ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՄԵԼՔՈՆՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ՀՈՎՀԱՆՆԵՍԻ

L-ԱԼԱՆԻՆԻ ԲԱՐՁՐԱԿՏԻՎ ՇՏԱՄ-ԱՐՏԱԴՐԻՉՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱՅԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ

Գ.00.14 – «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2013

НПЦ “АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ” НАН РА ГНКО

МЕЛКОНЯН ЛУСИНЭ ОГАНЕСОВНА

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ L-АЛАНИНА И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.14 – “Биотехнология”**

Ереван – 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ – ում (ներկայումս ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):

Գիտական ղեկավար՝	կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Գ. Ե. Ավետիսովա
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Հ. Գ. Հովհաննիսյան
	կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ Գ. Գ. Սևոյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Երևանի պետական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2013 թ. հոկտեմբերի 25 – ին ժամը 16^{00} – ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ – ում գործող ՀՀ ԲՈՀ – ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:
Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 83:
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ – ի գրադարանում:
Սեղմագիրն առաքված է 2013 թ. սեպտեմբերի 25 – ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в ЗАО “НИИ Биотехнологии” (ныне НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА).

Научный руководитель:	**кандидат биологических наук Г. Е. Аветисова**
Официальные оппоненты:	**доктор биологических наук, профессор Г. Г. Оганесян**
	кандидат биологических наук, доцент Г. Г. Севоян
Ведущая организация:	**Ереванский государственный университет**

Защита диссертации состоится 25 октября 2013 г. в 16^{00} часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА.
Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (374 10) 65 41 83.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА.
Автореферат разослан 25 сентября 2013 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат биологических наук Г. Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը

Ալանինը (α-ամինապրոպիոնաթթու, $C_3H_7O_2N$) փոխարինելի ամինաթթու է, այն լայն տարածված է բնության մեջ և հանդիպում է գրեթե բոլոր օրգանիզմներում:

Ալանինն ունի լայն կիրառություն բժշկությունում՝ ինֆուզիոն լուծույթների արտադրության համար, գյուղատնտեսության բնագավառում՝ հերբիցիդների, ֆունգիցիդների, ակարիցիդների կազմում, սննդի արդյունաբերությունում՝ որպես սննդի քաղցրացուցիչ և շաքարի ցածր կալորիականությամբ փոխարինիչ, օծանելիքի արտադրությունում: Ալանինը կիրառվում է նաև սինթետիկ թելերի արտադրությունում՝ որպես մետաքսի հիմնական բաղադրիչ և քիմիական արդյունաբերությունում՝ օրգանական միացությունների և պոլիմերների սինթեզում [*Leuchtenberger W., 1996, Ivanov K. et al., 2013*]:

L-ալանինի համաշխարհային տարեկան արտադրությունը կազմում է 500 տոննա [*Dworkin M., 2006, Demain A.L. et al., 2007*]: L-ալանինի սինթեզի եղանակներից է դրա ստացումը DL-ալանինի ացետիլացման ճանապարհով: Ներկայումս, L-ալանինը արդյունաբերական մասշտաբներով ստացվում է հիմնականում կենսատրանսֆորմացիայի եղանակով՝ L-ասպարագինաթթվի էնզիմատիկ դեկարբօքսիլացման միջոցով: Սակայն նկարագրված եղանակներն առավելությունների հետ մեկտեղ ունեն մի շարք թերություններ, որոնք պայմանավորված են թանկարժեք հումքով, բազմափուլությամբ, աշխատատարությամբ: Սա է պատճառը, որ բազմաթիվ աշխատություններում նշվում է, որ էնզիմատիկ եղանակն ավելի նպատակահարմար է կիրառել ամինաթթվի փոքրածավալ արտադրությունում [*Goto M. et al., 1992, Hols P. et al., 2003, Dworkin M., 2006, Սաղյան Ա.Ա., 2010*]:

L-ալանինի մեծածավալ արտադրության դեպքում ավելի արդյունավետ կարող է լինել մանրէաբանական եղանակը, քանի որ փոխարինելի ելանյութի շնորհիվ բավականին նվազում է L-ալանինի ինքնարժեքը, ինչը կարող է նպաստել այդ ամինաթթվի սպառման ծավալների մեծացմանը [*Katsumata R. et al., 1996, Jarboe L.R. et al., 2010*]:

Ներկայումս, հայտնի են տարբեր ցեղերին (*Arthrobacter, Corynebacterium, Escherichia*) պատկանող L-ալանինի շտամ-արտադրիչներ, սակայն բազմաթիվ պատճառներով դրանք կիրառելի չեն արտադրական պայմաններում [*Hashimoto S. et al., 1993, Dworkin M., 2006, Zhang X. et al., 2007, Jojima T. et al., 2010*]:

Ինչ վերաբերվում է տեխնոլոգիական հատկություններով արտադրության պայմաններին առավելապես համապատասխանող *Brevibacterium* ցեղին, ապա պետք է նշել, որ գրականությունում նկարագրված շտամները սինթեզում են միայն DL-ալանին [*Katsumata R. et al., 1996, Nagwa M.A. et al., 2007*], բացառությամբ *Brevibacterium flavum* AA5 (ВКПМ В-3991) շտամ-արտադրիչի, որը սինթեզում է 43,8 գ/լ L-ալանին: Այս շտամով L-ալանինի ստացման մանրէաբանական եղանակը մշակվել է 1988 թվականին Ամինաթթուների գիտահետազոտական տեխնոլոգիական ինստիտուտում (ներկայումս, ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ) և արտոնագրվել ԽՍՀՄ - ում, ԱՄՆ - ում [*Азизян А.Г. и др.*, 1988, *Azizian A.G. et al., 1992*]:

Նպատակը և խնդիրները

Աշխատանքում նպատակ է դրվել ստանալ L-ալանինի նոր բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներ *Br. flavum* մանրէի հիման վրա և մշակել կենսասինթեզի արդյունավետ տեխնոլոգիա:

Նպատակի իրականացման համար դրվել են հետևյալ խնդիրները՝

- ուսումնասիրել L-ալանինի կենսասինթեզի առանցքային ֆերմենտների կարգավորման մեխանիզմները *Br. flavum* տեսակի շտամներում,
- ստանալ L-ալանինի նմանակների նկատմամբ կայուն նոր բարձրակտիվ շտամներ,
- ուսումնասիրել L-ալանինի ստացված շտամ-արտադրիչների ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունները,
- մշակել նոր բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչների միջոցով L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերը:

Գիտական նորույթը և ստացված արդյունքների կիրառական նշանակությունը

- Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է L-ալանինի գերսինթեզի մեխանիզմը *Br. flavum* տեսակին պատկանող շտամ-արտադրիչներում: Մասնավորապես, առանցքային ֆերմենտների՝ ալանինառացեմազի, ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի հետազոտման արդյունքում բացահայտվել են դրանց ակտիվության և սինթեզի կարգավորման խախտումները:
- Առաջին անգամ *Br. flavum* AA5 շտամ-արտադրիչի հիման վրա ստացվել են L-ալանինի նմանակների՝ L-ցիկլոսերինի և β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն մուտանտներ: Ցույց է տրվել, որ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայունության մուտացիան բերում է նպատակային ամինաթթվի ելքի զգալի ավելացմանը:
- Ստացվել են L-ալանին սինթեզող նոր *Br. flavum* GL1 և GL18 (DL-α-ABA-r, D-ala⁻, β-Cl-L-ala-r) բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներ, որոնք ավանդադրվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոն հիմնարկում: Շտամներին տրվել է MDC (ԻՆՄԻԱ) 11841 և MDC (ԻՆՄԻԱ) 11842 շիֆր և համարներ, համապատասխանաբար:
- Ընտրվել է ցանքսամիջավայրի և ֆերմենտացիայի միջավայրի բաղադրությունը, մշակվել են կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի տեխնոլոգիական պարամետրերը, ինչի արդյունքում *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչները սինթեզում են 53,7 գ/լ և 60,5 գ/լ L-ալանին, գերազանցելով ելակետային շտամին 23% և 38% - ով, համապատասխանաբար:
- Ուսումնասիրվել և օպտիմալացվել են L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերը լաբորատոր կենսառեակտորում: Մշակված տեխնոլոգիայի շնորհիվ 36 ժամով կրճատվում է պրոցեսի տևողությունը, *Br. flavum* GL18 նոր առավել ակտիվ շտամ-արտադրիչը սինթեզում է 62,8 գ/լ L-ալանին՝ գերազանցելով է ելակետային *Br. flavum* AA5 շտամին 22% - ով ակտիվությամբ, 21% - ով պրոցեսի արտադրողականությամբ, 8% - ով շաքարի կոնվերսիայով: *Br. flavum* շտամ-արտադրիչների հիման վրա մշակված տեխնոլոգիան չունի նմանակ և արտոնագրվել է ՀՀ - ում:

Այսպիսով, կատարված աշխատանքի արդյունքում առաջին անգամ գենետիկասելեկցիոն եղանակով ստացվել են գրականությունում չնկարագրված գենետիկական հատկանիշներով օժտված *Br. flavum* տեսակին պատկանող L-ալանինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներ: Դրանցում L-ալանինի կենսասինթեզի մեխանիզմի բացահայտումը, առանցքային ֆերմենտների

ակտիվության և սինթեզի բնութագրումը կարող են հիմք հանդիսանալ այդ ուղղությամբ հետագա գիտական հետազոտությունների իրականացմանը: *Br. flavum* GL18 առավել ակտիվ շտամ-արտադրիչը և դրա հիման վրա մշակված L-ալանինի ստացման արդյունավետ տեխնոլոգիան կարող են կիրառվել մեծածավալ արտադրությունում:

Պաշտպանության ներկայացվող հիմնական դրույթները

- L-ալանինի ելքի բարձրացումը պայմանավորված է *Br. flavum* շտամ-արտադրիչներում այդ ամինաթթվի կենսասինթեզի առանցքային ֆերմենտների ակտիվության և սինթեզի ապակարգավորմամբ:
- L-ալանինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներ ստանալու համար կիրառվել է β-Cl-L-ալանինը, որի նկատմամբ կայուն շտամ-արտադրիչներն ակտիվությամբ զգալի գերազանցում են ելակետային շտամի ակտիվությունը:
- Կոլբային ֆերմենտացիայի պայմաններում L-ալանինի առավելագույն ելքը պայմանավորված է ոչ միայն ֆերմենտացիայի միջավայրի և ցանքսամիջավայրի բաղադրությամբ, ցանքսամիջավայրի աճեցման տևողությամբ, այլ նաև պրոցեսի ընթացքում աերացիայի պայմանների փոփոխությամբ:
- Կենսառեակտորում L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացումը հանգեցնում է նպատակային ամինաթթվի ելքի և պրոցեսի արտադրողականության բարձրացմանը, ինչպես նաև ուղեկցող ամինաթթուների ելքի նվազմանը:

Ատենախոսական աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ում բազային ֆինանսավորմամբ իրականացվող «Հետազոտություններ կենսատեխնոլոգիայի և մանրէաբանության բնագավառում» ծրագրի շրջանակներում: Ատենախոսական աշխատանքի արդյունքները ներկայացվել են ծրագրի ընթացիկ և տարեկան հաշվետվություններում:

Ատենախոսի անձնական ներդրումը

Ատենախոսի անձնական ներդրումը ներառում է ղեկավարի հետ համատեղ խնդրի առաջադրումը, թեմայի վերաբերյալ գիտական գրականության ուսումնասիրումը և վերլուծությունը, փորձնական աշխատանքի իրականացումը, ստացված արդյունքների վերլուծությունը և ընդհանրացումը, համահեղինակների հետ համատեղ գիտական աշխատությունների ձևակերպումը, ատենախոսական աշխատանքի ձևակերպումը:

Ատենախոսական աշխատանքի approbացիան

Ատենախոսական աշխատանքի արդյունքները զեկուցվել են «*State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution*» խորագրով միջազգային գիտաժողովում (ք. Ծաղկաձոր, 28 սեպտեմբեր - 02 հոկտեմբեր, 2008), «*Modern state of biotechnological developments and ways of their commercialization*» խորագրով ՄԳՏԿ - ի գիտական սեմինարում (ք. Երևան, 11-12 սեպտեմբեր, 2012) և ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ի գիտական խորհրդի նիստերում:

Հրատարակված աշխատություններ

Ստացված արդյունքներն ու ատենախոսության հիմնադրույթներն ամփոփված և արտացոլված են հրատարակված 8 գիտական աշխատություններում, այդ թվում՝

3 հոդված միջազգային և տեղական գիտական հանդեսներում, 2 ՀՀ արտոնագիր, 3 միջազգային գիտաժողովների թեզիս:

Ատենախոսական աշխատանքի իրականացման վայրը

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ – ում:

Ատենակոսական աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը

Ատենախոսական աշխատանքը կազմված է առաջաբանից, 7 գլուխներից, արդյունքների քննարկումից, գիտագործնական առաջարկներից, եզրակացություններից, գրականության ցանկից, հապավումների, համառոտագրությունների, նշանակումների ցանկից և 3 հավելվածներից: Աշխատանքը շարադրված է 111 էջի վրա, ներառում է 5 սխեմա, 20 նկար, 23 աղյուսակ և 146 գրական հղում:

ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկում ամփոփված են ատենախոսության թեմայի վերաբերյալ գիտական տվյալները:

ԳԼՈՒԽ 1 – ում ներկայացված է L-ալանինի կենսասինթեզը և դրա կարգավորումը տարբեր միկրոօրգանիզմների մոտ, իսկ

ԳԼՈՒԽ 2 – ում տրված է ալանին սինթեզող շտամ-արտադրիչների ընդհանուր բնութագիրը:

ՓՈՐՁՆԱԿԱՆ ՄԱՍ

ԳԼՈՒԽ 3. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Ատենախոսական աշխատանքի այս բաժնում նկարագրված են օգտագործած շտամները, սննդամիջավայրերը, նյութերը և մեթոդները: Մասնավորապես, ներկայացված են ամինաթթվի նմանակի նկատմամբ կայուն մուտանտների ստացման, շտամների մորֆոլոգիական առանձնահատկությունների ուսումնասիրման, կուլտուրայի տիտրի որոշման, ֆերմենտացիայի եղանակով L-ալանինի ստացման, կուլտուրալ հեղուկում (ԿՀ) L-ալանինի քանակի որոշման, ԿՀ -ի փրփրագոյացման որոշման, շաքարի և ազոտի քանակի որոշման, օպտիկական խտության որոշման, ֆերմենտային պրեպերատների ստացման, տոլուոլով բջիջների մշակման, անմշակ ֆերմենտային հոմոգենատի ստացման, սպիտակուցի քանակի որոշման, ալանինոացեմազի, ալանինտրանսամինազի, վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության որոշման, արդյունքների վիճակագրական մշակման մեթոդները:

ԳԼՈՒԽ 4. BREVIBACTERIUM FLAVUM ՄԱՆՐԷԻ ՀԻՄԱՆ ՎՐԱ L-ԱԼԱՆԻՆ ՍԻՆԹԵԶՈՂ ՆՈՐ ԲԱՐՁՐԱԿՏԻՎ ՇՏԱՄ-ԱՐՏԱԴՐԻՉՆԵՐԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ՄՈՏԵՑՈՒՄՆԵՐԸ

4.1. Brevibacterium flavum մանրէում L-ալանինի կենսասինթեզի նյութաէներգետիկ հաշվեկշռի ցուցանիշները

Ըստ ածխածնի հասանելի առավելագույն արտադրողականության գործակիցի տեսական հաշվարկը L-ալանինի կենսասինթեզի պարագայում հանդիսանում է բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչների ստացման սելեկցիայի փուլերից մեկը:

Br. flavum մանրէներում հաշվարկվել է ըստ ածխածնի առավելագույն արտադրողականության գործակիցը ($У_p^{max}$), որը հավասար է 0,97 - ի:

4.2.Br. flavum AA5 շտամ-արտադրիչի ալանինռացեմազի, ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության կարգավորման ուսումնասիրումը

Ուսումնասիրվել է ալանինռացեմազի ակտիվությունը և ցույց է տրվել, որ *Br. flavum* AA5 շտամ-արտադրիչի մոտ, որը կայուն է DL-α-ԱԿԹ- ի նկատմամբ և առաքսոտրոֆ D-ալանինի նկատմամբ, այդ ֆերմենտի ակտիվությունը նվազել է ավելի քան 99% - ով՝ համեմատած վայրի տեսակի շտամի ֆերմենտի ակտիվության հետ:

Այսպիսով, փորձերի արդյունքում պարզվել է, որ ի տարբերություն ալանինռացեմազի ակտիվությամբ օժտված DL-ալանին սինթեզող վայրի տեսակի շտամի, D-ալանինի նկատմամբ առաքսոտրոֆ *Br. flavum* շտամ-արտադրիչները սինթեզում են L-ալանին՝ ալանինռացեմազի ակտիվության բացակայության հետևանքով:

Հաջորդ փուլում ուսումնասիրվել են L-ալանինի կենսասինթեզի առանցքային ֆերմենտների՝ ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության կարգավորման մեխանիզմները: Այդ նպատակով *Br. flavum* ATCC 14067 և *Br. flavum* AA5 շտամների բջիջների անշարժ հոմոգենատում հետազոտվել է L-ալանինի կառուցվածքային նմանակների՝ DL-α-ԱԿԹ-ի, L-ցիկլոսերինի ու β-Cl-L-ալանինի, ինչպես նաև L-ալանինի կենսասինթեզի հետ կապված D-ալանինի և L-վալինի ազդեցությունը նշված ֆերմենտների ակտիվության վրա: Տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 1 - ում:

Աղյուսակ 1

Որոշ միացությունների ազդեցությունն ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության վրա

Միացություն	IC_{50}*, մմոլ/լ			
	ալանինտրանսամինազ		վալին—պիրուվատտրանսամինազ	
	ATCC 14067	AA5	ATCC 14067	AA5
D-ալանին	–**	–	–	–
L-վալին	–	–	–	–
DL-α-ԱԿԹ	68	68	>80	>80
L-ցիկլոսերին	1,3	2,3	4,1	3,1
β-Cl-L-ալանին	0,155	0,155	>20	>20

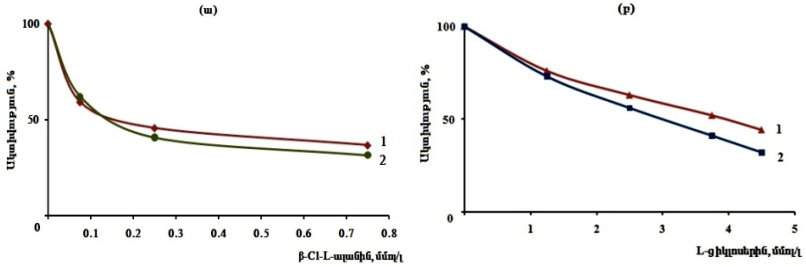
** IC_{50} – առավելագույն արգելակող կոնցենտրացիայի կեսը*
*** – ազդեցության բացակայություն*

Աղյուսակ 1 - ում ներկայացված տվյալներից հետևում է, որ DL-α-ԱԿԹ-ն, L-ցիկլոսերինը և β-Cl-L-ալանինն արգելակում են ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվությունը: Ընդ որում, ինչպես վայրի տեսակի շտամի, այնպես էլ շտամ-արտադրիչի մոտ նշված նյութերն արգելակում են ֆերմենտների ակտիվությունը գրեթե նույն չափով: Առավել ուժեղ արգելակիչների՝ β-Cl-L-ալանինի և L-ցիկլոսերինի ազդեցությունն ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության վրա, համապատասխանաբար, ներկայացված է նկար 1 - ում:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ թե՛ վայրի տեսակի շտամի, թե՛ շտամ-արտադրիչի համար L-ցիկլոսերինը հանդիսանում է երկու տրանսամինազների՝ ալանինտրանսամինազի և վալին—

պիրուվատտրանսամինազի, իսկ β-Cl-L-ալանինը՝ միայն ալանինտրանսամինազի առավել ուժեղ արգելակիչ:

Այսպիսով, հետազոտության արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ D-ալանինի նկատմամբ առաքսոտրոֆ շտամի մուտ բացակայում է ալանինոռացեմազի ակտիվությունը և DL-α-ԱԿԹ - ի նկատմամբ կայունության մուտացիան չի ազդում վերջնանյութով այդ շտամում L-ալանինի կենսասինթեզի առանցքային ֆերմենտների՝ ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության արգելակման վրա:



Նկ. 1 β-Cl-L-ալանինով ալանինտրանսամինազի (ա) և L-ցիկլոսերինով վալին—պիրուվատտրանսամինազի (բ) ակտիվության արգելակումը 1) Br. flavum ATCC 14067, 2) Br. flavum AA5

ԳԼՈՒԽ 5. L-ԱԼԱՆԻՆԻ ՆՈՐ ԲԱՐՁՐԱԿՏԻՎ ՇՏԱՄ-ԱՐՏԱԴՐԻՉՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ

5.1. L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայուն մուտանտների ստացումը Br. flavum AA5 շտամ-արտադրիչի հիման վրա

L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայուն մուտանտներ ստանալու նպատակով, նախապես որոշվել է *Br. flavum* AA5 շտամի աճն արգելակող L-ցիկլոսերինի նվազագույն կոնցենտրացիան: Փորձերի արդյունքում առանձնացվել են 33 ՆԳ ինդուկցված կայուն մուտանտներ միայն 0,25 մգ/մլ L-ցիկլոսերին պարունակող միջավայրի վրայից: 33 ստուգված մուտանտներից ընտրվել են երեք շտամ, որոնք ակտիվությամբ տարբերվել են ելակետային շտամից: Ընտրված մուտանտների L-ալանին սինթեզելու ակտիվության ստույգ քանակական որոշման համար իրականացվել է ֆերմենտացիա կոլբաներում թափահարիչի վրա: Թղթային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով ԿՀ - ում որոշվել է L-ալանինի կոնցենտրացիան: Թվով 9 փորձերի միջինացված տվյալները ներկայացված են նկար 2 - ում: Ինչպես երևում է նկար 2 - ից, L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայուն մուտանտները L-ալանին սինթեզելու ակտիվությամբ էականորեն չեն տարբերվում ելակետային շտամից, չնայած ելակետային շտամի առանցքային ֆերմենտի ակտիվության արգելակող ազդեցության փաստի:

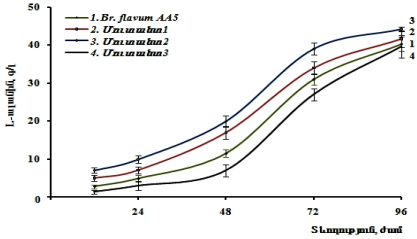
5.2. β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն մուտանտների ստացումը Br. flavum AA5 շտամ-արտադրիչի հիման վրա

Ինչպես L-ցիկլոսերինի դեպքում, այնպես էլ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն մուտանտների ստացման համար նախօրոք որոշվել է նմանակի նվազագույն կոնցենտրացիան: Փորձերի արդյունքում անջատվել է 13 մուտանտ, որոնցից 9-ը՝ կայուն են β-Cl-L-ալանինի 0,025 մգ/մլ կոնցենտրացիայի նկատմամբ, իսկ 4-ը՝ β-Cl-L-ալանինի 0,05 մգ/մլ կոնցենտրացիայի նկատմամբ: Նկար 3 - ում ներկայացված են 2 առավել ակտիվ մուտանտների ֆերմենտացիայի 10 փորձերի

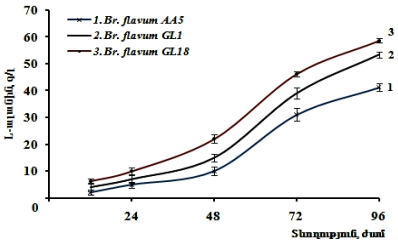
միջինացված տվյալները: Դրանց ալանին սինթեզելու ակտիվությունն էականորեն տարբերվում է ելակետային շտամի ակտիվությունից: GL1 մուտանտն (կայուն է β-Cl-L-ալանինի 0,025 մգ/մլ կոնցենտրացիայի նկատմամբ) ալանին սինթեզելու ակտիվությամբ գերազանցում է ելակետային շտամին միջինը 10 գ/լ - ով, իսկ GL18 մուտանտը (կայուն է β-Cl-L-ալանինի 0,05 մգ/մլ կոնցենտրացիայի նկատմամբ)՝ 17 գ/լ - ով:

Այսպիսով, L-ալանինի նոր բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչները, որոնք ստացվել են ալանինի նմանակ՝ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայունության արդյունքում, օպտիմալացված պայմաններում իրենց ակտիվությամբ գերազանցում են ելակետային շտամին 23-38% - ով:

Ընդհանրացնելով ստացված տվյալները կարելի է ենթադրել, որ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն մուտանտների մոտ L-ալանինի ելքի էական բարձրացումը պայմանավորված է այդ ամինաթթվի սինթեզի առանցքային ֆերմենտների ակտիվության կամ սինթեզի ապակարգավորմամբ: Այս ենթադրությունը ստուգելու համար մեր կողմից ուսումնասիրվել է *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամների L-ալանինի կենսասինթեզին մասնակցող որոշ ֆերմենտների կարգավորումը:



Նկ. 2 L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայուն մուտանտների կողմից սինթեզված L-ալանինի ելքի դինամիկան



Նկ. 3 Br. flavum նոր շտամ-արտադրիչների կողմից սինթեզված L-ալանինի

ԳԼՈՒԽ 6. BREVIBACTERIUM FLAVUM GL1 ԵՎ GL18 ՆՈՐ ՇՏԱՄ-ԱՐՏԱԴՐԻՉՆԵՐՈՒՄ L-ԱԼԱՆԻՆԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ԱՌԱՆՑՔԱՅԻՆ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

6.1. Br. flavum GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի ակտիվության ուսումնասիրումը

Հաշվի առնելով, որ ստացված շտամ-արտադրիչների մոտ L-ալանինի ելքի բարձրացումը արձանագրվել է β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայունության արդյունքում, նպատակային ամինաթթվի գերսինթեզի մեխանիզմի բացահայտման համար ուսումնասիրվել է այդ նմանակի ազդեցությունը *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի ակտիվության վրա: Որպես ստուգիչ փորձերում օգտագործվել է *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամը (աղ. 2):

Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայունության արդյունքում զգալի նվազել է նոր շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի արգելակման աստիճանը: Հավանաբար ֆերմենտի ակտիվության կարգավորման այդ մեխանիզմի խախտումն է, որ հանգեցրել է L-ալանինի ելքի բարձրացմանը:

Աղյուսակ 2

β-Cl-L-ալանինի ազդեցությունը շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի ակտիվության վրա

Նմանակ	Շտամ	IC_{50}, մմոլ/լ
		Ալանինտրանսամինազ
β-Cl-L-ալանին	AA5	0,16
	GL1	1,96
	GL18	>5

6.2. Br. flavum GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի սինթեզի ուսումնասիրումը

Br. flavum GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների տրանսամինազների սինթեզն ուսումնասիրելու նպատակով որոշվել է L-ալանինի, D-ալանինի, L-վալինի, DL-α-ԱԿԹ - ի և β-Cl-L-ալանինի ազդեցությունը ֆերմենտների ակտիվության վրա: Իրականացված 5 փորձերի միջինացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 3 - ում և 4 - ում: Որպես ստուգիչ հանդիսացել են *Br. flavum* ATCC 14067 վայրի տեսակի և *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամները:

Աղյուսակ 3

Որոշ միացությունների ազդեցությունը L-ալանինի շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի սինթեզի վրա

Միացություն	Ալանինտրանսամինազի ակտիվություն							
	միավոր /մգ	%	միավոր /մգ	%	միավոր /մգ	%	միավոր /մգ	%
	ATCC 14067		AA5		GL1		GL18	
ստուգիչ	0,360	100,0	0,317	100,0	0,178	100,0	0,442	100,0
L-ալանին, 20 մմոլ/լ	0,368	102,2	0,385	121,5	0,207	116,3	0,621	140,5
D-ալանին, 20 մմոլ/լ	0,059	16,4	0,345	108,8	0,175	98,3	0,633	143,2
L-վալին, 20 մմոլ/լ	0,325	90,3	0,115	36,3	0,182	102,2	0,340	76,9
DL-α-ԱԿԹ, 20 մմոլ/լ	0,382	106,1	0,255	80,4	0,425	238,8	0,342	77,4
β-Cl-L-ալանին, 2մմոլ/լ	0,184	51,1	0,242	76,3	0,207	116,3	0,540	122,2

Աղյուսակ 3 - ում ներկայացված տվյալների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ համեմատած վայրի տեսակի շտամի հետ, որի ալանինտրանսամինազը ենթարկվում է ռեպրեսիայի D-ալանինով և β-Cl-L-ալանինով, *Br. flavum* AA5 շտամ-արտադրիչի մոտ այն ռեպրեսիայի չի ենթարկվում D-ալանինով, իսկ β-Cl-L-ալանինով ռեպրեսիան պահպանվում է, նկատվում է ռեպրեսիա DL-α-ԱԿԹ - ով և զգալի ռեպրեսիա L-վալինով: Դրա հետ մեկտեղ L-ալանինն ունի դեռեպրեսացնող ազդեցություն: Ինչ վերաբերվում է ստացված շտամներին, ապա համեմատած *Br. flavum* AA5 շտամի հետ, *Br. flavum* GL1 արտադրիչի մոտ ֆերմենտի ռեպրեսիա չի նկատվում L-ալանինով, D-ալանինով, L-վալինով, β-Cl-L-ալանինով, իսկ DL-α-ԱԿԹ - ն ցուցաբերում է ուժեղ դեռեպրեսացնող ազդեցություն: Միևնույն ժամանակ, *Br. flavum* GL18 շտամի մոտ պահպանվում է ռեպրեսիան DL-α-ԱԿԹ - ով և մասամբ L-վալինով: Թույլ դեռեպրեսացնող

ազդեցություն ունի β-Cl-L-ալանինը, իսկ D-ալանինը և L-ալանինն ունեն զգալի դեռեպրեսացնող ազդեցություն:

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ *Br. flavum* նոր շտամ-արտադրիչների մոտ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայունությունը հանգեցրել է նրան, որ ալանինտրանսամինազի սինթեզը ռեպրեսիայի չի ենթարկվում այն նյութերով, որոնք կամ կապված են L-ալանինի սինթեզի ուղու հետ կամ հանդիսանում են այդ ամինաթթվի նմանակ: Զգալի դեռեպրեսիա նկատվում է D-ալանինի, L-ալանինի, DL-α-ԱԿԹ - ի և β-Cl-L-ալանինի առկայության պարագայում:

Աղյուսակ 4

Որոշ միացությունների ազդեցությունը L-ալանինի շտամ-արտադրիչների վալին—պիրուվատտրանսամինազի սինթեզի վրա

Միացություն	Վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվություն							
	միավոր /մգ	%	միավոր /մգ	%	միավոր /մգ	%	միավոր /մգ	%
	ATCC 14067		AA5		GL1		GL18	
ստուգիչ	0,083	100,0	0,032	100,0	0,032	100,0	0	0
L-ալանին, 20 մմոլ/լ	0,086	103,6	0,048	150,0	0,032	100,0	0,015	-
D-ալանին, 20 մմոլ/լ	0,014	16,9	0,063	196,9	0	0	0,120	-
L-վալին, 20 մմոլ/լ	0,104	125,3	0,023	71,9	0,035	109,4	0,047	-
DL-α-ԱԿԹ, 20 մմոլ/լ	0,091	109,6	0,052	162,5	0,190	593,8	0,049	-
β-Cl-L-ալանին, 2 մմոլ/լ	0,027	32,5	0,033	103,1	0,088	275,0	0,100	-

Ինչպես երևում է աղյուսակ 4 - ի տվյալներից, վայրի տեսակի շտամի մոտ ինչպես ալանինտրանսամինազի, այնպես էլ վալին—պիրուվատտրանսամինազի պարագայում ռեպրեսիա նկատվում է D-ալանինով և β-Cl-L-ալանինով: *Br. flavum* AA5 շտամ-արտադրիչի մոտ D-ալանինի նկատմամբ առաքսոտրոֆության և DL-α-ԱԿԹ - ի նկատմամբ կայունության մուտացիաները հանգեցրել են β-Cl-L-ալանինով վալին—պիրուվատտրանսամինազի ռեպրեսիայի վերացմանը, իսկ D-ալանինը, L-ալանինը և DL-α-ԱԿԹ - ն ունեցել են ուժեղ դեռեպրեսացնող ազդեցություն: Ի տարբերություն վայրի տեսակի և ելակետային շտամի, այլ պատկեր է ստացվել նոր շտամ-արտադրիչների մոտ: Մասնավորապես, *Br. flavum* GL1 շտամ-արտադրիչի մոտ զգալի դեռեպրեսիա նկատվում է DL-α-ԱԿԹ - ով, β-Cl-L-ալանինով և ռեպրեսիա՝ D-ալանինով: *Br. flavum* GL18 շտամ-արտադրիչի մոտ ստուգիչ պայմաններում վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվություն չի նկատվում, ինչի համեմատ ուսումնասիրված բոլոր նյութերը ֆերմենտի ակտիվության վրա թողնում են դեռեպրեսացնող ազդեցություն: Ընդ որում, D-ալանինը և β-Cl-L-ալանինն առավել բարձր աստիճանով դեռեպրեսիայի են ենթարկում վալին—պիրուվատտրանսամինազի սինթեզը:

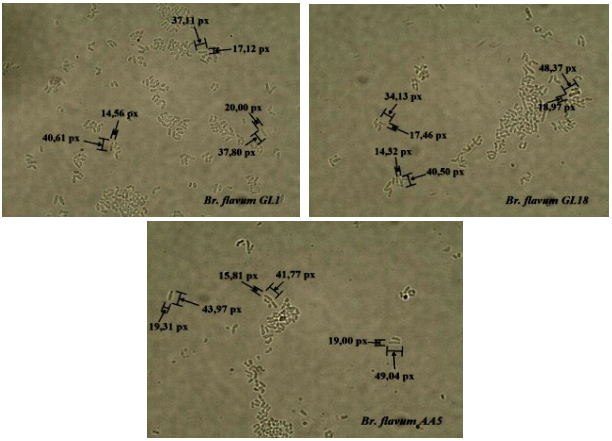
Այսպիսով, ամփոփելով հետազոտության արդյունքում ստացված տվյալները կարելի է եզրակացնել, որ սելեկցիոն աշխատանքների արդյունքում ընտրված *Br. flavum* բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներում L-ալանինի գերսինթեզը պայմանավորված է այդ ամինաթթվի կենսասինթեզի կարգավորման խախտմամբ ինչպես գենային մակարդակով՝ ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի սինթեզի ապակարգավորման հետ, այնպես էլ այդ

ֆերմենտների ակտիվության մակարդակով՝ վերջանյութով ֆերմենտների ակտիվության արգելակման վերացման հետ:

ԳԼՈՒԽ 7. L-ԱԼԱՆԻՆԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՊԱՐԱՄԵՏՐԵՐԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ

7.1. Br. flavum GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների բնութագիրը

Br. flavum **GL1 և GL18** շտամ-արտադրիչների կուլտուրալ-մորֆոլոգիական առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունից պարզվել է, որ դրանք չեն տարբերվում ***Br. flavum*** **AA5** ելակետային շտամից: ՄՊԱ - ի վրա (pH 7,5-7,8) 30^{0}C ջերմստիճանային պայմանում 48 ժամ աճեցնելուց հետո դրանք առաջացնում են կլոր, 2-3 մմ տրամագծով, ուռուցիկ, հարթ մակերեսով դեղնավուն գաղութներ: Շտամները գրամդրական են, բջիջները անշարժ, ոչ սպորավոր, օվալաձև, միջինը 1,1×0,5 մկմ չափսերով (նկ. 4):



Նկ. 4 L-ալանինի շտամ-արտադրիչների բջիջների մանրադիտակային պատկերը (×10 000)

(1պիկսելը (px) = 263,6 մկմ)

7.2. L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացումը կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի պայմաններում

Հայտնի է, որ մանրէաբանական եղանակով սինթեզվող նպատակային ամինաթթվի բարձր ելք ապահովելու համար կարևոր դեր են կատարում ընտրված շտամը, սննդամիջավայրի կազմը, ինչպես նաև ֆերմենտացիայի պայմանները:

Ելնելով վերը նշվածից, ***Br. flavum*** **GL1 և GL18** շտամ-արտադրիչների ալանին սինթեզելու առավելագույն ակտիվությունն ապահովելու նպատակով մեր կողմից իրականացվել է ցանքսամիջավայրի ու ֆերմենտացիայի միջավայրի բաղադրության, ինչպես նաև աերացիայի պայմանների օպտիմալացում: Մասնավորապես, մեր կողմից օպտիմալացվել են ֆերմենտացիայի միջավայրի և ցանքսամիջավայրի բաղադրությունը ըստ ածխածնի, ազոտի աղբյուրների, D-ալանինի, միատեղակալված ֆոսֆորաթթվական կալիումի, բիոտինի, թիամինի և կավիճի կոնցենտրացիայի:

Պարզվել է, որ ԿՀ - ում L-ալանինի առավելագույն կուտակումը նկատվում է ֆերմենտացիայի միջավայրին 18-20 ժամվա ընթացքում աճեցված ցանքսանյութն ավելացնելու դեպքում: Ցանքսանյութի ավելի երկար աճեցումը հանգեցնում է նպատակային ամինաթթվի ելքի նվազմանը, ինչը նկատվում է նաև մինչև այդ ժամն աճած ցանքսանյութի օգտագործման դեպքում:

Ինչպես հայտնի է, աերոբ միկրոօրգանիզմների համար թթվածինը հանդիսանում է կարևոր գործոն շտամների կուլտիվացման պրոցեսում և էականորեն ազդում է դրանց աճի և ամինաթթվի սինթեզի վրա: Այդ իսկ պատճառով մեր կողմից ուսումնասիրվել է աերացիայի մակարդակի ազդեցությունն ալանինի սինթեզի վրա՝ GL18 շտամի օրինակով: Մասնավորապես, L-ալանինի սինթեզն իրականացվել է թափահարիչի պտույտների տարբեր արագության (150-300 պտ/ր) պայմաններում (նկ. 5):

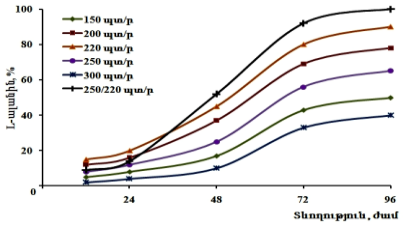
Ստացված արդյունքներից պարզվել է, որ ֆերմենտացիայի պրոցեսի իրականացումը 220 պտ/ր պայմանում բերում է նպատակային ամինաթթվի բարձր ելքին: Այդ ցուցանիշից ավելի ցածր թափահարիչի պտույտները (150, 200 պտ/ր) հանգեցնում են շտամ-արտադրիչի աճի դանդաղեցմանը և, որպես հետևանք, պրոցեսի երկարաձգմանը: Միևնույն ժամանակ, նշված պայմաններում նվազում է L-ալանինի ելքը: Ավելի բարձր պտույտների (250, 300 պտ/ր) պարագայում նկատվում է շտամ-արտադրիչի աճի արագացում, սակայն L-ալանինի ելքի բարձրացում չի նկատվում:

Շտամ-արտադրիչի ֆիզիոլոգիական հատկանիշների և ֆերմենտացիայի այլ պարամետրերի ուսումնասիրությունների արդյունքում պարզվել է նաև, որ միայն 220 պտ/ր պայմանում իրականացվող պրոցեսի ընթացքում ածխածնի աղբյուրը յուրացվում է ամբողջությամբ և սինթեզվում է L-ալանինի առավել բարձր քանակը:

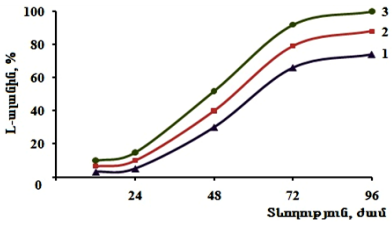
Ալանինի կենսասինթեզն ուսումնասիրվել է նաև պրոցեսի ընթացքում աերացիայի փոփոխման պայմաններում: Ֆերմենտացիայի ընթացքում աերացիայի պայմանների օպտիմալացման միջինացված տվյալները ներկայացված են նկար 5 - ում:

Ստացված տվյալներից պարզվել է, որ ֆերմենտացիայի իրականացումը թափահարիչի 250 պտ/ր արագության պայմանում մինչև 24 - րդ ժամը և շարունակումը 220 պտ/ր պայմանում մինչև պրոցեսի ավարտը հանգեցնում է ԿՀ - ում L-ալանինի առավելագույն քանակի կուտակմանը:

Այսպիսով, հիմնվելով *Br. flavum* GL1 և GL18 նոր շտամ-արտադրիչների ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունների հետազոտության և ֆերմենտացիայի պրոցեսի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացման արդյունքների վրա եզրակացվել է, որ կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի պայմաններում L-ալանինի առավելագույն քանակը՝ 53,7 գ/լ և 60,5 գ/լ, համապատասխանաբար, կուտակվում է հետևյալ բաղադրությամբ միջավայրում՝ սախարոզ – 15%, $(NH_4)_2SO_4$ – 5,5%, KH_2PO_4 – 0,1%, $MgSO_4$ – 0,1%, $CaCO_3$ – 5%, բիոտին – 500 մկգ/լ, թիամին – 70 մկգ/լ, D-ալանին – 100 մկգ/մլ, 250/220 պտ/ր աերացիայի պայմաններում: Ընտրված պայմաններում *Br. flavum* AA5, GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների միջոցով L-ալանինի սինթեզի համեմատական դինամիկան ներկայացված է նկար 6 - ում: Ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչները գերազանցում են *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամին նպատակային ամինաթթվի ելքով:



Նկ. 5 Աերացիայի տարբեր պայմաններում Br. flavum GL18 շտամ-արտադրիչի միջոցով սինթեզված L-ալանինի ելքը



Նկ. 6 L-ալանինի սինթեզի դինամիկան օպտիմալացված պայմաններում 1) Br. flavum AA5, 2) Br. flavum GL1, 3) Br. flavum GL18

7.3. L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացումը լաբորատոր կենսառեակտորում

Կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի պայմաններում օպտիմալացված տեխնոլոգիական ցուցանիշները հիմք են հանդիսացել 10 լ տարողությամբ և 7 լ աշխատանքային ծավալով «Biostat-S» լաբորատոր կենսառեակտորում *Br. flavum* GL18 շտամ-արտադրիչի միջոցով L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիայի մշակման համար:

Սկզբնական փուլում ֆերմենտացիան կենսառեակտորում իրականացվել է ըստ կոլբաներում կատարված օպտիմալացման պայմանների: Փորձերի արդյունքում պարզվել է, որ շաքարի սկզբնական 15% կոնցենտրացիան շտամի կողմից յուրացվել է 94 ժամում և ԿՀ-ում կուտակվել է 59,0 գ/լ L-ալանին ու ուղեկցող ամինաթթուներ՝ L-վալին – 3,37 գ/լ, L-գլուտամինաթթու – 2,1 գ/լ, L-լիզին – 1,0 գ/լ:

Հաշվի առնելով, որ 94 ժամ ֆերմենտացիայի տևողությունը նվազեցնում է պրոցեսի արտադրողականությունը, տեխնոլոգիայի կատարելագործման նպատակով փորձ է արվել կրճատել պրոցեսի տևողությունը՝ փոփոխելով միջավայրի pH - ը, լուծելի թթվածնի կոնցենտրացիան և այլն:

Փորձնական եղանակով պարզվել է, որ ամոնիումի սուլֆատի սկզբնական օպտիմալ կոնցենտրացիան 2,5% է, իսկ ազոտի աղբյուրի մնացած անհրաժեշտ քանակությունը (3,0%) պրոցեսի ընթացքում հնարավոր է աստիճանաբար լրացնել 25% - ոց ամոնիակի ջրային լուծույթի միջոցով:

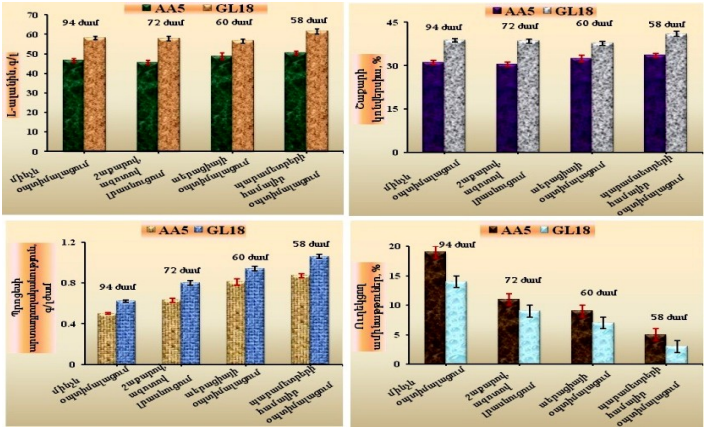
Ֆերմենտացիայի ընթացքն ուսումնասիրվել է pH 6,2-8,0 տիրույթում: Ստացված տվյալներից պարզվել է, որ կուլտուրայի օպտիմալ աճն ապահովելու համար նպատակահարմար է սկզբնական փուլում pH - ը պահել 7,8-8,0 տիրույթում, իսկ L-ալանինի սինթեզի ընթացքում՝ pH 6,8-7,0 տիրույթում:

L-ալանինի հնարավոր բարձր ելքն ապահովելու համար պրոցեսի ընթացքում իրականացվել է նաև շաքարով և ազոտով լրասնուցում: Շնորհիվ կիրառված որոշ տեխնոլոգիական մոտեցումների հաջողվել է «Biostat-S» կենսառեակտորում *Br. flavum* GL18 շտամի միջոցով ալանինի սինթեզի տևողությունը կրճատել 22 ժամով և 72 ժամում ստանալ գրեթե նույն քանակով L-ալանին: Ընդ որում, ուղեկցող ամինաթթուների գումարային ելքը նվազել է 6% - ով և կազմել է 8-10%, այդ թվում՝ գլուտամինաթթու՝ 1,5 գ/լ, վալին՝ 3,1 գ/լ, լիզին՝ 0,7 գ/լ:

Փորձերի արդյունքում պարզվել է, որ ֆերմենտացիայի ընթացքում *Br. flavum* GL18 շտամ-արտադրիչի պահանջարկը լուծելի թթվածնի նկատմամբ տարբեր է: Մասնավորապես, կենսասինթեզի մինչև 36-40 ժամը լուծելի թթվածնի

կոնցենտրացիան անհրաժեշտ է պահպանել 2,5-3,0 գ/լ ժամ տիրույթում, իսկ 40 - րդ ժամից մինչև ֆերմենտացիայի ավարտը՝ 1,5-1,8 գ/լ ժամ տիրույթում:

L-ալանինի կենսասինթեզն ուսումնասիրվել է նաև պահպանելով բոլոր օպտիմալացված պարամետրերը: Դրա համար ֆերմենտացիայի միջավայրում $(NH_4)_2SO_4$ - ի կոնցենտրացիան իջեցվել է մինչև 2,5% և կուլտուրայի աճման փուլում 8-12 ժամվա ընթացքում pH - ը պահվել է 7,8-8,0, ջերմաստիճանը՝ 32-34^{0}C տիրույթում, իսկ սինթեզի փուլում pH - ը պահվել է 6,8-7,0, ջերմաստիճանը՝ 30-32^{0}C տիրույթում: Պրոցեսի ընթացքում՝ որպես pH – ի կարգավորիչ, օգտագործվել է 25% - ոց ամոնիակի ջրային լուծույթը: Այս պայմաններում 58 ժամում գրանցվել է շաքարի ամբողջական յուրացում և ԿՀ-ում կուտակվել է 62,8 գ/լ L-ալանին: Միաժամանակ ԿՀ - ում նվազել է ուղեկցող ամինաթթուների քանակը (1,0 գ/լ L-վալին, 0,5 գ/լ L-գլուտամինաթթու, 0,3 գ/լ լիզին):



Նկ. 7 «Biostat-S» կենսառեակտորում L-ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացման արդյունքների գծապատկերը

Նկար 7 - ում ներկայացված են պարամետրերի օպտիմալացման արդյունքում *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամի և առավել ակտիվ *Br. flavum* GL18 շտամ-արտադրիչի կիրառմամբ պրոցեսների ցուցանիշները:

Այսպիսով, «Biostat-S» կենսառեակտորում L-ալանինի կենսասինթեզի օպտիմալացված տեխնոլոգիական պարամետրերի համալիր կիրառումը հնարավորություն տվեց բարձրացնել ԿՀ - ում L-ալանինի ելքը և նվազեցնել ուղեկցող ամինաթթուների քանակը, ինչը հանգեցրեց պրոցեսի արտադրողականության զգալի բարձրացմանը: Այս տվյալները հիմք են հանդիսանում L-ալանինի ստացման լաբորատոր կանոնակարգի մշակման համար և հնարավորություն են տալիս մշակված տեխնոլոգիան մրցունակ դարձնելու միջազգային շուկայում:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԻ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

L-ալանինը, հանդիսանալով փոխարինելի ամինաթթու, մեծ պահանջարկ ունի բժշկության, գյուղատնտեսության, սննդարդյունաբերության, սինթետիկ թելերի և օծանելիքի արտադրության բնագավառներում:

Արդյունաբերական մասշտաբներով L-ալանինն արտադրվում է էնզիմատիկ եղանակով, որը ներառում է մի շարք փուլեր՝ ֆերմենտ-արտադրիչ մանրէների կենսազանգվածի ստացում, նպատակային ֆերմենտային ակտիվությամբ օժտված կենսազանգվածի հիման վրա կենսակատալիզատորների ստացում, կենսատրանսֆորմացիայի փուլ, վերջնանյութի կորզում և մաքրում: Այս եղանակն ունի որոշ թերություններ՝ պայմանավորված թանկարժեք հումքով, բազմափուլությամբ, աշխատատարությամբ: Բացի դրանից պրոցեսի ընթացքում ռեակցիոն միջավայրի pH - ի շեղումները հնարավոր է կարգավորել միայն մասնակի՝ L-ասպարագինաթթուն օգտագործելով և որպես սուբստրատ, և որպես տիտրանտ: Այս դեպքում L-ասպարագինաթթվի թանկարժեքության հետ կապված բարձրանում է նպատակային ամինաթթվի ինքնարժեքը: Սա է հիմնական պատճառը, որ վերջին տարիների բազմաթիվ աշխատություններում նշվում է, որ էնզիմատիկ եղանակը նպատակահարմար է կիրառել L-ալանինի փոքրածավալ արտադրության դեպքում, իսկ մեծածավալ արտադրության համար ավելի արդյունավետ է մանրէաբանական եղանակը, քանի որ քանի որ փոխարինելի ելանյութի շնորհիվ զգալի նվազում է L-ալանինի ինքնարժեքը:

Ներկայումս հայտնի են տարբեր ցեղերին (*Arthrobacter, Corynebacterium*, *Escherichia*) պատկանող L-ալանինի շտամ-արտադրիչներ, որոնց միջոցով հնարավոր է մանրէաբանական եղանակով L-ալանինի ստացումը: Սակայն այդ շտամները նպատակահարմար չէ կիրառել արտադրական պայմաններում, քանի որ.

- *Arthrobacter* ցեղին պատկանող շտամների կուլտիվացումը երկարատև է և ամենակարևորը, ԿՀ - ում առաջանում են գարշահոտ նյութեր, որոնցից դժվար է անջատել և մաքրել L-ալանինը:
- *E. coli* մանրէն պայմանական ախտածին միկրոօրգանիզմ է:
- *E. coli* և *C. glutamicum* տեսակներին պատկանող L-ալանինի հայտնի շտամ-արտադրիչները ստացվել են գենային ինժեներիայի ճանապարհով և դրանց բնորոշ է սեգրեգացիոն անկայունությունը, պլազմիդի գենետիկական կառուցվածքի ու պլազմիդային շտամի կինետիկական անկայունությունը:
- *E. coli* և *C. glutamicum* տեսակներին պատկանող գենաինժեներային շտամ-արտադրիչների կուլտիվացումն իրականացվում է թանկարժեք բազմաբաղադրիչ միջավայրերում:

Ինչ վերաբերվում է *Brevibacterium* ցեղին, ապա պետք է նշել, որ գրականությունում նկարագրված այս ցեղին պատկանող շտամները ալանինը հիմնականում սինթեզում են DL ձևով, այնպես որ մանրէաբանական եղանակով L-ալանինի արտադրության կազմակերպման համար առաջնային խնդիր է բարձր արտադրողականությամբ օժտված շտամ-արտադրիչների ստացումը:

Այս նպատակով աշխատանքում հետազոտվել է «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ում նախկինում ստացված *Br. flavum* AA5 շտամ-արտադրիչի մոտ L-ալանինի սինթեզին մասնակցող հիմնական ֆերմենտների ակտիվության կարգավորումը և մշակվել են նոր, առավել ակտիվ շտամ-արտադրիչների ստացման ուղիներ:

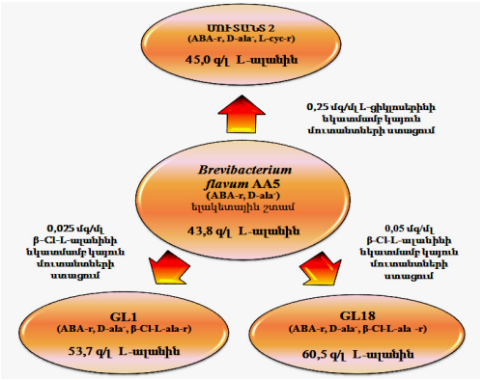
Առաջին հերթին պազվել է, որ D-ալանինի նկատմամբ առքսոտրոֆ ելակետային շտամը զրկված է ալանինռացեմազի ակտիվությունից և հենց դրա շնորհիվ սինթեզում է ալանինի L- ձևը:

Ուսումնասիրվել է որոշ միացությունների ազդեցությունը *Br. flavum* AA5 շտամ-արտադրիչի ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության վրա: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ DL-α-ԱԿԹ-ի

նկատմամբ կայունության մուտացիան չի ազդում վերջնանյութով այդ շտամի L-ալանինի կենսասինթեզի հիմնական ֆերմենտների՝ ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության արգելակման վրա:

Հաշվի առնելով, որ L-ցիկլոսերինը և β-Cl-L-ալանինը հանդիսանում են ալանինի նմանակներ և արգելակիչներ, ուսումնասիրվել է ֆերմենտների վրա դրանց ազդեցությունը: Պարզվել է, որ β-Cl-L-ալանինն առավել ուժեղ արգելակում է ալանինտրանսամինազի ակտիվությունը, իսկ L-ցիկլոսերինը՝ ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվությունը:

Ֆերմենտների ակտիվության արգելակման վերաբերյալ տվյալները հիմք են հանդիսացել գենետիկասելեկցիոն եղանակով նոր շտամ-արտադրիչների ստացման համար: Սելեկցիայի սխեման պատկերված է նկար 8 - ում:



Նկ. 8 L-ալանինի շտամ-արտադրիչների սելեկցիայի սխեման

Ինչպես երևում է նկար 8 - ից, աշխատանքներն իրականացվել են երկու ուղղությամբ՝ L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայուն մուտանտների ստացում, β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն մուտանտների ստացում:

Աշխատանքի առաջին փուլում ստացվել և ուսումնասիրվել են L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայուն և L-ալանին սինթեզելու ունակությամբ օժտված 33 մուտանտ: Դրանցից ոչ մեկի մոտ նպատակային ամինաթթվի ելքի զգալի բարձրացում չի նկատվել՝ չնայած նշված նմանակը ունի արգելակող ազդեցություն ալանին տրանսամինազ ֆերմենտի ակտիվության վրա:

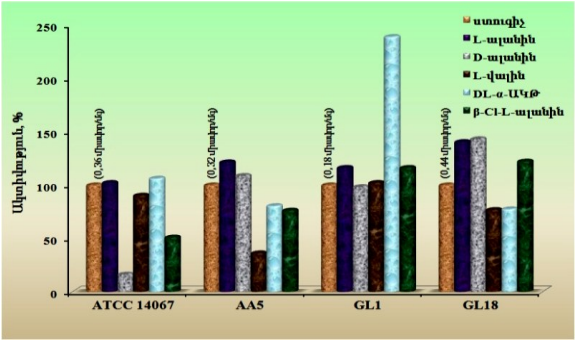
Հաջորդ փուլում ստացվել և ուսումնասիրվել են β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն 13 մուտանտ, որոնցից ընտրվել են երկու առավել ակտիվ *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչները:

Br. flavum GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների մոտ L-ալանինի ելքի բարձրացման պատճառների բացահայտման նպատակով ուսումնասիրվել են ալանինտրանսամինազի ու վալին—պիրուվատտրանսամինազի ակտիվության և սինթեզի կարգավորման մեխանիզմները:

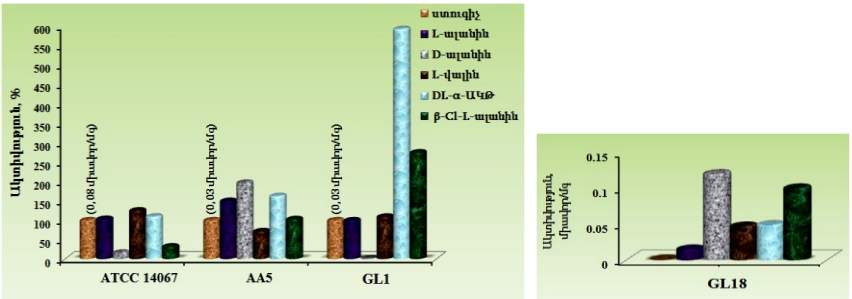
Պարզվել է, որ նոր շտամ-արտադրիչների մոտ β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայունության արդյունքում բավականաչափ նվազել է ալանինտրանսամինազի արգելակման աստիճանը, համեմատած ելակետային շտամի հետ, ինչը, հավանաբար, և հանգեցրել է L-ալանինի ելքի բարձրացմանը:

Ինչ վերաբերվում է ուսումնասիրվող ֆերմենտների սինթեզի մեխանիզմին, ապա, մեր կարծիքով, ընտրված շտամ-արտադրիչներում L-ալանինի գերսինթեզը

պայմանավորված է գենային մակարդակով ալանինտրանսամինազ և վալին—պիրուվատտրանսամինազ ֆերմենտների սինթեզի ապակարգավորմամբ (նկ. 9, 10), ինչպես նաև ֆերմենտների ակտիվության մակարդակով՝ վերջանյութով արգելակման վերացմամբ:



Նկ. 9 Որոշ միացությունների ազդեցությունը L-ալանինի շտամ-արտադրիչների ալանինտրանսամինազի սինթեզի վրա



Նկ. 10 Որոշ միացությունների ազդեցությունը L-ալանինի շտամ-արտադրիչների վալին—պիրուվատտրանսամինազի սինթեզի վրա

Ստացված շտամները հիմք են հանդիսացել մանրէաբանական եղանակով L-ալանինի սինթեզի ուսումնասիրման և տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացման համար:

Շտամ-արտադրիչների L-ալանին սինթեզելու պոտենցիալ հնարավորությունների բացահայտման համար աշխատանքում հետազոտվել են ցանքսամիջավայրի, ֆերմենտացիայի միջավայրի բաղադրությունը և ֆերմենտացիայի պարամետրերը կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի պայմաններում, հետագայում կենսառեակտորում դրանք կիրառելու և օպտիմալացնելու նպատակով:

Br. flavum GL1 և GL18 շտամների ֆիզիոլոգական առանձնահատկությունների ուսումնասիրման արդյունքում պարզվել է, որ L-ալանինի ելքը կախված է ցանքսամիջավայրում և ֆերմենտացիայի միջավայրում օգտագործվող՝ աճի գործոն հանդիսացող D-ալանինի և վիտամինների

կոնցենտրացիայից, ածխածնի աղբյուրի տեսակից և քանակից, ազոտի աղբյուրի քանակից, կավիճի, մակրոտարրերի քանակից, L-ալանինի ելքը պայմանավորված է նաև կենսասինթեզի ընթացքում աերացիայի պայմանների ճիշտ ընտրությունից:

Վերը նշված ուսումնասիրությունների արդյունքներից պարզվել է, որ *Br. flavum* GL1 և GL18 նոր շտամ-արտադրիչները կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի պայմաններում L-ալանինի առավելագույն քանակը՝ 53,7 գ/լ և 60,5 գ/լ, համապատասխանաբար, կուտակում են հետևյալ բաղադրությամբ միջավայրում՝ սախարոզ – 15%, $(NH_4)_2SO_4$ – 5,5%, KH_2PO_4 – 0,1%, $MgSO_4$ – 0,1%, $CaCO_3$ – 5%, բիոտին – 500 մկգ/լ, թիամին – 70 մկգ/լ, D-ալանին – 100 մկգ/մլ: Մինչև պրոցեսի 24 - րդ ժամը թափահարիչի արագությունը 250 պտ/ր և մինչև պրոցեսի ավարտը՝ 220 պտ/ր աերացիայի պայմաններում:

Այսպիսով, կատարված աշխատանքի արդյունքում ստացված *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչները կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի պայմաններում միջինը 23% և 38% - ով, համապատասխանաբար, գերազանցում են *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամին նպատակային ամինաթթվի ելքով, ինչպես նաև շաքարի կոնվերսիայով և պրոցեսի արտադրողականությամբ: Մասնավորապես, եթե ելակետային շտամով իրականացվող պրոցեսի արտադրողականության գործակիցը Y_p հավասար է 0,29 - ի, ապա *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների դեպքում համանման պայմաններում պրոցեսի գործակիցը կազմում է Y_p=0,36 և Y_p=0,40, համապատասխանաբար, ինչից հետևում է, որ համեմատած ելակետային շտամով իրականացվող ֆերմենտացիայի, *Br. flavum* GL1 շտամով ֆերմենտացիայի պրոցեսի արտադրողականությունը բարձր է 1,2 անգամ, իսկ *Br. flavum* GL18 շտամով՝ 1,4 անգամ:

Ստացված շտամ-արտադրիչների ալանին սինթեզելու հատկության լիարժեք դրսևորման համար դրանցից առավել ակտիվը՝ *Br. flavum* GL18 շտամ-արտադրիչը, փորձարկվել է լաբորատոր կենսառեակտորում, ինչի շնորհիվ հնարավորություն է ստեղծվել դինամիկայում ուսումնասիրել պրոցեսի տեխնոլոգիական պարամետրերը և օպտիմալացնել դրանք շտամի առանձնահատկություններին համապատասխան: Շնորհիվ ֆերմենտացիայի ընթացքում pH - ի, ջերմաստիճանի, աերացիայի փոփոխության, շաքարի և ազոտի լրասնուցման, կարգավորվել է կենսասինթեզի ընթացքը և մշակվել է բարձր արտադրողականությամբ L-ալանինի ստացման տեխնոլոգիա: Աշխատանքի շրջանակներում հաջողվել է կրճատել պրոցեսի տևողությունը, ֆերմենտացիայի միջավայրից բացառել մաքրման և անջատման փուլում բարդություն ստեղծող կավիճը, նվազեցնել ուղեկցող ամինաթթուների քանակը և բարձրացնել նպատակային ամինաթթվի ելքը:

Տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացման արդյունքում պարզվել է, որ ի տարբերություն կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի, *Br. flavum* AA5 շտամ- արտադրիչը լաբորատոր կենսառեակտորում 58 ժամում սինթեզում է մինչև 51,5 գ/լ L-ալանին, իսկ *Br. flavum* GL18 նույն ժամանակահատվածում՝ 62,8 գ/լ L-ալանին: Այս տվյալները վկայում են, որ տեխնոլոգիայի մշակման արդյունքում ֆերմենտացիայի պրոցեսի արտադրողականությունը AA5 շտամի դեպքում բարձրացել է և կազմում է 0,89 - ը 0,46 - ի դիմաց, իսկ GL18 շտամի դեպքում կազմում է 1,08՝ 0,63 - ի դիմաց:

Հաշվի առնելով, որ աշխատանքի շրջանակներում ստացված *Br. flavum* տեսակին պատկանող շտամ-արտադրիչները կայուն պահպանում են գենետիկական հատկանիշները և L-ալանինի սինթեզի ակտիվությունը գտնում ենք, որ այս եղանակը կարող է առաջարկվել առևտրայնացման համար:

ԳԻՏԱԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱՌԱՋԱՐԿՆԵՐ

Br. flavum **GL1 և GL18 L-ալանինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչների ստացման և մանրէաբանական եղանակով ալանինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիայի մշակման արդյունքների հիման վրա առաջարկվում է.**

- **L-ալանինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներ ստանալու համար գենետիկասելեկցիոն աշխատանքներում օգտագործել β-Cl-L-ալանին նմանակը:**
- **Մանրէաբանական եղանակով L-ալանինի ստացման համար կիրառել *Br. flavum* GL18 շտամ-արտադրիչը:**
- **Պրոցեսի բարձր արտադրողականությունն ապահովելու համար որպես ֆերմենտացիայի միջավայր օգտագործել հետևյալ բաղադրությամբ սինթետիկ միջավայրը՝ սախարոզ – 15%, $(NH_4)_2SO_4$ – 5,5%, KH_2PO_4 – 0,1%, $MgSO_4$ – 0,1%, $CaCO_3$ – 5%, բիոտին – 500 մկգ/լ, թիամին – 70 մկգ/լ, D-ալանին – 100 մկգ/մլ:**
- **L-ալանինի կենսասինթեզը կենսառեակտորում իրականացնել շաքարի և ազոտի աղբյուրի աստիճանական լրասնուցմամբ, կուլտուրայի աճման փուլում մինչև 8-12 ժամը pH - ը պահպանել 7,8-8,0, ջերմաստիճանը՝ 32-34^{0}C տիրույթում, իսկ սինթեզի փուլում pH - ը պահպանել 6,8-7,0, ջերմաստիճանը՝ 30-32^{0}C տիրույթում: Լուծելի թթվածնի կոնցենտրացիան կենսասինթեզի մինչև 36-40 ժամը պահպանել 2,5-3,0 գ/լժամ տիրույթում, իսկ 40 - րդ ժամից մինչև ֆերմենտացիայի ավարտը՝ 1,5-1,8 գ/լժամ տիրույթում:**

Թվարկված առաջարկները հիմնված են գործնականում իրականացված պրոցեսների արդյունքների վրա, որոնք ամրագրվել են ՀՀ արտոնագրերում:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. **Ուսումնասիրվել է L-ալանինի սինթեզի մեխանիզմը՝ *Br. flavum* տեսակի մանրէների մոտ: Բացահայտվել է, որ D-ալանինի նկատմամբ առաքսոտրոֆ *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամի մոտ L-ալանինը սինթեզվում է ալանինռացեմազի ակտիվության բացակայության հետևանքով:**
2. ***Br. flavum* AA5 շտամի առանցքային ֆերմենտների ակտիվության ուսումնասիրման արդյունքում պարզվել է, որ β-Cl-L-ալանինը հանդիսանում է ալանինտրանսամինազի, իսկ L-ցիկլոսերինը՝ վալին—պիրուվատտրանսամինազի առավել ուժեղ արգելակիչ: Արգելակումը վերանում է միջավայրին ալանին ավելացնելու դեպքում, հետևաբար նշված նյութերը կարող են օգտագործվել որպես նմանակներ:**
3. **Ստացվել են L-ցիկլոսերինի և β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն մուտանտներ: Պարզվել է, որ L-ցիկլոսերինի նկատմամբ կայունությունն էականորեն չի ազդում L-ալանին ելքի վրա: Միևնույն ժամանակ, ստացված β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչները L-ալանինի սինթեզի ակտիվությամբ զգալիորեն գերազանցում են ելակետային շտամի ակտիվությունը: Հետևաբար, L-ալանինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչներ ստանալու համար գենետիկասելեկցիոն աշխատանքներում նպատակահարմար է օգտագործել β-Cl-L-ալանին նմանակը:**
4. **Օպտիմալացվել են ստացված *Br. flavum* GL1 և GL18 շտամ-արտադրիչների կիրառմամբ կոլբաներում իրականացվող ֆերմենտացիայի տեխնոլոգիական պարամետրերը: Մշակված պայմաններում *Br. flavum* GL1 շտամ-արտադրիչը սինթեզում է 53,7 գ/լ, իսկ GL18 շտամը՝ 60,5 գ/լ L-ալանին: Արդյունքում՝ արտադրողականության գործակիցը կոլբաներում իրականացվող**

ֆերմենտացիայի պայմաններում կազմում է Y_p=0,36 և Y_p=0,40, համապատասխանաբար, ի տարբերություն *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամի (Y_p=0,29):

5. Առանցքային ֆերմենտների սինթեզի և ակտիվության կարգավորման մեխանիզմների ուսումնասիրման արդյունքում պարզվել է, որ ստացված շտամ-արտադրիչներում L-ալանինի գերսինթեզը պայմանավորված է ալանինտրանսամինազի և վալին—պիրուվատտրանսամինազի սինթեզի ապակարգավորմամբ, ինչպես նաև վերջանյութով այդ ֆերմենտների ակտիվության արգելակման վերացմամբ:
6. «Biostat-S» կենսառեակտորում կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմալացման արդյունքում *Br. flavum* GL18 առավել ակտիվ շտամ-արտադրիչը 58 ժամում սինթեզում է 62,8 գ/լ, իսկ *Br. flavum* AA5 ելակետային շտամը՝ 51,5 գ/լ L-ալանին: Մշակված եղանակի շնորհիվ բարձրանում է պրոցեսի արտադրողականությունը և ԿՀ - ում նվազում է ուղեկցող ամինաթթուների քանակը, ինչը հեշտացնում է նպատակային ամինաթթվի անջատման և մաքրման պրոցեսը:
7. *Br. flavum* տեսակի L-ալանինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչի հիման վրա մշակված մանրէաբանական սինթեզի եղանակով L-ալանինի ստացման արդյունավետ տեխնոլոգիան արտոնագրվել է ՀՀ - ում և կարող է առաջարկվել առևտրայնացման համար:

<u>Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատությունների ցուցակ</u>

1. ՀՀ Արտոնագիր № 2239A, L-ալանինի ստացման եղանակ / Վարդանյան Ա.Հ., Աղաջանյան Ա.Ե., Ավետիսովա Գ.Ե., <u>Մելքոնյան Լ.Հ.</u>, Չախալյան Ա.Խ., Սաղիյան Ա.Ս., 01.09.2008 – 6 էջ
2. **<u>Melkonyan L.H.</u>, Avetisova G.E., Hambardzumyan A.A., Chakhalyan A.Kh. Study of L-glutamate-pyruvate aminotransferase inhibition in wild type strain of *Brevibacterium flavum* 14067 and L-alanine strain-producer *Br.flavum* AA5 // International Conference *"State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution"*: Book of abstracts –Tsakhkadzor, September 28 – October 02, 2008. – P. 72**
3. **Vardanyan A.H., Avetisova G.E., <u>Melkonyan L.H.</u>, Aghajanyan A.E. Optimization of L-alanine biosynthesis process by oxygen balance // International Conference *"State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution"*: Book of abstracts – Tsakhkadzor, September 28 – October 02, 2008. – P. 80**
4. **<u>Melkonyan L.O.</u>, Avetisova G.Ye., Chakhalyan A.Kh., Hambardzumyan A.A., Saghyan A.S. Obtaining Novel Highly Active Strains-producers of L-alanine from *Brevibacterium flavum* // Scientific Seminar *"Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization"*: Book of abstracts –Yerevan, September 11-12, 2012. – P. 49**
5. ՀՀ Արտոնագիր № 2691A, L-ալանինի ստացման եղանակ / Ավետիսովա Գ.Ե., <u>Մելքոնյան Լ.Հ.</u>, Չախալյան Ա.Խ., Սաղյան Ա.Ս., 26.11.2012 – 5 էջ
6. **<u>Melkonyan L.H.</u>, Avetisova G.Y., Hambardzumyan A.A., Chakhalyan A.Kh., Saghyan A.S. Study of regulation of some key enzymes of L-alanine biosynthesis by *Brevibacterium flavum* producer strains // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2013. – V. 49. №2. – P. 120–124**

7. Мелконян Л.О. Оптимизация параметров биосинтеза L-аланина новыми штаммами-продуцентами *Brevibacterium flavum* // Биологический журнал Армении. – 2013. – Т. 65 №1. – С. 77–84
8. Мелконян Л.О., Амбарцумян А.А., Аветисова Г.Е., Чахалян А.Х., Сагиян А.С. Показатели материально-энергетического баланса биосинтеза L-аланина *Brevibacterium flavum* // Биотехнология. – 2013. – №3. – С. 47–50

МЕЛКОНЯН ЛУСИНЭ ОГАНЕСОВНА

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ L-АЛАНИНА И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: ***L-аланин, Brevibacterium flavum, мутация устойчивости, штамм-продуцент, аланинрацемаза, аланин-трансаминаза, валин:пируват-трансаминаза, лабораторный биореактор, ферментация***

Диссертационная работа посвящена получению высокоактивных штаммов-продуцентов L-аланина *Br. flavum*, изучению механизмов регуляции активности и синтеза ключевых ферментов биосинтеза L-аланина и получению L-аланина микробиологическим способом.

В качестве исходного штамма в работе использован устойчивый к DL-α-АМК, ауксотрофный по D-аланину штамм-продуцент *Br. flavum* AA5, который в условиях ферментации в колбах синтезирует до 43,8 г/л L-аланина.

С целью получения новых, более активных штаммов-продуцентов первоначально была изучена активность ключевых ферментов синтеза L-аланина.

Показано, что по сравнению с активностью аланинрацемазы у штамма дикого типа *Br. flavum* ATCC 14067, активность этого фермента у штамма *Br. flavum* AA5 снижена почти на 99%.

Было изучено также влияние структурных аналогов аминокислот – DL-α-АМК, L-циклосерина и β-Cl-Lаланина, а так же D-аланина, L-валина, которые связаны с биосинтезом L-аланина на активность аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. Исследования показали, что DL-α-АМК, L-циклосерин и β-Cl-L-аланин ингибируют активность аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. При этом β-Cl-L-аланин является наиболее сильным ингибитором аланин-трансаминазы, а L-циклосерин – валин:пируват-трансаминазы.

Данные об ингибировании активности ферментов послужили основой для получения новых, высокоактивных штаммов, устойчивых к этим аналогам.

В результате генетико-селекционных работ были отобраны штаммы, устойчивые к L-циклосерину и β-Cl-L-аланину. Наиболее активный штамм, устойчивый к 0,25 мг/мл L-циклосерина, на качалке в колбах синтезирует до 45 г/л L-аланина, а штаммы-продуценты *Br. flavum* GL1 и GL18, устойчивые к 0,025 мг/мл и 0,05 мг/мл β-Cl-L-аланина, в результате оптимизации технологических параметров процесса ферментации (по составу ферментационной и посевной среды, возрасту посевного материала и условий аэрации) в среде следующего состава: сахароза – 15%, $(NH_4)_2SO_4$ – 5,5%,

KH_2PO_4 – 0,1%, $MgSO_4$ – 0,1%, $CaCO_3$ – 5%, биотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин 100 мкг/мл в течение 96 часов синтезируют до 53,7 г/л и 60,5 г/л L-аланина, соответственно.

Исследования показали, что полученные новые штаммы-продуценты *Br. flavum* GL1 и GL18 по культурально-морфологическим признакам не отличаются от исходного штамма *Br. flavum* AA5. Эти штаммы депонированы в Центре депонирования микробов при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА под номерами MDC 11841 (*Br. flavum* GL1) и MDC 11842 (*Br. flavum* GL18).

Для выявления механизма сверхсинтеза L-аланина у штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 было изучено влияние β-Cl-L-аланина на активность аланин-трансаминазы. Выявлено, что у штамма *Br. flavum* GL1 50% – ное ингибирование активности этого фермента наблюдалось при 1.96 мМ β-Cl-L-аланина, а у штамма *Br. flavum* GL18 при концентрации более, чем 5.0 мМ β-Cl-L-аланина, в отличие от исходного штамма *Br. flavum* AA5, у которого 50% – ное ингибирование активности аланин-трансаминазы наблюдалось при 0.16 мМ β-Cl-L-аланина.

Таким образом, у полученных штаммов-продуцентов значительно снижена степень ингибирования аланин-трансаминазы.

Было также изучено влияние L-аланина, D-аланина, L-валина, D,L-α-АМК, β-Cl-L-аланина на синтез аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. Показано, что в отличие от штаммов *Br. flavum* AA5 и *Br. flavum* GL1, у наиболее активного штамма *Br. flavum* GL18 D-аланин и L-аланин оказывали значительное дерепрессирующее действие на синтез аланин-трансаминазы. В то же время, в отличие от штаммов *Br. flavum* AA5 и *Br. flavum* GL18, у штамма *Br. flavum* GL1 сильное дерепрессирующее действие отмечалось DL-α-АМК-ой. У полученных штаммов β-Cl-L-аланин оказывал дерепрессирующее действие.

Изучение синтеза валин:пируват-трансаминазы показало, что у штамма *Br. flavum* GL1 значительная дерепрессия наблюдалась DL-α-АМК, β-Cl-L-аланином, а у штамма *Br. flavum* GL18 в контрольных условиях активность валин:пируват-трансаминазы не наблюдалась, в сравнении с чем все исследуемые вещества оказывали дерепресирующее действие.

Таким образом, установлено, что у полученных высокоактивных штаммов-продуцентов *Br. flavum* сверхсинтез L-аланина обусловлен нарушением биосинтеза L-аланина как на генном уровне в результате разрегуляции синтеза ферментов аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы, так и на уровне активности этих ферментов путем снятия ингибирования конечным продуктом.

На основе штаммов-продуцентов была разработана технология биосинтеза L-аланина в биореакторе “Biostat-S“. Благодаря изменению pH, температуры, аэрации, а также подпитке сахаром и азотом в течение ферментации был отрегулирован процесс биосинтеза. В результате исследований удалось сократить продолжительность процесса, исключать из ферментационной среды осложняющий этап выделения и очистки L-аланина мел, уменьшить количество сопутствующих аминокислот и повысить выход целевой аминокислоты. При комплексном применении оптимизированных технологических параметров исходный штамм *Br. flavum* AA5 в лабораторном биореакторе в течение 58 часов синтезирует до 51,5 г/л L-аланина с

производительностью 0,89 г/л час, а штамм-продуцент *Br. flavum* GL18 – 62,8 г/л L-аланина с производительностью 1,08 г/л час. Этот способ получения L-аланина запатентован в РА и может быть предложен для коммерциализации.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 научных работ.

MELKONYAN LUSINE H.

OBTAINING OF HIGHLY ACTIVE STRAIN-PRODUCERS OF L-ALANINE AND DEVELOPMENT OF BIOSYNTHESIS TECHNOLOGY

SUMMARY

Key words: **L-alanine, *Brevibacterium flavum*, resistance mutation, strain-producer, alanine racemase, alanine transaminase, valine–pyruvate transaminase, laboratory bioreactor, fermentation**

The aim of this thesis was to obtain highly active *Br. flavum* strain-producers of L-alanine, to study the regulatory mechanisms of the activity and synthesis of key enzymes of L-alanine biosynthesis, and to produce L-alanine by microbiological methods.

The initial strain used in this study is *Br. flavum* AA5 strain-producer that is resistant to DL-α-ABA and auxotrophic to D-alanine. This strain synthesizes up to 43.8 g/l of L-alanine in flask fermentation conditions.

To obtain new, more active strain-producers, the activity of key enzymes of L-alanine synthesis was first studied.

The results showed that the activity of alanine racemase in the *Br. flavum* AA5 strain-producer is reduced by almost 99% compared to that in the *Br. flavum* ATCC 14067 wild-type strain.

The influence of some amino acids: D-alanine, L-valine and their structural analogs: DL-α-ABA, L-cycloserine, β-Cl-L-alanine on both alanine and valine–pyruvate transaminases activity in the initial *Br. flavum* AA5 strain was also studied. The results demonstrated that DL-α-ABA, L-cycloserine and β-Cl-L-alanine inhibited the activity of alanine and valine–pyruvate transaminases in this strain. It is worth mentioning that β-Cl-L-alanine was the strongest inhibitor of alanine transaminase, while L-cycloserine strongly inhibited valine–pyruvate transaminase.

This inhibition of the activity of these enzymes served as the basis for obtaining new, highly active strains resistant to these analogs.

As a result of genetic selection, strains resistant to β-Cl-L-alanine and to L-cycloserine were selected. The most active strain, resistant to 0.25 mg/ml of L-cycloserine, synthesized up to 45 g/l of L-alanine in flasks on a shaker. While *Br. flavum* GL1 and GL18 strain-producers, resistant to 0.025 mg/ml and 0.05 mg/ml of β-Cl-L-alanine, synthesized up to 53.7 and 60.5 g /l L-alanine respectively. The cultures were done under optimized fermentation conditions (the composition of fermentation and inoculum media, age of inoculum and aeration conditions) in a medium of the following composition: sucrose – 15%, $(NH_4)_2SO_4$ – 5.5%, KH_2PO_4 – 0.1%, $MgSO_4$ – 0.1%, $CaCO_3$ – 5% biotin - 500 µg/l, thiamin - 70 µg /l, D-alanine, 100 µg/ml in 96 hours.

The study demonstrated that the obtained new *Br. flavum* GL1 and GL18 strain-producers did not differ from the initial strain *Br. flavum* AA5 by their cultural and morphological characteristics. These strains were deposited in the Microbial Depository Center of SPC "Armbiotechnology" NAS RA under numbers MDC 11841 (*Br. flavum* GL1) and MDC 11842 (*Br. flavum* GL18).

To reveal the mechanism of L-alanine overproduction in the *Br. flavum* GL1 and GL18 strain-producers, the effect of β-Cl-L-alanine on the alanine transaminase activity was studied. It was demonstrated that in the case of the *Br. flavum* GL1 strain, 50% inhibition of alanine transaminase activity was observed at 1.96 mM concentration of β-Cl-L-alanine, and with *Br. flavum* GL18 strain the same was observed at concentration of over 5.0 mM compared to the initial *Br. flavum* AA5 strain, which showed 50% inhibition of alanine transaminase activity at 0.16 mM concentration of β-Cl-L-alanine. Thus, the obtained strain-producers demonstrated a significantly reduced level of alanine transaminase inhibition.

The influence of L-alanine, D-alanine, L-valine, DL-α-ABA, β-Cl-L-alanine on the synthesis of alanine and valine–pyruvate transaminases, was next studied. It was demonstrated that L-alanine and D-alanine had a significant derepressive effect on alanine transaminase synthesis in the most active strain *Br. flavum* GL18 in contrast to the *Br. flavum* AA5 and *Br. flavum* GL1 strains. At the same time, DL-α-ABA had a strong derepressive effect on the enzyme synthesis in *Br. flavum* GL1 strain compared to the *Br. flavum* AA5 and *Br. flavum* GL18 strains.

Study of the synthesis of valine–pyruvate transaminase showed that DL-α-ABA, β-Cl-L-alanine had a significant derepressive effect on the enzyme synthesis in *Br. flavum* GL1 strain. No activity of valine–pyruvate transaminase was observed in *Br. flavum* GL18 strain compared to which all investigated substances exhibited a derepressive effect.

In summary, it was shown that the overproduction of L-alanine, observed in the obtained highly active *Br. flavum* strain-producers, is conditioned by the disregulation of L-alanine biosynthesis at both the genetic level resulting from the downregulation of the synthesis of alanine and valine–pyruvate transaminases, and at the level of enzymatic activity of these transaminases due to the loss of their inhibition by the end product.

On the basis of strain-producers the technology for L-alanine biosynthesis in the "Biostat-S" bioreactor was developed. The changes in pH, temperature, aeration, as well as sugar and nitrogen fed-batch, allowed regulating the process of biosynthesis during fermentation. As a result of our investigations it became possible to reduce the duration of the whole process, to exclude chalk from the fermentation medium, which otherwise complicates the separation and purification of L-alanine, to reduce the amount of concomitant amino acids as well as increase the yield of the target amino acid. With combined application of all optimized technological parameters, the initial *Br. flavum* AA5 strain synthesizes up to 51.5 g/l of L-alanine with 0.89 g/lh productivity, while *Br. flavum* GL18 strain-producer synthesizes 62.8 g/l of L-alanine with 1.08 g/lh productivity in a laboratory bioreactor in 58 hours. This method of L-alanine production was patented in RA and can be suggested for commercialization.

8 papers have been published on the subject of the thesis.