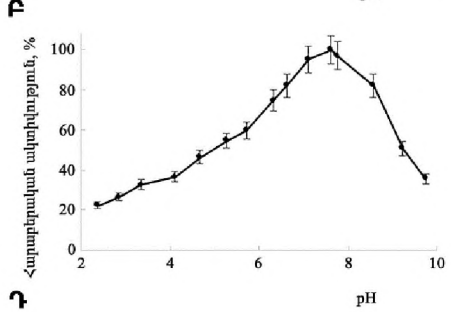
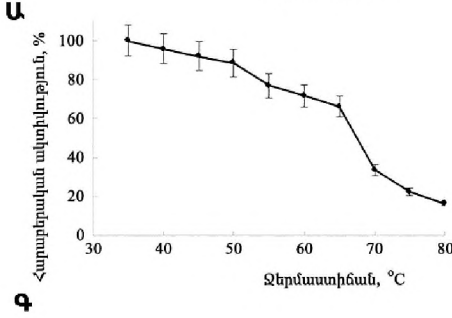
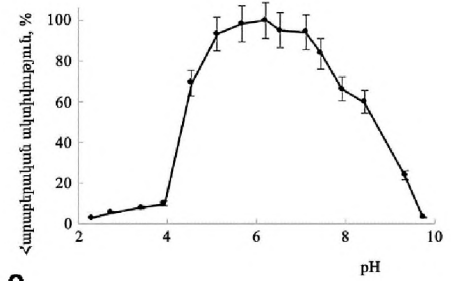
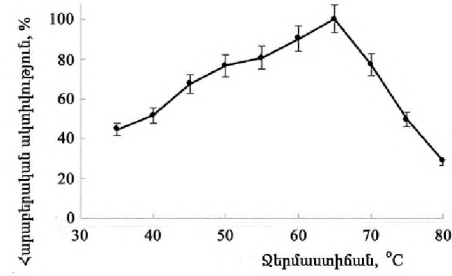


Նկար 6. α -Ամիլազների SDS-PAGE և զիմոգրամի արդյունքները.

Ա – Amy1974 և Amy1974sig ֆերմենտների SDS-PAGE (1 – Amy1974-ի կոպիտ ֆերմենտային պրեպարատ, 2 – Amy1974sig-ի կոպիտ ֆերմենտային պրեպարատ, M – սպիտակուցային մարկերներ, 3 – Amy1974-ի FPLC-ով մաքրված 7-րդ ֆրակցիա, 4 – Amy1974sig-ի FPLC-ով մաքրված 7-րդ ֆրակցիա, 5 – Amy1974-ի FPLC-ով մաքրված 8-րդ ֆրակցիա, 6 – Amy1974sig-ի FPLC-ով մաքրված 8-րդ ֆրակցիա, 7 – B.

subtilis RIK1285-ի չմշակված արտաբջջային սպիտակուցներ: Բ – Amy3500 պատրաստուկների SDS-PAGE (1 – Amy3500-ի կոպիտ ֆերմենտային պրեպարատ, 2 – Amy3500sig-ի կոպիտ ֆերմենտային պրեպարատ, 3 – Amy3500-ի 7-րդ ֆրակցիա, 4 – Amy3500sig-ի 7-րդ ֆրակցիա, M – սպիտակուցային մարկերներ, 5 – Amy3500-ի 8-րդ ֆրակցիա, 6 – Amy3500sig-ի 7-րդ ֆրակցիա, 7 – RIK1285-ի չմշակված արտաբջջային սպիտակուցներ, Գ – Տրամաչափման կոր Amy1974 տարբերակների մոլեկուլային կշիռների հաշվարկման համար, Դ – Amy1974 (1, 3, և 5) և Amy3500 (2, 4 և 6) α -ամիլազների զիմոգրամները, որտեղ I-ը ներկայացնում է Նատիվ PAGE-ը, իսկ II-ը և III-ը զիմոգրամներն են՝ համապատասխանաբար 10 րոպե և 20 րոպե ինկուբացումներից հետո, Ե – տրամաչափման կոր Amy3500 տարբերակների մոլեկուլային կշիռների հաշվարկման համար:

Մինթեզված արտազատվող ռեկոմբինանտ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնութագրերի ուսումնասիրում: Հետազոտվել են ստացված ռեկոմբինանտ Amy1974 և Amy3500 α -ամիլազների մի շարք կատալիտիկ բնութագրեր, ինչպիսիք են՝ ֆերմենտի ակտիվության կախումը ջերմաստիճանից և միջավայրի pH-ից, ջերմակայունությունը, ջերմակայունության կախումը միջավայրի pH-ից: Այդ ցուցանիշների իմացությունը կարևոր է ֆերմենտների արդյունավետ կիրառման ոլորտները ուրվագծելու համար: Amy1974 α -ամիլազի մի շարք ֆիզիկաքիմիական պարամետրեր բերված են նկար 7-ում: Ինչպես երևում է նկար 7-Ա-ից, Amy1974 α -ամիլազն ունի ակտիվության լայն տիրույթ՝ 50°C-ից մինչև 70°C ջերմաստիճանային միջակայքում: Ֆերմենտն իր առավելագույն ակտիվությանն է հասնում 65°C ջերմաստիճանում: Ֆերմենտային ակտիվության pH-ից կախվածության ուսումնասիրություններից պարզ է դառնում, որ վերջինս բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում pH-ի լայն տիրույթում՝ 4,7-ից 7,9, իսկ առավելագույն ակտիվությունը դիտվում է pH 6,5-ում: Ինչպես ցույց է տրված նկար 7-ում, Amy1974 ֆերմենտն ավելի մեծ կայունություն է ցուցաբերում pH-ը 6,5-ից 8,2 տիրույթում, իսկ առավելագույն ջերմակայունությունը ֆերմենտը ցուցաբերում է pH 7,6-ում:

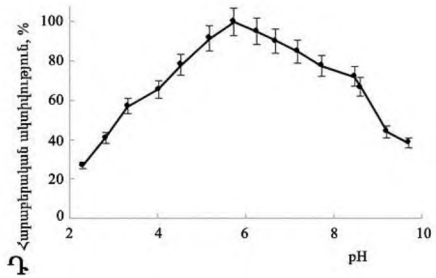
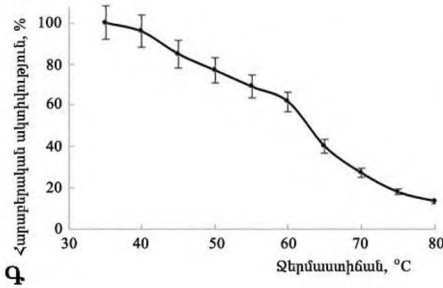
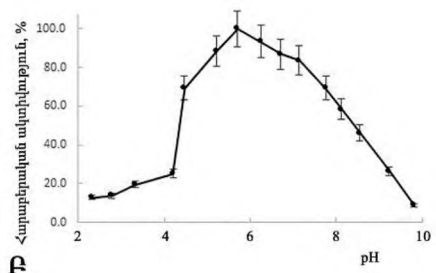
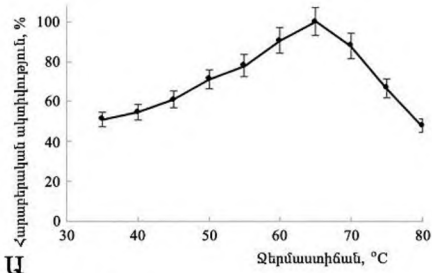


Նկար 7. Amy1974 α-ամիլազի կատալիտիկ բնութագրերը.

(U) – ակտիվության կախումը ջերմաստիճանից, (P) – ակտիվության կախումը pH-ից, (F) – ջերմակայունությունը, (G) – ջերմակայունության կախվածությունը pH-ից

Amy3500 α-ամիլազի մի շարք ֆիզիկաքիմիական պարամետրեր բերված են նկար 8-ում: Ինչպես երևում է նկար 8-ի (U)-ից Amy3500 α-ամիլազն ունի ակտիվության լայն տիրույթ՝ 60°C-ից 70°C ջերմաստիճանային միջակայքում, առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում 65°C ջերմաստիճանում: Ֆերմենտային ակտիվության pH-ից կախվածության ուսումնասիրություններից պարզ է դառնում, որ վերջինս բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում pH-ի լայն տիրույթում՝ 5-ից 7,5, իսկ առավելագույնը pH 5,8-ում (P):

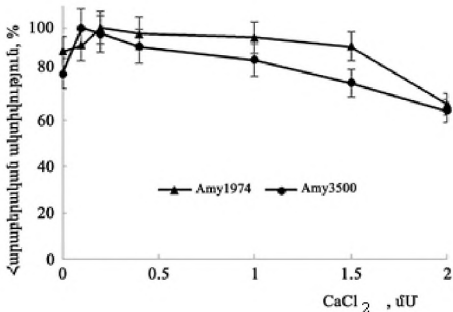
Նկար 8-ի (F)-ում ներկայացված է Amy3500 α-ամիլազի ջերմակայունությունը տարբեր ջերմաստիճաններում 20 րոպե ինկուբացման դեպքում: Այն իրենից ներկայացնում է նվազող կոր, որտեղ ֆերմենտի ակտիվությունը 35°C-ից մինչև 65°C միջակայքում նվազում է գրեթե 39%-ով: 20 րոպե ինկուբացման արդյունքում ֆերմենտային ակտիվության 50% նվազումը դիտվել է 63°C ջերմաստիճանում: Amy3500 ֆերմենտն բարձր ջերմակայունություն է ցուցաբերում pH-ը 4,7 - 7,7 տիրույթում, իսկ առավելագույն ջերմակայունությունը՝ pH 5,9-ում, ինչը ցույց է տալիս, որ ֆերմենտի ջերմակայունությունը կախված pH-ից Amy1974-ի համեմատ զգալիորեն տեղաշարժված է pH-ի թթվային տիրույթ:



Նկար 8. Amy3500 α -ամիլազի կատալիտիկ բնութագրերը.

(U) – ակտիվության կախումը ջերմաստիճանից, (P) – ակտիվության կախումը pH-ից, (Q) – ջերմակայունությունը, (R) – ջերմակայունության կախվածությունը pH-ից

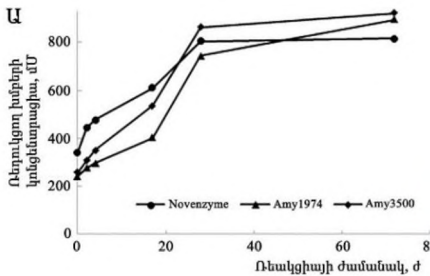
Amy174 և Amy3500 ֆերմենտների գործունեության վրա Ca^{2+} կոնցենտրացիայի ազդեցության ուսումնասիրությունը ներկայացված է նկար 9-ում: Ստացված արդյունքներից հետևում է, որ Amy174-ը առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում 0,2 մՄ, իսկ Amy3500-ը՝ 0,1 մՄ, Ca^{2+} -ի կոնցենտրացիայի դեպքում:



Նկար 9. Amy174 և Amy3500 գործունեության վրա Ca^{2+} իոնների ազդեցությունը

Օսլայի հիդրոլիզի խորությունը գնահատվել է Amy174 և Amy3500 ստացված α -ամիլազները համեմատելով Novozymes Liquoflow® Go 2X α -ամիլազի հետ: Հետազոտվող երեք ամիլազների դեպքում էլ համանմանորեն նկատվել է, որ օսլայի հիդրոլիզի գործընթացը սկսում է մոտ 24 ժամ, որից հետո մինչև 72 ժամ ինկուբացնելուց հետո ռեդուկցվող խմբերի շոշափելի ավելացում տեղի չի ունենում նկար 10 (Ա):

Հիդրոլիզի սկզբնական ժամերին տեղի է ունենում օսլայի դոնորդի հեղուկացում, որին հաջորդում է շաքարացման գործընթացը: Օսլայի հիդրոլիզի արդյունքում գոյացած պրոդուկտները արձանագրվել են բարձրարդյունավետ նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիական թիթեղի վրա նկար 10 (F):



Նկար 10. Ռեդուկցվող խմբերի առաջացման դինամիկան (U) և HPTLC նշագրման պատկերը 72 ժ օսլայի սուսպենզիաների հիդրոլիզից հետո (F)

Նկարի (F) մասում 1 - Amy1974 ֆերմենտով հիդրոլիզված 2%-ոց օսլայի ռեակցիոն խառնուրդ, 2 - Amy3500 ֆերմենտով հիդրոլիզված 2%-ոց օսլայի ռեակցիոն խառնուրդ, 3 -

D-մալթոզ, 4-D-գլյուկոզ, 5 - Novozymes Liquoflow® Go 2X ֆերմենտով հիդրոլիզված 15%-ոց ռեակցիոն խառնուրդ, 6- Amy1974 ֆերմենտով հիդրոլիզված 15%-ոց օսլայի ռեակցիոն խառնուրդ, 7 - Amy3500 ֆերմենտով հիդրոլիզված 15%-ոց օսլայի ռեակցիոն խառնուրդ:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ թեև Novozymes Liquoflow® Go 2X α -ամիլազը սկզբում ցուցաբերում է ավելի բարձր ակտիվություն (դոնորդացումից անմիջապես հետո), սակայն Amy1974 և Amy3500 α -ամիլազները հիդրոլիզի ռեակցիայի ընթացքում հասնում և գերազանցում են Novozymes-ի ֆերմենտի ռեակցիայի խորությանը (նկար 10(U): Բացի այդ, HPTLC-ից հետևում է, որ Amy1974 և Novozymes Liquoflow® Go 2X α -ամիլազների առաջացրած վերջնական պրոդուկտները գրեթե նույնական են, իսկ Amy3500-ի դեպքում օսլան գրեթե ամբողջությամբ փոխակերպում է գլյուկոզի:

Աղյուսակ 2.

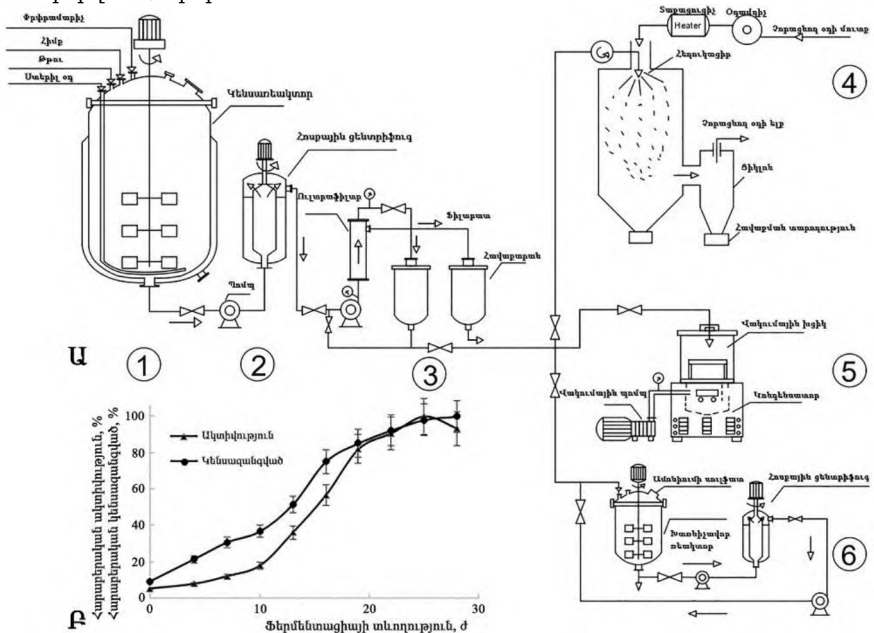
Amy1974-ի և Amy3500-ի α -ամիլազների սուբստրատային սպեցիֆիկությունները

Սուբստրատ	Հարաբերական ակտիվություն	
	Amy1974	Amy3500
Եզիպտացորենի օսլա	*100,0	*100,0
Եզիպտացորենի ամիլոպեկտին	77,2	257,3
Կարտոֆիլի ամիլոզ	47,9	107,3
Բրնձի օսլա	101,7	55,5
Կարտոֆիլի օսլա	99,3	95,7
Կարտոֆիլի օսլա (Zulkowsky)	91,5	147,9
Եզիպտացորենի լուծելի օսլա	58,5	49,6
α -Ցիկլոդեքստրին	0,7	2,7
β -Ցիկլոդեքստրին	1,0	4,0
γ -Ցիկլոդեքստրին	2,1	3,8

*100% ակտիվությունը Amy1974 և Amy3500 α -ամիլազների համապատասխանաբար 1834 միավոր/մլ և 702 միավոր/մլ ակտիվություններ

Քանի որ α -ամիլազների արդյունաբերական կիրառությունների համար կարևոր ցուցանիշ է հանդիսանում սուբստրատային սպեցիֆիկությունը, ուստի ուսումնասիրվել է տարբեր սուբստրատների նկատմամբ Amy1974 և Amy3500 α -ամիլազների ակտիվությունները: Արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում:

Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների փորձարարական արտադրության արդյունավետ տեխնոլոգիաների մշակում: Ռեկոմբինանտ *B. subtilis* RIK1285_amy1974-ը ֆերմենտացվել է 100լ սննդարար միջավայրում մինչև առավելագույն ծավալային ակտիվության 1969 միավոր/մլ հասնելը, որը արձանագրվել է 25-րդ ժամին, ի տարբերություն կոլբայում կատարված գործընթացի, որտեղ առավելագույն ակտիվությունը 1410 միավոր/մլ ստացվել է 48-րդ ժամին: Գործընթացի ընթացքում ամեն 3 ժամը մեկ իրականացվել է նմուշառում, հետագայում նմուշներում չափվել են ծավալային ակտիվությունները և կենսազանգվածի աճը: Ստացված տվյալների հիման վրա ուսումնասիրվել և կառուցվել են ֆերմենտացման տևողությունից կախված ծավալային ակտիվության և կենսազանգվածի աճի կորերը (նկար 11. Բ): Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների արտադրության, կենսազանգվածի հեռացման, կոնցենտրացման, չորացման և ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացման ապարատատեխնոլոգիական սխեման բերված է նկար 11. Ա-ում:



Նկար 11. Ռեկոմբինանտ α -ամիլազների արտադրության, չորացման տեխնոլոգիական սխեման (Ա) և կենսազանգվածի աճի և α -ամիլազի ծավալային արտադրության կինետիկան (Բ)

Նկարի (Ա) մասում՝ 1 - կենսառեակտոր α -ամիլազի արտադրության համար, 2 - անընդհատ հոսքով ցենտրիֆուգ կենսազանգվածի և ակրոմելի զանգվածների հեռացման համար,

3 – ուլտրաֆիլտրացիոն համակարգ կուլտուրալ հեղուկից ֆերմենտների խտացման համար, 4 – հեղուկացրային չորացման համակարգ, 5 –լիոֆիլ չորացման համակարգ, 6 – ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացման տեղակայանք:

Բջիջների աճի առավելագույն արագությունը դիտվել է 16-րդ ժամին, հասնելով 0,153 գ/լ/ժ արժեքի՝ հաշված չոր քաշի վրա: Հետագայում հասնելով առավելագույն արժեքին բջիջների աճի արագությունը սկսել է աստիճանաբար նվազել, մինչդեռ α -ամիլազի ծավալային արտադրության արագությունը շարունակել է աճել՝ 19-րդ ժամում հասնելով ֆերմենտի առավելագույն ծավալային արտադրության 167 միավոր/մլ/ժ: Գործընթացի ավարտին կուլտուրալ հեղուկը ցենտրիֆուգվել է հոսքային ցենտրիֆուգով, ինչի արդյունքում ստացվել է 4,64 կգ թաց բակտերիալ կենսազանգված և 90 լ կուպիտ ֆերմենտային պրեպարատ՝ 1969 միավոր/մլ ծավալային ակտիվությամբ: Այսպիսով ստացվել է ընդհանուր 177,2 միլիոն միավոր α -ամիլազային ակտիվություն:

Աղյուսակ 3.

Amy1974 α -ամիլազի խտացման և պահպանման տարբեր մեթոդների համեմատություն

Փուլ	V, L	Սպիտակուցի կոնցենտրացիա, մգ/մլ	Էսավարար ակտիվություն միավոր/մգ	Ծավալային ակտիվություն միավոր/մլ	Ակտիվություն *10%, միավոր	Ակտիվության ելքը փուլային, %	Ընդհանուր ակտիվություն ելքը, %
Կուպիտ ֆերմենտային պրեպարատ	90,0	9,6	205	1969	177,2	100,0	100,0
Ուլտրաֆիլտրացիա	14,3	32,4	370	11977	171,3	96,6	96,6
Լիոֆիլ չորացում (2 % սախարոզով)	1,0	37,1	290	10748	10,7	89,7	86,7
Լիոֆիլ չորացում (2 % օսլայով)	1,0	40,3	308	12415	12,4	103,7	100,2
Հեղուկացրային չորացում	1,0	51,6	170	8794	8,8	73,4	70,9
Հեղուկացրային չորացում (2% օսլայով)	1,0	36,6	281	10287	10,3	85,9	83,0
Ամ.Սուլֆ. հագեցում, 0-30 %	2,0	48,0	124	5950	11,9	9,9	-
Ամ.սուլֆ. հագեցում, 30-60 %	2,0	31,0	1344	41650	83,3	69,5	67,1
Ամ.սուլֆ. 60% հագեցման վերնստ.	10,0	18,4	162	2975	29,8	24,8	-

« - » տվյալները բացակայում են:

B. subtilis RIK 1285_amy1974-ի 25 ժամ ֆերմենտացումից ստացված 90 լ կուլտուրալ հեղուկն ուլտրաֆիլտրմամբ խտացվել է 6,3 անգամ, որի արդյունքում ստացվել է 14,3 լ ծավալով արտաբջջային α -ամիլազ: Ստացված կուպիտ ֆերմենտային պրեպարատի համար ուսումնասիրվել են պահպանման տարբեր ընթացակարգեր (չորացման տարբեր ռազմավարություններ և ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացում) [Soghomonyan et al., 2024]: Խտացված ֆերմենտային պատրաստուկի 2 լիտրը ենթարկվել է լիոֆիլ չորացման

(1 լիտրում 2% սախարոզ, 1 լիտրում 2% օսլա), և 2 լ ենթարկվել է հեղուկացրային չորացման (1 լիտրում 2% օսլա, 1 լ առանց որևէ հավելման): Մնացած 10 լ խտացված ֆերմենտային լուծույթը ֆրակցիոնացվել է ամոնիումի սուլֆատով: Պահպանման տարբեր ընթացակարգերի արդյունքները և վերլուծությունները ամփոփված են աղյուսակ 3-ում, որտեղ երևում է, որ ուլտրաֆիլտրման փուլում պահպանվում է ֆերմենտի ակտիվության 96,6 %-ը, ապահովելով 171,3 միլիոն միավոր ընդհանուր ակտիվություն: Լիոֆիլ չորացման դեպքում փուլային ակտիվությունը 2% սախարոզը որպես հավելում օգտագործելու դեպքում կազմել է 89,7 %, իսկ 2 % օսլայի դեպքում 103,7 %: Ընդհանուր ակտիվության ելքը սկզբնականի համեմատ համապատասխանաբար կազմել են 86,7% և 100,2%: Հեղուկացրային չորացման դեպքում փուլային ակտիվությունը կազմել է 73,4% առանց օսլայի և 85,9%՝ 2% օսլայի հավելումով տարբերակի դեպքում: Ընդհանուր ակտիվության ելքը սկզբնականի համեմատ համապատասխանաբար կազմել է 70,9% և 83,0%: Ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացումը իրականացվել է երկու փուլով՝ 0% -ից 30% հազեցվածություն և 30% -ից 60% հազեցվածություն: Յուրաքանչյուր փուլից հետո ստացված նստվածքը կրկին վերասուսպենզացվել է 2000 մլ 0,02 Մ ֆոսֆատային բուֆերի մեջ (pH 7,5): Ֆերմենտային ակտիվության հիմնական մասը դիտվել է 30% -ից մինչև 60% ամոնիումի սուլֆատի հազեցվածությամբ ֆրակցիայում, որի արդյունքում փուլային և ընդհանուր ակտիվության ելքերը համապատասխանաբար կազմել են 69,5% և 67,1%: Ֆրակցիոնացման արդյունքում Amy1974 α -ամիլազը զգալիորեն մաքրվել է՝ հասնելով 1344 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվության: Այսպիսով, ստացված տվյալներից կարելի է փաստել, որ ռեկոմբինանտ Amy1974 α -ամիլազի ինչպես լիոֆիլ, այնպես էլ հեղուկացրային չորացման ժամանակ 2% օսլայի առկայությունը մեծացնում է և ֆերմենտի կայունությունը և ակտիվության ելքը:

α -Ամիլազի պիտտային արտադրության տեխնիկատնտեսական հաշվարկ: «Վիպեկո ԱՄ» ՍՊԸ-ում իրականացված ռեկոմբինանտ *B. subtilis* RIK 1285_ amy1974 ամիլազային շտամի 100 լ ծավալով փորձարարական ֆերմենտացման և ստացված ֆերմենտային հեղուկի հետագա խտացման, չորացման և մասնակի մաքրման արտադրական գործընթացների համար իրականացվել է տեխնիկատնտեսական հաշվարկ, որի արդյունքում յուրաքանչյուր վերջնական ապրանքային տեսքի համար հաշվարկվել է նյութական ինքնարժեքը: Որպես համեմատական արժեք է ընդունվել 1 միլիոն միավոր ամիլազի ծավալային ակտիվության ստացման վրա կատարված ծախսերը (միավոր ծախսեր): Նյութական ինքնարժեքն իր մեջ չի ներառում սարքավորումների ամորտիզացիոն հատկացումները, աշխատուժի և վերադիր ծախսերը: Հաշվարկվել են գործընթացների ընթացքում ծախսվող էլեկտրաէներգիայի քանակը և արժեքը, ֆերմենտացման T9 սննդամիջավայրի ինքնարժեքը, չորացման և խտացման տարբերակներից յուրաքանչյուր ինքնարժեքները: Ամփոփելով կատարված հաշվարկները ստացված 3 տեսակի α -ամիլազային պատրաստուկների ապրանքային տեսքերի համար էներգետիկ և սննդամիջավայրերի գումարային ծախսերով հանդերձ միավորի համար ստացվում են հետևյալ նյութական ինքնարժեքները՝ հեղուկացրային չորացված ֆերմենտային պատրաստուկի դեպքում՝ 191,5 դրամ, լիոֆիլ չորացվածի դեպքում՝ 315,7 դրամ և ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացված հեղուկ ֆերմենտային պատրաստուկի դեպքում՝ 342,4 դրամ:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Գիբսոնի համակցման մեթոդի կիրառմամբ *B. amyloliquefaciens* MDC 1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α -ամիլազի գեները կլոնավորվել են *E. coli* / *B. subtilis* pBE-S մաքոքային վեկտորի կազմում և ստացված պլազմիդներով *B. subtilis* RIK 1285 շտամի բջիջների տրանսֆորմացմամբ ստացվել է արտազատվող α -ամիլազների գեները կրող *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 շտամ-արտադրիչները:
2. Takara Bio-ի pBE-S արտազատող վեկտորում կլոնավորված α -ամիլազի գեների առավելագույն էքսպրեսիան համար մշակվել է արդյունավետ սննդամիջավայր, և ընտրվել են ֆերմենտացման օպտիմալ պայմաններ: Ընտրված պայմաններում 48 ժամ ֆերմենտացման արդյունքում կուլտուրալ հեղուկում կուտակվել է Amy1974-ի 1834 միավոր/մլ և Amy3500-ի 702 միավոր/մլ ծավալային ակտիվություն:
3. Ցույց է տրվել, որ pBE-S արտազատող վեկտորում առկա ազդանշանային պեպտիդից բացի α -ամիլազների սեփական ազդանշանային պեպտիդի առկայությունը չի ազդում արտազատվող ֆերմենտի ֆիզիկաքիմիական բնութագրերի վրա: Միաժամանակ ցույց է տրվել, որ եթե *B. subtilis*-ի բջիջներից արտազատման արդյունքում Amy1974 α -ամիլազը մնում է ինտակտ, ապա Amy3500 α -ամիլազը մոլեկուլի C-ծայրից կորցնում է 4,9 կԴա կամ 13,9 կԴա չափի կտոր, ինչը սակայն չի ազդում ֆերմենտի կատալիտիկ բնութագրերի վրա:
4. Հետազոտվել են Amy1974 և Amy3500 ռեկոմբինանտ α -ամիլազների մի շարք կատալիտիկ բնութագրեր: Ցույց է տրվել, որ երկու ֆերմենտներն էլ գործում են ջերմաստիճանի և pH-ի լայն տիրույթում, ջերմակայուն են: Amy1974-ի համեմատ Amy3500-ի մոտ դիտվում է pH-ի օպտիմումի և ջերմակայունության pH կախվածության շեղում դեպի թթվային տիրույթ, և վերջինս ջերմակայուն է pH-ի ավելի լայն տիրույթում: Սուբստրատային սպեցիֆիկության առումով, եթե Amy1974-ը ընդգծված թույլ ակտիվություն է ցուցաբերում կարտոֆիլի ամիլոզի առկայությամբ, ապա Amy3500-ը ընդգծված կերպով ակտիվ է եգիպտացորենի ամիլոպեկտինի և կարտոֆիլի ժուլկովսկու օսլայի առկայությամբ:
5. Արտադրականին մոտ պայմաններում (15% օսլա) հետազոտվել է նկարագրված α -ամիլազների օսլան հիդրոլիզելու ռեակցիայի խորությունը: Ցույց է տրվել, որ Amy1974-ը հիդրոլիզի ռեակցիայի վերջնարդյունքում օսլան փոխակերպում է մատուցելու արտոքների, մինչդեռ Amy3500-ն օսլան գրեթե ամբողջովին փոխակերպում է գլյուկոզի:
6. Մշակվել է արտազատվող α -ամիլազի պիլոտային արտադրության (ֆերմենտացում, կենսազանգվածի հեռացում, կուլտուրալ հեղուկի խտացում, չոր կամ հեղուկ պատրաստումների ստացում) տեխնոլոգիա: Ստեղծվել են ռեկոմբինանտ α -ամիլազների հեղուկացրային և լիոֆիլ չորացման արդյունավետ տեխնոլոգիաներ, ինչպես նաև ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացմամբ բարձր ելքով մասնակիորեն մաքրված պրեպարատների ստացման տեխնոլոգիաներ:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

1. Khoyetsyan L., **Soghomonyan T.**, Izmailyan M., Paloyan A., Hambardzumyan A. Large-scale production of recombinant intracellular alpha-amylase of *Bacillus* sp. MDC 3500. Book of Abstracts of International Scientific and Practical Conference “Biotechnology: Science and Practice, Innovation and Business”, October 20-22, 2021, Yerevan, Armenia, ISBN 978-9939-1-1354-8, p. 51.
2. **Soghomonyan T.** Extracellular expression of the alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* MDC1974 strain using *Bacillus subtilis* RIK1285 cells. Bulletin of High Technology (Natural Sciences) N1 (29) 2024, pp. 15-24. [DOI:10.56243/18294898-2024.1-15](https://doi.org/10.56243/18294898-2024.1-15)
3. Ghevondyan D., **Soghomonyan T.**, Hovhannisyanyan P., Margaryan A., Paloyan A., Birkeland N.K., Antranikian G., Panosyan H. Detergent-resistant α -amylase derived from *Anoxybacillus karvacharensis* K1 and its production based on whey. Sci Rep 14, 2024.12682 [DOI:10.1038/s41598-024-63606-7](https://doi.org/10.1038/s41598-024-63606-7) (IF 3.8, Scopus)
4. **Soghomonyan T.**, Khoyetsyan L., Paloyan A., Hambardzumyan A. Development of technology for pilot-scale production, drying, and storage of extracellularly expressed recombinant Amy1974 alpha-amylase. Bulletin of High Technology (Natural Sciences) N2 (30) 2024. pp. 28-38. [DOI:10.56243/18294898-2024.2-28](https://doi.org/10.56243/18294898-2024.2-28)

SOGHOMONYAN TIGRAN MERUZHAN

PRODUCTION OF TECHNOLOGICALLY VALUABLE RECOMBINANT α -AMYLASE STRAINS-PRODUCERS FROM BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* AND CHARACTERIZATION OF THE CORRESPONDING ENZYMES

SUMMARY

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus subtilis*, α -amylases of industrial importance; *E. coli*/*B. subtilis* shuttle vector; extracellular expression; fermentation; catalytic properties; starch hydrolysis

In this dissertation work, the extracellular expression and characterization of two amylases, Amy1974 from *B. amyloliquefaciens* MDC1974 and Amy3500 from *B. subtilis* MDC3500, are presented. Both amylases belong to the glycosyl hydrolase family 13 by their catalytic domain (IPR006047) and have different C-terminal all-beta domains, with an additional substrate-binding domain in the case of the *B. subtilis* enzyme, according to InterPro analysis.

Cloning of the desired genes was carried out using Gibson assembly with the NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. Unlike other cloning methods, Gibson assembly does not require the researcher to cut the target gene amplicon with restriction enzymes. This is beneficial, as the additional step required by alternative cloning methods can be problematic if the target gene contains restriction sites necessary for cloning.

The nature of the signal peptide has a crucial effect on the mode and quantity of target protein secretion. In this study, the Takara proprietary pBE-S *B. subtilis*/*E. coli* shuttle vector, which carries

the AprE protease signal peptide, was used for the cloning and future secretory expression of the amy1974 and amy3500 α -amylase genes (which have their own signal peptide motifs in their sequences). We utilized the opportunity to obtain variants with the AprE signal peptide, either in conjunction with or without the cloned amylase signal peptides, and subsequently studied the effect on the secretion of the target enzymes. Bioinformatics analyses revealed that all three signal peptides – AprE, Amy1974, and Amy3500 – belong to the same Sec/SPI type of signal peptides, with probabilities of 0.77, 0.86, and 0.95, respectively, according to SignalP-5.0 software calculations. SDS-PAGE analysis indicated identical molecular weights for both α -amylases, regardless of the presence of their own signal peptide in the final plasmid construct. However, fermentations revealed nearly a two-fold increase in the final volumetric activity of Amy1974 without its own signal peptide compared to the variant with double signal peptides, whereas the Amy3500 amylase signal peptide variants exhibited nearly the same volumetric activity. PrsA, a post-translocation chaperone, assists in the folding of proteins secreted through the Sec secretion system in microbes of the *Bacillus* genus. Therefore, the observed anomalies related to the α -amylase signal peptide form may be associated with this chaperone.

SDS-PAGE analysis of recombinant Amy1974 and Amy3500 α -amylase samples, with and without their own signal peptides in the respective plasmid constructs, indicates a clear shortening of both variants of Amy3500 to the same extent, while Amy1974 remains intact after secretion. Moreover, Amy3500 is secreted in 2 shortened forms, with molecular weights of 64.0 and 55.0 kDa, instead of the expected variant at 68.8 kDa when the signal peptide part is removed after secretion. This corresponds to a shortening of nearly 42 and 121 amino acids from the C-terminus for the 64.0 and 55.0 kDa variants, respectively. It should also be noted that, in the case of Amy3500 (variant without its own signal peptide), the majority of the enzyme is in the 55.0 kDa form, whereas in the case of Amy3500 with its own signal peptide, the ratio of the 64.0 and 55.0 kDa forms is nearly 3 to 5. The suggestion that both forms of Amy3500 possess enzymatic activity is clearly illustrated for the 7th FPLC fraction in Figure 6 B. This phenomenon is widespread among α -amylases, which, in addition to the obligatory A (catalytic), B (loop), and C (all-beta) domains, possess a C-terminal substrate-binding domain.

In flask fermentations, the α -amylase activity of *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 was estimated to reach 1834 U/ml, while the activity of *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 reached 702 U/ml after 48 hours of fermentation. However, under production conditions in a submerged 250 L bioreactor during pilot-scale fermentation, the volumetric activity of the *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 strain reached 2000 U/ml after 25 hours of fermentation.

The study of the effect of Ca^{2+} concentration on Amy1974 and Amy3500 activities, along with dialysis data, indicates a low activating effect of Ca^{2+} on both α -amylases. However, X-ray crystal analysis reveals the presence of 8 Ca^{2+} ions in the *B. amyloliquefaciens* pdb 3bh4 α -amylase structure, which is 100% identical to Amy1974 in amino acid sequence, and the presence of 3 Ca^{2+} ions in the *B. subtilis* pdb 1ua7 α -amylase structure, which is 100% identical to Amy3500 in amino acid sequence. This observation may indicate the existence of tightly bound Ca^{2+} ions in the studied α -amylase structures, which explains the low activating effect of Ca^{2+} on both α -amylases.

The comparison of the catalytic characteristics of Amy1974 and Amy3500 α -amylases with similar enzymes known in the literature highlights the advantages of the enzyme preparations obtained in this study, particularly in terms of their working pH and relatively wide ranges of pH-

dependent thermostability. Additionally, these enzymes are moderately thermophilic and exhibit broad operating temperature ranges. The enzymes studied in this investigation exhibited broad activity peaks between 45-70°C, with a maximum at 65°C. The Amy1974 and Amy3500 α -amylases demonstrated broad pH optima and pH-dependent thermostability, with optimum pH values at 6.5 and 5.8, and thermal stability peaks at pH 7.6 and 5.9, respectively. Both α -amylases displayed high relative activity against various starches, including corn amylopectin and potato amylose, while showing comparatively lower activity towards cyclodextrins.

The α -amylases presented in this dissertation work show interesting behavior in terms of the depth of the starch hydrolysis reaction. While Amy1974 hydrolyzes starch, similar to the Novozymes preparations used in production, to short dextroses and maltose, Amy3500 α -amylase converts starch almost completely to glucose. This is an important factor in terms of obtaining high-glucose-containing syrups from starch using only an α -amylase.

Cell growth and enzyme production parameters were monitored over the culturing time in a 250 L fermenter to better understand the kinetics of cell growth and α -amylase production. The results indicate that the maximum rate of cell growth is observed at the 16th hour, reaching a value of 0.153 g/L/h for dry weight. Following this peak, the cell growth rate began to gradually decrease, while the rate of α -amylase volumetric production continued to rise, reaching a maximum volumetric enzyme production of 167 U/mL/h at 19 hours.

The supernatant of *B. subtilis* RIK 1285_amy1974, grown in the bioreactor for 28 hours, yielded 90 L of culture liquid, which was concentrated 6.3 times via ultrafiltration, resulting in a volume of 14.3 L. The extracellular α -amylase concentrated by ultrafiltration was subjected to various conservation procedures (different drying techniques and ammonium sulfate precipitation). The ultrafiltration step achieves a total activity recovery of 96.6%, yielding 171.3 million units of total activity*_h.

In the lyophilization step, the step yields were 89.7% and 103.7% in the presence of 2% sucrose and starch, respectively. The respective overall yields of total activity were 86.7% and 100.2%. In the spray drying step, the yields were 73.4% without starch and 85.9% with 2% starch. And the respective overall yields of total activity were 70.9% and 83.0%.

Ammonium sulfate fractionation was performed in two steps: 0% to 30% saturation and 30% to 60% saturation. The main portion of enzyme activity was observed in the 30% to 60% ammonium sulfate saturation, resulting in step and total activity yields of 69.5% and 67.1%, respectively. As a result of this procedure, Amy1974 was also significantly purified, reaching a specific activity of 1344 U/mg.

СОГОМОНЯН ТИГРАН МЕРУЖАНОВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ α -АМИЛАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И ХАРАКТЕРИСТИКА СООТВЕТСТВУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus subtilis*; α -амилазы промышленного значения; челночный вектор *E. coli*/*B. subtilis*; внеклеточная экспрессия; ферментация; каталитические свойства; гидролиз крахмала.

В этой диссертационной работе представлены внеклеточная экспрессия и характеристика двух амилаз, Amy1974 из *B. amyloliquefaciens* MDC1974 и Amy3500 из *B. subtilis* MDC3500. Обе амилазы относятся к семейству гликозилгидролаз 13 по их каталитическому домену (IPR006047) и имеют различные C-концевые все-бета-домены с дополнительным доменом связывания субстрата в случае фермента *B. subtilis*, согласно анализу InterPro.

Клонирование нужных генов проводилось с использованием сборки Гибсона с помощью NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. В отличие от других методов клонирования, сборка Гибсона не требует от исследователя разрезания ампликона целевого гена ферментами рестрикции. Это выгодно, так как дополнительный шаг, требуемый альтернативными методами клонирования, может быть проблематичным, если целевой ген содержит сайты рестрикции, необходимые для клонирования.

Природа сигнального пептида имеет решающее влияние на способ и количество секреции целевого белка. В этом исследовании запатентованный Takara челночный вектор pBE-S *B. subtilis*/*E. coli*, который несет сигнальный пептид протеазы ArgE, использовался для клонирования и будущей секреторной экспрессии генов α -амилазы amy1974 и amy3500 (которые имеют свои собственные мотивы сигнального пептида в своих последовательностях). Мы использовали возможность получить варианты клонированных генов с сигнальным пептидом ArgE, либо в сочетании с клонированными сигнальными пептидами амилаз, либо без них, с целью изучения влияния этого феномена на секрецию целевых ферментов. Биоинформатический анализ показал, что все три сигнальных пептида – ArgE, Amy1974 и Amy3500 – относятся к одному и тому же типу сигнальных пептидов Sec/SPI с вероятностями 0,77, 0,86 и 0,95 соответственно, согласно расчетам программного обеспечения SignalP-5.0. Анализ SDS-PAGE показал идентичные молекулярные массы для обеих α -амилаз, независимо от наличия их собственного сигнального пептида в конечной плазмидной конструкции. Однако ферментации выявили почти двукратное увеличение конечной объемной активности Amy1974 без собственного сигнального пептида по сравнению с вариантом с двойными сигнальными пептидами, тогда как варианты сигнального пептида амилазы Amy3500 продемонстрировали почти такую же объемную активность. PrsA, посттранслокационный шаперон, помогает в сворачивании белков, секретируемых через систему секреции Sec у микробов рода *Bacillus*. Следовательно,

наблюдаемые аномалии, связанные с формой сигнального пептида α -амилазы, могут быть связаны с этим шапероном.

Анализ SDS-PAGE рекомбинантных α -амилаз Amy1974 и Amy3500, с собственными сигнальными пептидами и без них в соответствующих плазмидных конструкциях, указывает на явное укорочение обоих вариантов Amy3500 в одинаковой степени, в то время как Amy1974 остается нетронутым после секреции. Более того, Amy3500 секретируется в двух укороченных формах с молекулярными массами 64,0 и 55,0 кДа вместо ожидаемого варианта с 68,8 кДа, когда сигнальный пептид удаляется после секреции. Это соответствует укорочению почти на 42 и 121 аминокислоту с С-конца для вариантов 64,0 и 55,0 кДа соответственно. Следует также отметить, что в случае Amy3500 (вариант без собственного сигнального пептида) большая часть фермента находится в форме 55,0 кДа, тогда как в случае Amy3500 с собственным сигнальным пептидом соотношение форм 64,0 и 55,0 кДа составляет почти 3 к 5. Предположение о том, что обе формы Amy3500 обладают ферментативной активностью, наглядно проиллюстрировано для 7-й фракции FPLC на рисунке 6 Б. Это явление широко распространено среди α -амилаз, которые, в дополнение к обязательным доменам А (каталитическому), В (петлевому) и С (все бета), обладают С-концевым доменом связывания субстрата.

В колбочных ферментациях активность α -амилазы *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 оценивалась в 1834 ед/мл, в то время как активность *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 достигала 702 ед/мл после 48 часов ферментации. Однако в производственных условиях при глубоководной ферментации в биореакторе объемом 250 л объемная активность штамма *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 достигала 2000 ед/мл после 25 часов ферментации.

Исследование влияния концентрации Ca^{2+} на активность Amy1974 и Amy3500, наряду с данными диализа, указывает на низкий активирующий эффект Ca^{2+} на обе α -амилазы. Рентгеноструктурный анализ показывает наличие 8 ионов Ca^{2+} в структуре α -амилазы *B. amyloliquefaciens* pdb 3bh4, которая на 100% идентична Amy1974 по аминокислотной последовательности, и наличие 3 ионов Ca^{2+} в структуре α -амилазы *B. subtilis* pdb 1ua7, которая на 100% идентична Amy3500 по аминокислотной последовательности. Это наблюдение может указывать на существование прочно связанных ионов Ca^{2+} в исследуемых структурах α -амилаз, что объясняет низкий активирующий эффект Ca^{2+} на обе α -амилазы.

Сравнение каталитических характеристик α -амилаз Amy1974 и Amy3500 с аналогичными ферментами, известными в литературе, подчеркивает преимущества ферментных препаратов, полученных в этом исследовании, особенно с точки зрения их рабочего pH и относительно широких диапазонов pH-зависимой термостабильности. Кроме того, эти ферменты умеренно термофильны и демонстрируют широкий диапазон рабочих температур. Ферменты, изученные в этом исследовании, продемонстрировали широкие пики активности в диапазоне 45-70°C с максимумом при 65°C. α -амилазы Amy1974 и Amy3500 продемонстрировали широкие оптимумы pH и pH-зависимую термостабильность с оптимальными значениями pH при 6,5 и 5,8 и пиками термостабильности при pH 7,6 и 5,9 соответственно. Обе α -амилазы продемонстрировали высокую относительную активность в отношении различных крахмалов, включая кукурузный амилопектин и картофельную амилозу, при этом продемонстрировав сравнительно более низкую активность в отношении циклодекстринов.

Представленные в данной диссертационной работе α -амилазы демонстрируют интересное поведение с точки зрения глубины реакции гидролиза крахмала. В то время как Amy1974 гидролизует крахмал, подобно препаратам Novozymes, используемым в производстве, до коротких декстроз и мальтозы, α -амилаза Amy3500 практически полностью преобразует крахмал в глюкозу. Это важный фактор с точки зрения получения сиропов с высоким содержанием глюкозы из крахмала с использованием только α -амилазы.

Параметры роста клеток и продукции ферментов контролировались в течение времени культивирования в ферментере объемом 250 л для лучшего понимания кинетики роста клеток и продукции α -амилазы. Результаты показывают, что максимальная скорость роста клеток наблюдается на 16-м часу, достигая значения 0,153 г/л/ч для сухого веса. После этого пика скорость роста клеток начала постепенно снижаться, в то время как скорость объемной продукции α -амилазы продолжала расти, достигнув максимальной объемной продукции фермента 167 ед/мл/ч на 19-м часу.

Супернатант *B. subtilis* RIK 1285_amy1974, выращенный в биореакторе в течение 28 часов, дал 90 л культуральной жидкости, которая была сконцентрирована в 6,3 раза с помощью ультрафильтрации, в результате чего объем составил 14,3 л. Концентрированная ультрафильтрацией внеклеточная α -амилаза была подвергнута различным процедурам консервации (различные методы сушки и осаждение сульфатом аммония). Этап ультрафильтрации достигает общего восстановления активности 96,6%, что дает 171,3 млн единиц общей активности*ч.

На этапе лиофилизации выходы на этапе составили 89,7% и 103,7% в присутствии 2% сахарозы и крахмала соответственно. Соответствующие общие выходы общей активности составили 86,7% и 100,2%. На этапе распылительной сушки выходы составили 73,4% без крахмала и 85,9% с 2% крахмала. И соответствующие общие выходы общей активности составили 70,9% и 83,0%.

Фракционирование сульфатом аммония проводилось в два этапа: от 0% до 30% насыщения и от 30% до 60% насыщения. Основная часть активности фермента наблюдалась при насыщении сульфатом аммония от 30% до 60%, что привело к этапной и общей активности 69,5% и 67,1% соответственно. В результате этой процедуры Amy1974 также был значительно очищен, достигнув удельной активности 1344 ед./мг.

