ՀԱՍՏԱՏՈՒՄ ԵՄ
ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի տնօրեն՝

Ա. Առաքելյան
«07» հոկտեմբերի 2024 թ.

ԱՌԱՋԱՏԱՐ ԿԱԶՄԱԿԵՐՊՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԾԻՔ

Տիգրան Մերուժանի Սողոմոնյանի «*Bacillus* ցեղի մանրէներից տեխնոլոգիական արժեք ունեցող ռեկոմբինանտ α-ամիլազների շտամ-արտադրիչների ստացումը և համապատասխան ֆերմենտների բնութագրումը» թեմայով Գ.00.07 «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման համար ներկայացված ատենախոսության վերաբերյալ

Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը:

Ամիլազներն ամենակարևոր արդյունաբերական ֆերմենտներից են, որոնք ունեն լայն կիրառություն՝ սկսած օսլայի փոխակերպումից շաքարային օշարակների մինչև դեղագործական արդյունաբերության համար ցիկլոդեքստրանների արտադրություն: Ամիլազների շարքում առանձնահատուկ տեղ են զբաղեցնում α-ամիլազները, որոնք օլիգոսախարիդների տրոհման հայտնի էնդոակտիվ ֆերմենտներ են: Կենսատեխնոլոգիայի համար մեծ նշանակություն ունեցող այս միացությունները կազմում են համաշխարհային արդյունաբերական ֆերմենտային շուկայի մոտ 25%-ը: Այս պահանջարկը պայմանավորում է α-ամիլազների ռեկոմբինանտ տեխնոլոգիաների և ֆերմենտային ինժեներիայի կիրառմամբ նոր բնութագրերով ֆերմենտների նպատակային որոնում: α-ամիլազների ստացման աղբյուրներ են համարվում բույսերը, կենդանիները և միկրոօրգանիզմները: Այնուամենայնիվ, սնկային և բակտերիալ աղբյուրներից ստացված ֆերմենտները գերակշռում են արդյունաբերական ոլորտներում: Հետևաբար, բարելավված բնութագրիչներով (բարձր ջերմակայունություն, ցածր pH-ում աշխատելու ունակություն, Ca-ի պահանջարկի նվազում) α-ամիլազների ֆերմենտային ձևերի ստացումն ու բնութագրումն այժմեկան խնդիր է, և այս ուղղությամբ կիրառվող ջանքերը շարունակում են պահանջված մնալ կենսատեխնոլոգիական արտադրությունների կողմից:

Թեմայի նպատակը և խնդիրները:

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

Աշխատանքի 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 մաքոքային 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:
- Սինթեզված 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 (100լ) արտադրության արդյունավետ տեխնոլոգիաների (ա1բացիայի ռեժիմ, ջերմաստիճանային ռեժիմ, ֆերմենտացիայի տևողություն), ֆերմենտների անջատման և պահպանման տեխնոլոգիաների մշակում:

Ստացված փաստերի և եզրակացությունների գնահատականը:

Աշխատանքում կատարվել է *B. amyloliquefaciens* MDC1974 և *B. subtilis* MDC 3500 շտամների α-ամիլազ սպիտակուցի կոդավորող գեների մոլեկուլային կլոնավորում *E. coli / B. subtilis* pBE-S մաքոքային վեկտորի կազմում: Ատենախոսի կողմից ընտրվել է մոլեկուլային կլոնավորման Գիբսոնի մեթոդը, որը հնարավորություն է տվել արդյունավետ իրականացնել մոլեկուլային կլոնավորումը և ստանալ ռեկոմբինանտ պլազմիդներ: Կարևորելով ազդանշանային սպիտակուցների գործառույթը ռեկոմբինանտ ֆերմենտների արտազատման գործընթացում՝ SignalIP 05 կենսաինֆորմատիկական գործիքով կատարվել է amy1974 և amy3500 սեփական ազդանշանային ամինաթթվային հաջորդականությունների վերծանում: Արդյունքում ատենախոսը բացահայտել է, որ ուսումնասիրվող ամիլազները պատկանում են

(Sec/SPI) խմբին, ինչպես նաև կառուցել է amy1974 և amy3500 ռեկոմբինանտ պլազմիդները համապատասխանաբար ազդանշանային սպիտակուցով և առանց դրա: Հաջորդիվ իրականացվել է *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 արտադրիչ շտամների ստացումը: Նպատակային ամիլազների առավելագույն քանակների ստացման նպատակով օպտիմալացվել են *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 շտամների աճի միջավայրերը և պայմանները: Ֆերմենտացման միջավայրի և պայմանների օպտիմալացումը ներառել է ազոտի օրգանական աղբյուրի ընտրությունը, աէրացիայի ինտենսիվությունը, կանամիցինի կոնցենտրացիան և ֆերմենտացման տևողությունը: Ստացված արդյունքները ատենախոսին հնարավորություն են տվել բացահայտել այն օպտիմալ պայմանները, որոնք նպաստում են շտամ արտադրիչների քանակական աճին: Քանակական գնահատման համար կիրառվել է գաղութային ՊՇՌ մեթոդը, որի արգասիքները վիզուալիզացվել են էլեկտրոֆորեզի միջոցով:

Ատենախոսի կողմից իրականացված կուլտուրալ հեղուկներից ռեկոմբինանտ α-ամիլազների էքսպրեսիայի չափումները թույլ են տվել եզրակացնել, որ Amy1974 սեփական ազդանշանային պեպտիդի առկայության դեպքում ֆերմենտի էքսպրեսիան մոտ երկու անգամ նվազում է: Որպես օպտիմալ միջավայր է գնահատվել T8 սննդամիջավայրը, որն ապահովել է էքսպրեսիայի ամենաբարձր ցուցանիշը: Ատենախոսի կողմից կատարվել է մասնակի մաքրման մեթոդների մշակում և ռեկոմբինանտ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ բնութագրերի ուսումնասիրում: Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, 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-ն ընդգծված թույլ ակտիվություն է ցուցաբերում կարտոֆիլի ամիլազի առկայությամբ, ապա Amy3500-ը նկատելի ակտիվ է եգիպտացորենի ամիլոպեկտինի և կարտոֆիլի Ժուլկովսկու օսլայի առկայությամբ: Գնահատվել է նաև սինթեզված ֆերմենտների կարողությունը պիլոտային արտադրությունում: Ստացված փորձարարական աշխատանքները թույլ են տվել մշակել ռեկոմբինանտ α-ամիլազների հեղուկացրային և լիոֆիլ չորացման արդյունավետ տեխնոլոգիաներ, ինչպես նաև ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացմամբ բարձր ելքով մասնակիորեն մաքրված պրեպարատների ստացման տեխնոլոգիաներ:

<u>Ատենախոսության գիտամեթոդական մակարդակը</u>:
Աշխատանքում կիրառվել են մոլեկուլային կենսաբանության, մասնավորապես՝ մոլեկուլային կլոնավորման մեթոդներ, կենսաքիմիայի, ֆերմենտային ինժեներիայի և հետազոտական այլ եղանակներ: Հատկանշական է ատենախոսի անձնական

ներդրումը մեթոդների մոդիֆիկացման և բարելավման աշխատանքների մեջ՝ ապահովելով ատենախոսության գիտամեթոդական բարձր մակարդակը: Աշխատանքն իր խորությամբ, հետազոտությունների ծավալով, արդյունքների նորույթով և գործնական արժեքով հանդիսանում է ավարտուն գիտական աշխատություն, որը կարևոր ներդրում է կենսատեխնոլոգիայի, մանրէաբանության, ինչպես նաև մոլեկուլային գենետիկայի բնագավառներում:

Ատենախոսության գործնական նշանակությունը:
Ներկայացված ատենախոսական աշխատանքի շրջանակում ստացված *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: Հատկանշական են ֆերմենտների էքսպրեսիայի աճի բարելավման և մաքրման մեթոդներին ուղղված աշխատանքները, որոնք հիմք են տալիս օպտիմալացված աճի պայմանների մասշտաբավորմամբ մշակել անհրաժեշտ քանակի ֆերմենտների ստացման տեխնոլոգիաներ և կուլտուրալ հեղուկներից ստանալ անհրաժեշտ մաքրության ռեկոմբինանտ α-ամիլազների պատրաստուկներ: Աշխատանքում ռեկոմբինանտ α-ամիլազների փորձարարական արտադրության, անջատման և պահպանման մշակված տեխնոլոգիաները կարող են հիմք հանդիսանալ այս ֆերմենտների ստացման տեխնոլոգիական գործընթացների համար:

Սեղմագրի համապատասխանությունն ատենախոսության հիմնական դրույթներին:
Հեղինակն ունի 4 գիտական տպագրված աշխատանք՝ 3 հոդված, որոնցից մեկն առանց համահեղինակների, և 1 միջազգային գիտաժողովի թեզիս: Տպագրված գիտական աշխատանքներն արտացոլում են ատենախոսության հիմնական դրույթները: Սեղմագիրը համապատասխանում է ատենախոսության բովանդակությանը:

Հարկ ենք համարում նշել ատենախոսական աշխատանքի մասին որոշ նկատառումներ.

1. Ատենախոսը «Մեթոդներ» գլխի 2.3 բաժնում *B. amyloliquefaciens* MDC1974 և *B. subtilis* MDC3500 α-ամիլազ գենի ամպլիֆիկացման և զույգ պրայմերների համար հղում է արել Rainey et al 1992 հեղինակին, որտեղ սակայն ներկայացված չեն խնդրո առարկա պրայմերները: ՊՇՌ մեթոդի իրականացումը կատարվել է ըստ Kowalchuk 2004-ի, սակայն ատենախոսության «Արդյունքներ և քննարկում» գլխի 3.2 բաժնում ատենախոսը ներկայացնում է, որ յուրաքանչյուր գենի դեպքում որոշվել են ՊՇՌ-ի իրականացման պայմանները: «Արդյունքներ և քննարկում» բաժնում ուսումնասիրվող α-ամիլազների կենսաինֆորմատիկական վերլուծությանը նվիրված

3.1 բաժնում ատենախոսը ներկայացրել է շտամների α-ամիլազի ամպլիֆիկացման պրայմերների նախագծման բարդ ընթացակարգը՝ կապված ռեֆերենս գեների ընտրության հետ: Եթե աշխատանքի շրջանակում արդեն հայտնի էին amy1974 և amy3500 (GenBank PP976357.1, 2021թ) նուկլեոտիդային հաջորդականությունները, ինչու՞ են դրանք նույնականացվել այլ շտամների հաջորդականությունների հետ և նախագծվել պրայմերները:

2. Ցանկալի կլիներ աշխատանքում կարճ նկարագրվեր ամիլազի ոչ ազդանշանային սպիտակուցի նուկլեոտիդային հաջորդականության վերծանման գործիքը և ցույց տրվեր նուկլեոտիդային հաջորդականությունը, որը հիմք է ծառայել հետագա մեթոդների վալիդացիայի համար:
3. «Արդյունքներ և քննարկում» բաժնում amy1974 սպիտակուցի կենսաինֆորմատիկական բոլոր ուսումնասիրություններում նշված չէ ամինաթթուների հաջորդականությունների վերծանման սկզբնաղբյուրը: Նկար 13-ում ներկայացվել է ուսումնասիրվող շտամների ամիլազների ամինաթթվային հաջորդականության համեմատական վերլուծությունը: Amy3500 ամինաթթվային հաջորդականությունը չի համապատասխանում ատենախոսի կողմից նշված աղբյուրին (GenBank UUZ04253.1):
4. «Մեթոդներ» գլխի 2.4 բաժնում թերի է ներկայացված գաղութային ՊՇՌ-ի մեթոդով նպատակային գաղութների ընտրությունը *E. coli* Top10 ռեցիպիենտ բջիջներում: Բացակայում է ՊՇՌ մեթոդը և պրայմերները, որոնցով իրականցվել են նպատակային գեների ամպլիֆիկացիան: «Արդյունքներ և քննարկում» 3.2 բաժնում ներկայացված է միայն PBE-S-amy1974 պլազմիդի վերլուծությունը: Մինչդեռ վերնագրում ներկայացված են երկու ռեկոմբինանտ պլազմիդները:
5. «Արդյունքներ և քննարկում» գլխի 3.4 բաժնում ներկայացվել է նպատակային ամիլազների առավելագույն քանակների ստացման համար *B. subtilis* RIK 1285_amy1974 և *B. subtilis* RIK 1285_amy3500 շտամների աճի միջավայրերի և ֆերմենտացման պայմանների օպտիմալացման արդյունքները, սակայն *B. subtilis* RIK 1285_amy3500-ում ամիլազ ֆերմենտի համար վերոնշյալ վերլուծությունները բացակայում են:
6. Վիճակագրական վերլուծության մեթոդաբանությունը աշխատանքում ներկայացված չէ:
7. Գրականության ցանկում բացակայում են որոշ հղումներ, «Արդյունքներ և քննարկում» գլխում 14, 15, 16 նկարները չեն համապատասխանում տեքստային վերլուծությանը և նույնը ներկայացված է «Ամփոփում» բաժնում:

Եզրակացություն

Տիգրան Մերուժանի Սողոմոնյանի «*Bacillus* ցեղի մանրէներից տեխնոլոգիական արժեք ունեցող ռեկոմբինանտ α-ամիլազների շտամ-արտադրիչների ստացումը և համապատասխան ֆերմենտների բնութագրումը» թեմայով կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման նպատակով ներկայացված ատենախոսությունը հանդիսանում է բարձր որակավորում ունեցող գիտական աշխատություն: Այն լիովին համապատասխանում է ՀՀ-ում գիտական աստիճանաշնորհման կանոնակարգի 7-րդ կետով թեկնածուական ատենախոսություններին ներկայացվող պահանջներին և հեղինակն արժանի է կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի աստիճանի շնորհմանը Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ:

Ատենախոսական աշխատանքը քննարկվել է և կարծիքը հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտխորհրդի նիստում (արձանագրություն թիվ 14, 07 հոկտեմբերի 2024 թ.):

Նիստը նախագահում էր ՄԿԻ գիտխորհրդի նախագահ՝ կ.գ.դ. Ա. Առաքելյանը, նիստի քարտուղար՝ կ.գ.թ. Զ. Խաչատրյան: Նիստին մասնակցում էին ՄԿԻ գիտխորհրդի անդամներ՝ կ.գ.դ., պրոֆ. Լ. Եպիսկոպոսյանը, կ.գ.դ., պրոֆ. Զ. Կարալյանը, կ.գ.թ. Ռ. Զախարյանը, կ.գ.թ. Հ. Զաքարյանը, կ.գ.դ. Ե. Կարալովան, կ.գ.դ. Կ. Մայիլյանը, կ.գ.թ. Գ. Մկրտչյանը, կ.գ.թ. Լ. Ներսիսյանը, կ.գ.թ. Ա. Սեդրակյանը, Ն. Մուրադյանը:

Բջջի կենսաբանության և վիրուսաբանության լաբորատորիայի վարիչ՝
կ.գ.դ., պրոֆ. Զ. Կարալյան

Վիրուսային էվոլյուցիոն էկոլոգիայի խմբի ղեկավար՝
կ.գ.թ. Հ. Ավագյան

Պրոֆ. Զ.Կարալյանի և կ.գ.թ. Հ. Ավագյանի ստորագրությունները հաստատում եմ՝

ՀՀ ԳԱԱ ՄԿԻ գիտքարտուղար, կ.գ.թ. Զ. Խաչատրյան