ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ԲԱԳԻՇ ԱՇՈՏԻ

# ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ 5-ԱՄԻՆԱԼԵՎՈՒԼԻՆԱԹԹՎԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

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

## ՍԵՂՄԱԳԻՐ

**ԵՐԵՎԱՆ – 2018**

---

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

АРУТЮНЯН БАГИШ АШОТОВИЧ

# ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

## АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени**
**кандидата биологических наук**
**по специальности 03.00.07 – «Микробиология. биотехнология»**

**Ереван - 2018**

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

Գիտական ղեկավար — ան.գ.թ. Վ.Բ. Գոգինյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ — կ.գ.դ. Ն.Ս. Վարդանյան

կ.գ.թ. ԱԱ Համբարձումյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ — Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2018թ. հուլիսի 17-ին ժամը $15^{00}$-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-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 «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:
Սեղմագիրն առաքված է 2018թ. հունիսի 16-ին:

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

---

Тема диссертации утверждена в НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель: — к.в.н. В.Б. Гогинян

Официальные оппоненты: — д.б.н. Н.С. Варданян
к.б.н. А.А. Амбарцумян

Ведущая организация: — Ереванский Государственный Университет

Защита диссертации состоится 17 июля 2018 г. в $15^{00}$ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнология ВАК РА, действующего при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./факс: (+374 10) 65 41 80.
С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.
Автореферат диссертации разослан 16 июня 2018 г.

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

## ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

**Ատենափտության թեմայի արդիականությունը**

5-ամինալևուլինաթթուն (δ-ամինալևուլինաթթու, $C_5H_9NO_3$) օրգանական թթու է, այն էնդոգեն միացություն է, որը հանդիսանում է պորֆիրինի կենսաբանական նախորդը՝ բույսերի և կենդանիների օրգանիզմներում:

Հայտնի են 5-ամինալևուլինաթթվի (5-ԱԼԹ) կենսասինթեզի երկու եղանակներ: Ֆոտոսինթեզ չիրականացնող օրգանիզմների մոտ (կենդանիներ, սնկեր, պարզագույն միաբջիջ օրգանիզմներ) 5-ԱԼԹ-ն առաջանում է գլիցինից և սուկցինիլ-CoA-ից՝ պիրիդոքսալֆոսֆատկախյալ 5-ամինալևուլինատսինթետազ ֆերմենտի ազդեցությամբ: Այս ռեակցիան հայտնի է Շեմինի ուղի անվանումով [Woodard, Dailey, 1995]: Բույսերի, ջրիմուռների, բակտերիաների (բացի α-պրոտեոբակտերիաներից) և արխեաների մոտ 5-ԱԼԹ-ն առաջանում է գլուտամինաթթվից՝ միջանկյալ գլուտամիլ-փՌՆԹ-ի և գլուտամատ-1-կիսապալդեհիդի միջոցով: Սինթեզին մասնակցում են գլուտամիլ-փՌՆԹ-սինթետազ և գլուտամատ-1-կիսապալդեհիդ ամինոտրանսֆերազ ֆերմենտները: Ռեակցիաները հայտնի են $C_5$-ուղի, կամ Բիլի ուղի անվանումով [Beale, 1990]:

5-ԱԼԹ-ն ունի կիրառման լայն հեռանկարներ, որով էլ պայմանավորված է աշխարհի մի շարք երկրներում արտահայտված հետաքրքրությունը վերջինիս նկատմամբ: Այսպես օրինակ, 5-ԱԼԹ-ն առաջարկվել է կիրառել որպես բույսերի աճի խթանիչ և հերբիցիդ միջոց [Европейский патент, EP №514776, 1992]: Բացի այդ, 5-ԱԼԹ-ն օժտված է ուռուցքային բջիջներում կուտակվելու ընդունակությամբ և տեսանելի լույսով ճառագայթման դեպքում փոխարկվում է պրոտոպորֆիրին IX-ի, որը ֆոտոսենսիբիլիզատոր միացություն է: Այդ պատճառով 5-ԱԼԹ-ն առաջարկվել է կիրառել տարբեր տեղակայման չարորակ նորագոյացությունների, ինչպես նաև ոչ ուռուցքային բնույթի մաշկային հիվանդությունների ֆոտոախտորոշման և ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար [Peng *et al*., 1997]: Հատուկ հետաքրքրություն է ներկայացնում 5-ԱԼԹ-ինդուկցված ֆլուորեսցենցիայի օգտագործման հնարավորությունը չարորակ ուռուցքային պրոցեսի տեղային տարածվածության ինտրաօպերացիոն ախտորոշման համար, ինչպես նաև սպեցիֆիկ բուժման արդյունավետության հետագա վերահսկողության տեսանկյունից:

Հայտնի են այս միացության ստացման մի շարք սինթետիկ մեթոդներ: Հաշվի առնելով լևուլինաթթվի մատչելիությունը՝ առավել հաճախ որպես

5-ԱԼԹ-ի քիմիական սինթեզի ելանյութ հանդես է գալիս 5-բրոմլևուլինաթթվի եթերը [Morton *et al*., 1993; Ha *et al*., 1994]: Չնայած բրոմտեղակալված միացությունների ստացման դժվարություններին, այս մեթոդը մինչ այժմ չի կորցրել իր արդիականությունը և նույնիսկ ստացել է հետագա զարգացում [US Pat. 5907058, 1999; US Pat. 6583317, 2002; Тростянко и др., 2009]:

5-ԱԼԹ-ի ստացման կենսաբանական եղանակը հանդիսանում է այլընտրանքային, քանի որ այն, համեմատած քիմիական սինթեզի հետ, քիչ ծախսատար է և տնտեսապես արդյունավետ: Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների որոշ ցեղեր, մասնավորապես *Rhodobacter (Rba.)*, *Rhodopseudomonas (Rps.), Rhodospirillum (Rsp.)*, ինչպես նաև մի շարք այլ մանրէներ, ընդունակ են կուտակել և տնտեսական տեսանկյունից շահավետ քանակներով սննդամիջավայրի մեջ արտազատել 5-ԱԼԹ:

Ներկայումս 5-ԱԼԹ-ի արդյունավետ արտադրիչներից մեկը համարվում է *Rba. sphaeroides* շտամը, որի մոտ նպատակային նյութի կենսասինթեզի ելքը կազմում է 33.8մգ/լ-ից մինչև 260մգ/լ [Anderson *et al*., 1993, Ishii *et al*., 1990, Sasaki *et al*., 1991]:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների հանդեպ հատուկ հետաքրքրությունը պայմանավորված է դրանց լայն նյութափոխանակային հնարավորություններով: *Rhodospirillaceae* ցեղի ներկայացուցիչներն ընդունակ են հինգ տարբեր տեսակի աճի. (i) արևային լույսի էներգիայի հաշվին ֆոտոլիտոավտոտրոֆ աճ՝ որպես էլեկտրոնների դոնոր օգտագործվում է $H_2$, որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր և ածխածնի աղբյուր՝ $C0_2$, (ii) անաերոբ պայմաններում ֆոտոհետերոտրոֆ աճ՝ որպես էլեկտրոնների դոնոր օգտագործվում են տարբեր օրգանական միացություններ, (iii) մթության մեջ անաերոբ աճ՝ որպես էլեկտրոնների դոնոր և էներգիայի միակ աղբյուր օգտագործվում են տարբեր շաքարներ, (iv) մթության մեջ աերոբ քեմոհետերոտրոֆ աճ (v) մթության մեջ աերոբ քեմոհետերոտրոֆ աճ՝ որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր կիրառվում է $0_2$–ը, որպես ածխածնի աղբյուր՝ $CO_2$-ը [Madigan *et al*., 1979; Зинченко, 1996]: Այդ պատճառով ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ներկայացուցիչները կիրառվում են որպես մոդելային օբյեկտներ՝ ֆոտոսինթեզի, մեմբրանների բիոգենեզի, $CO_2$-ի և $N_2$-ի ֆիքսման մի շարք հիմնարար պրոցեսների ուսումնասիրման համար:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների լայն նյութափոխանակային հնարավորությունները թույլ են տալիս գենետիկական վերահսկողության մակարդակով հետազոտել այդ պրոցեսների փոխազդեցություններն այն դեպքում, երբ այլ կենսաբանական համակարգերում դրանք

տարանջատված են: Դրա հետ միաժամանակ, ծիրանագույն ֆոտոսինթեզող բակտերիաների հսկայական կենսաբանական բազմազանությունը թույլ է տալիս իրականացնել ցանկալի հատկություններով օժտված ակտիվ շտամ-արտադրիչների նպատակային լայն ընտրություն, ինչպես նաև իրականացնել տարբեր գեն-ինժեներային միջամտություններ՝ դրանց արտադրական ցուցանիշների բարձրացման նպատակով:

Ելնելով վերը շարադրվածից՝ խնդիր է դրվել ուսումնասիրել 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ:

**Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները**

Հետազոտությունն ուղղված է ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կողմից 5-ամինալևուլինաթթվի կենսասինթեզի ուսումնասիրմանը: Այդ նպատակով ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գիտաարտադրական կենտրոնի (ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ) այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի մանրէների հավաքածուից ընտրվել են *Rhodobacter, Rhodopseudomonas* և *Rhodospirillum* ցեղերին պատկանող ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներ, կատարվել է դրանց ուսումնասիրում և բնութագրում՝ որպես 5-ԱԼԹ-ի հեռանկարային շտամ-արտադրիչներ: Նպատակն իրագործելու համար առաջադրվել և լուծվել են հետևյալ խնդիրները.

- *Rhodobacter, Rhodopseudomonas* և *Rhodospirillum* ցեղերի ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաներից 5-ԱԼԹ-ի պոտենցիալ շտամ-արտադրիչների ընտրություն և համեմատական բնութագրում:
- Ժամանակակից մոլեկուլային գենատիպավորման մեթոդների կիրառմամբ 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող շտամների նույնականացում:
- 5-ԱԼԹ-ի ելքի բարձրացման նպատակով ընտրված բակտերիաների ինդուկցված քիմիական մուտագենեզի իրականացում և առավել ակտիվ մուտանտների մեկուսացում:
- Ընտրված մուտանտ շտամի մոտ կենսազանգվածի առաջացման և 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի վրա սննդամիջավայրի տարբեր բաղադրիչների ու կենսասինթեզի առանցքային գործոնների (ջերմաստիճան, լուսավորության ռեժիմ, pH) ազդեցության ուսումնասիրում: 5-ԱԼԹ-ի ելքի օպտիմալացում՝ լաբորատոր պայմաններում և կենսառեակտորում:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը**

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ *Rhodobacter (Rba.) azotoformans* ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիան ընդունակ է սինթեզել 5-ԱԼԹ: Բարձր ելքով 5-ԱԼԹ-ի ստացման նպատակով ուսումնասիրվել և օպտիմալացվել են 5-ԱԼԹ-ի կենասինթեզի պայմանները: Մասնավորապես,

1. 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծության հիման վրա իրականացվել է 5-ԱԼԹ սինթեզող՝ հավաքածուում որպես *«Rba. capsulatus»* ավանդադրված շտամի մոլեկուլային-գենետիկական նույնականացում, որի արդյունքում այն վերադասակարգվել է որպես *Rba. azotoformans*:
2. Առաջին անգամ ինդուկցված մուտացիաների արդյունքում ստացվել է *Rba. azotoformans*-ի՝ 5-ԱԼԹ-ի բարձրարդյունավետ արտադրիչ հանդիսացող E10 շտամը:
3. Պարզվել է որոշ հավելումների (գլիցին, գլուտամատ, մալատ, սուկցինատ, լևուլինաթթու) և շրջապատող միջավայրի գործոնների (ջերմաստիճան, լուսավորություն, pH) ազդեցությունը տարբեր սննդամիջավայրերում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի ելքի վրա:
4. Առաջին անգամ ցույց է տրվել մանրէաբանական ճանապարհով ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կողմից 5-ԱԼԹ-ի ստացման տնտեսական արդյունավետությունը:

**Աշխատանքի գործնական նշանակությունը**

1. Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս իրականացնել ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների՝ որպես 5-ԱԼԹ-ի հեռանկարային շտամ-արտադրիչների նպատակային ընտրություն:
2. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների տարբեր տեսակների մոտ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի օրինաչափությունները կարող են օգտագործվել նշված բակտերիաների արդյունաբերական կուլտիվացման՝ 5-ԱԼԹ և մի շարք այլ կենսաբանորեն ակտիվ միացություններ ստանալու նպատակով գիտական հիմքերի մշակման համար:
3. Հետազոտությունների արդյունքները կարող են գործնականում հիմք հանդիսանալ մանրէաբանական ճանապարհով 5-ԱԼԹ-ի արտադրության համար:

4. Աշխատանքի ընթացքում *Rba. azotoformans*-ի ֆիլոգենետիկ առանձնահատկությունների վերաբերյալ ստացված նոր տվյալները կարող են վկայել ազոտային և ածխածնային նյութափոխանակային ուղիների գենետիկական մակարդակով փոխկապակցվածության մասին, ինչը նորովի է լուսաբանում ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ նշված հիմնարար կենսաբանական պրոցեսների համակարգման խնդիրը:

**<u>Պաշտպանության ներկայացվող հիմնական դրույթները</u>**

1. ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի կուլտուրաների հավաքածուում ընդգրկված *Rhodobacteraceae* ընտանիքին պատկանող *Rba. capsulatus* MDC 6508 շտամը, համաձայն 16S ռՌՆԹ գենի սեքվենավորման տվյալների և ֆիլոգենետիկ անալիզի, նույնականացվել է որպես *Rba. azotoformans*:
2. *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505 և *Rps. palustris* MDC 6506 վայրի շտամները Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում կուլտիվացման ստանդարտ պայմաններում սինթեզում են 5-ԱԼԹ-ի ոչ էական քանակներ, մինչդեռ *Rba. azotoformans*-ի E10 մուտանտը, որը ստացվել է ինդուկցված մուտացիաների եղանակով, հանդիսանում է 5-ԱԼԹ-ի բարձր ակտիվությամբ արտադրիչ:
3. Շրջապատող միջավայրի գործոնները (pH, լուսավորություն, ջերմաստիճան), ինչպես նաև սննդամիջավայրի որոշ բաղադրիչներ (գլիցին, գլուտամատ, մալատ, սուկցինատ, լևուլինաթթու) կախված կոնցենտրացիայից ազդում են հեղուկ սննդամիջավայրերում 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի վրա:
4. *Rba. azotoformans*-ի E10 մուտանտ շտամի անընդհատ կուլտիվացման պայմաններում հեղուկ սննդամիջավայրում գլիցինի, սուկցինատի, լևուլինաթթվի և գլուտամատի օպտիմալ կոնցենտրացիաները նպաստում են 5-ԱԼԹ-ի առավել ագույն ելքին:
5. Հեղուկ սննդամիջավայրում մալատի՝ որպես ածխածնի հիմնական աղբյուրի ավելացումը զգալիորեն բարձրացնում է 5-ԱԼԹ-ի ելքը:
6. Մանրէաբանական ճանապարհով 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի տնտեսական շահավետությունը:

**<u>Ատենախոսական աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ</u>**

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում, «Հետազոտություններ կենսատեխնոլոգիայի և մանրէաբանության բնագավառներում» բազային ծրագրի՝ Ֆոտոսինթեզող մանրէների կենսաբանական առանձնահատկությունների ուսումնասիրումը և դրանց հեռանկարային կիրառումը կենսատեխնոլոգիայում աշխատանքի, ինչպես նաև ՀՀ ԿԳՆ ԳՊԿ-ի №16A-1f37 ծածկագրով «Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների միջոցով 5-ամինալևուլինաթթվի կենսասինթեզի առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունը» գիտական նախագծի և HORIZON 2020 ծրագրի Մարիա Սկլադովսկայա Կյուրի դրամաշնորհի Phoenix նախագծի միջոցներով (դրամաշնորհ՝ 690925-Phoenix, MSCA): Ատենախոսական աշխատանքի արդյունքները մասնակիորեն ներկայացվել են նշված ծրագրերի ընթացիկ և տարեկան հաշվետվություններում:

**<u>Աշխատանքի իրականացման վայր</u>**

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայում, Զագրեբի համալսարանի սննդի տեխնոլոգիայի և կենսատեխնոլոգիայի ֆակուլտետի կենսաքիմիական ճարտարագիտության ամբիոնի կենսաքիմիական ճարտարագիտության և արդյունաբերական մանրէաբանություն լաբորատորիայում (Խորվաթիա): 16S ռՌՆԹ-ի գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության վերծանումը իրականացվել է «Macrogen» ընկերության (Հարավային Կորեա) կողմից:

**<u>Ատենախտի անձնական ներդրումը</u>**

Բ.Ա. Հարությունյանը, գիտական ղեկավար ան.գ.թ. Վ.Բ. Գոգինյանի գլխավորությամբ իրականացրել է հետազոտությունների խնդրի ձևակերպումը, հետազոտությունների ուղղությունների ընտրությունը, նպատակների և առաջադրանքների որոշումը, փորձարարական մոտեցումների մշակումն ու արդյունքների վերլուծությունը: Հետազոտության բոլոր փուլերում հայցորդն ունեցել է իր անձնական մասնակցությունը:

Համահեղինակությամբ իրականացված աշխատանքներում հայցորդը մասնակցել է փորձարարական աշխատանքների իրականացմանը, ստացված արդյունքների ամփոփմանը և մեկնաբանմանը, գիտական հոդվածների պատրաստմանը, ինչպես նաև հանդես է եկել գիտական զեկույցով:

**<u>Ատենախտական աշխատանքի approbation</u>**

Հետազոտության արդյունքները ներկայացվել են «Կենսատեխնոլոգիա. գիտություն և պրակտիկա» երիտասարդ գիտնականների 4-րդ միջազգային գիտաժողովում (Հայաստան, Երևան, 2017) և զեկուցվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում:

**Հրատարակված աշխատությունները**

Ատենախոսության հիմնադրույթներն ու արդյունքներն ամփոփված են 8 գիտական աշխատություններում՝ 6 հոդվածներում և միջազգային գիտաժողովի 2 թեզիսներում:

**Աշխատանքի կառուցվածքը և ծավալը**

Ատենախոսական աշխատանքը շարադրված է համակարգչային շարվածքով՝ 126 էջի վրա և ներառում է 44 նկար ու 15 աղյուսակ: Ատենախոսությունը կազմված է հետևյալ բաժիններից՝ «Բովանդակություն», «Ներածություն», «Գրական ակնարկ», «Նյութեր և մեթոդներ», «Փորձարարական մաս», «Եզրակացություններ», 194 հղում պարունակող «Գրականության ցանկ», «Հապավումների ցանկ» և երկու հավելվածներից:

## ԳԼՈՒԽ1.
## *ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ*

«Գրական ակնարկ» գլխում մանրամասն շարադրված է խնդրի արդի դրվածքը: Ներկայացված են տվյալներ ֆոտոսինթեզող բակտերիաների հսկայական կենսաբազմազանության, բնության մեջ դրանց դերի և նյութափոխանակային առանձնահատկությունների մասին: Մասնավորապես, ցույց է տրված ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կողմից 5–ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի ուսումնասիրման կարևորությունը: Ներկայացված են կենդանի օրգանիզմների, այդ թվում մանրէների մոտ 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի ուղիների մասին ժամանակակից պատկերացումները և ձեռքբերումները, ինչպես նաև բերված են տվյալներ 5-ԱԼԹ-ի բժշկության և գյուղատնտեսության բնագավառներում կիրառման վերաբերյալ:

## *ՓՈՐՁՆԱԿԱՆ ՄԱՍ*
## ԳԼՈՒԽ2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ, ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Ուսումնասիրվել է *Rhodobacter (Rba.) azotoformans* (նախկին *Rha. capsulatus* MDC 6508), *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rhodospirillum (Rsp.) rubrum* MDC 6505 և *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris* MDC 6506 տեսակներին պատկանող ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կողմից 5-ԱԼԹ-ի սինթեզը:

Նշված շտամները, որոնք նախկինում մեկուսացվել են Հայաստանի տարբեր հանքային ջրերից [Պարոնյան, 2010] և պահպանվում են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի մանրէների հավաքածուում, ինչպես նաև ավանդադրված են նույն Կենտրոնի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում:

Մանրէների կուլտիվացումը և արտադրողական հատկությունների գնահատումն իրականացվել են Օրմերոդի հեղուկ և ագարային [Ormerod *et al.*, 1961], GA՝ գլուտամատ-ացետատ [Suwansaard, 2010], GG՝ գլուտամատ-գլյուկոզ [Nishikawa *et al.*, 1999] և GM՝ գլուտամատ-մալատ [Nishikawa *et al.*, 1999] պարունակող հեղուկ սննդամիջավայրերում:

Բակտերիաների քիմիական մուտագենեզն իրականացվել է նիտրոզոգուանիդինի միջոցով՝ ըստ Nishikawa *et al*., 1999:

Կուլտուրալ հեղուկներում 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերումն իրականացվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ Էրլիխի գունաչափական [Sato *et al.*, 1981], նրբաշերտ [Шаршунова и др., 1980, Биргер, 1982], գազային [Trontel, 2017] և բարձրարդյունավետ հեղուկային [Suwansaard, 2016] քրոմատոգրաֆիայի եղանակներով:

Բակտերիաների նույնականացում իրականացվել է մոլեկուլյային գենետիկական մեթոդներով: Բակտերիաների բջիջներից ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացվել է համաձայն Zho *et al.*, 1993: 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացիան իրականացվել է ՊՇՌ-ի միջոցով՝ 16S ռՌՆԹ-ի ունիվերսալ պրոկարիոտային զույգ պրայմերների կիրառմամբ՝ 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) և 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT):

16S ռՌՆԹ գենի սեկվենավորումն իրականացվել է «Macrogen» ընկերությունում: Ստացված տվյալների վերլուծությունն իրականացվել է BLAST ալգորիթմի կիրառմամբ (http:www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) [Zhang *et al.*, 2000]:

Ֆիլոգենետիկ վերլուծությունն իրականցվել է MEGA6 ծրագրային ապահովման կիրառմամբ [Rossello-Mora *et.al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2007]:

Նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հավասարեցումն իրականացվել է ClustalW ալգորիթմի օգտագործմամբ [Thompson *et.al*., 1994]:

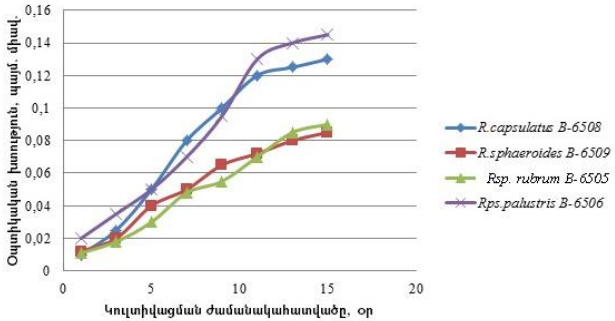
Ֆիլոգենետիկ ծառերի կառուցման համար օգտագործվել է Neighbor-Joining-ի մեթոդը [Clarridge, 2004]:

## ԳԼՈՒԽ 3. ԾԻՐԱՆԱԳՈՒՅՆ ՈՉ ԾԾՄԲԱՅԻՆ ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԱՅԴ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ 5-ԱԼԹ ԱՐՏԱԴՐԻՉ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Հայտնի է, որ ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաները հատկապես ակտիվ զարգանում են

ֆոտոօրգանոհետերոտրոֆ պայմաններում: Այդ պատճառով դրանց պահպանման և կուլտիվացման համար առավել օպտիմալ սննդամիջավայր է հանդիսանում Օրմերոդի [Ormerod *et al.*, 1961] կողմից առաջարկված հեղուկ սննդամիջավայրը: Բակտերիաների աճի գնահատումն իրականացվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ λ=520 նմ ալիքի երկարության տակ: Աճեցման նույն պայմանների դեպքում (2000 լյուքս լուսավորություն, 28$^0$C, 15 օր ինկուբացման ժամանակահատված) ընտրված կուլտուրաները, ելնելով իրենց տեսակային առանձնահատկություններից, ցուցաբերել են կենսազանգվածի կուտակման տարբեր դինամիկա, ինչպես ցույց է տրված նկ. 1-ում:

Համաձայն ստացված տվյալների, կուլտիվացման միևնույն ժամանակահատվածում *Rba. capsulatus* MDC 6508 և *Rps. palustris* MDC 6506 կուլտուրաների մոտ, համեմատած *Rba. sphaeroides* MDC 6509 և *Rsp. rubrum* MDC 6505 կուլտուրաների, կենսազանգվածի կուտակումն ավելի ինտենսիվ է (նկ. 1):




***Նկար 1. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճի դինամիկան***

Հետագա ուսումնասիրություններն ուղղված են եղել Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում *Rba. capsulatus* MDC 6508, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505 և *Rps. palustris* MDC 6506 ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների վայրի շտամների կուլտիվացման ընթացքում 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերմանը: 5-ԱԼԹ-ի քանակությունը կուլտուրալ հեղուկներում գնահատվել է ԲԱՀՔ եղանակով: Պարզվել է, որ նշված բոլոր շտամներն արտադրում են 5-ԱԼԹ, սակայն կուլտիվացման ստանդարտ պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի ելքը բավական ցածր է. համապատասխանաբար՝ 2.5, 13.0, 1.8 և 13.3 մգ/լ:

## ԳԼՈՒԽ 4. ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄՈՒՏԱԳԵՆԵԶ ԵՎ 5-ԱԼԹԻ ԼԱՎԱԳՈՒՅՆ ԱՐՏԱԴՐԻՉ ՇՏԱՄԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆ

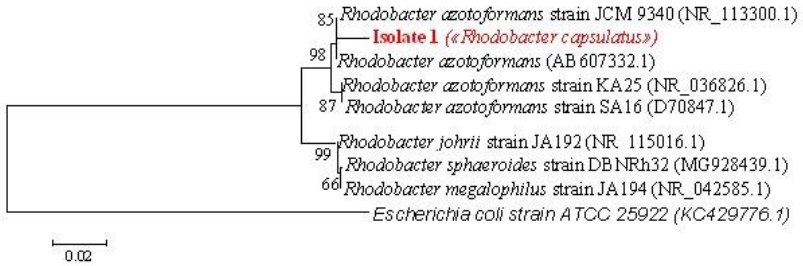
Շտամների արտադրողական հատկությունների բարձրացման նպատակով իրականացվել է բակտերիաների փորձնական մուտագենեզ: *Rsp. rubrum* և *Rps. palustris* շտամների մոտ, ի տարբերություն *Rba. azotoformans* և *Rba. sphaeroides* շտամների, մուտացիայի արդյունքում չեն հայտնաբերվել 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ շտամներ: Սելեկցիայի արդյունքում ուսումնասիրված շուրջ 9700-ական գաղութներից մեկուսացվել են 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող 19 մուտանտ շտամներ:

Ընտրված մուտանտ շտամների մոտ Էրլիխի գունաչափական և ՆՇՔ- մեթոդներով ընտրվել է 5-ԱԼԹ-ի առավել ակտիվ արտադրիչ E-10 մուտանտ շտամը: ԲԱՀՔ անալիզի միջոցով կատարվել է E-10 շտամի կողմից սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակական գնահատում: Անալիզի արդյունքները ցույց են տվել, որ E-10 շտամը սինթեզում է 179 մգ/լ 5-ԱԼԹ, մինչդեռ *Rba. azotoformans* վայրի շտամը սինթեզում է 2.5մգ/լ 5-ԱԼԹ:

## ԳԼՈՒԽ 5. ԾԻՐԱՆԱԳՈՒՅՆ ՈՉ ԾԾՄԲԱՅԻՆ ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ-ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄ

Աշխատանքի հաջորդ փուլում կատարվել է *Rba. capsulatus* MDC 6508 և *Rba. sphaeroides* MDC 6509 կուլտուրաների գենետակական նույնականացում: Իրականացվել է բակտերիաների ԴՆԹ-ների անջատում և 16S ռՌՆԹ-ի գենի ամպլիֆիկացում: 16S ռՌՆԹ-ի գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության վերծանումը կատարվել է «Macrogen» ընկերությունում:

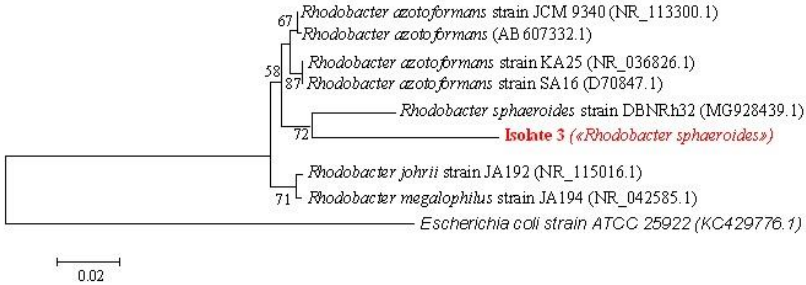
Ստացված արդյունքների հիման վրա կառուցվել են ֆիլոգենետիկ ծառերը: Նկ. 2-ում ներկայացված ֆիլոգենետիկ ծառի ճյուղերի մոտ ցուցադրված են տոկոսային հարաբերությունները (ներկայացված են 40%-ից ավելի ցուցանիշները): *E.coli* ATCC 25922 (KC429776.1) շտամն օգտագործվել է որպես այս խմբին չպատկանող շտամ: Համաձայն ստացված ֆիլոգենետիկ ծառի, «Isolate 1»-ը ցուցաբերել է 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության 99% նմանություն *Rba. azotoformans* JCM 9340 (NR_113300.1) շտամի համապատասխան գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ:




***Նկար 2. «Rhodobacter capsulatus» MDC 6508 շտամի ֆիլոգենետիկ դիրքը***

Ֆիլոգենետիկ ծառի վրա *«Rba. capsulatus»* շտամը *Rba. azotoformans*-ի հետ համատեղվել է մեկ խմբի մեջ: NCBI Gene Bank-ի տվյալների կիրառմամբ նույնականացման միջոցով «*Rba. capsulatus*» MDC 6508 շտամը տեղակայվել է *Rba. azotoformans*-ի ֆիլոգենետիկ ճյուղերից մեկի վրա, որը ցույց է տալիս վերոնշյալ շտամի պատկանելիությունն այս տեսակին և բացառում է *Rba. capsulatus* տեսակին պատկանելու հավանականությունը:

Համաձայն կառուցված ֆիլոգենետիկ ծառի (նկ. 3), «Isolate 3» 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը ցուցաբերել է 95% նմանություն *Rba. sphaeroides* DBNRh32 (MG928439.1) շտամի համապատասխան գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ:




***Նկար 3. «Rhodobacter sphaeroides» MDC 6509 շտամի ֆիլոգենետիկ դիրքը***

Նկ. 3-ում ներկայացված տվյալների համաձայն «*Rba. sphaeroides*» MDC 6509 շտամի 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը ցույց է տալիս վերոնշյալ շտամի պատկանելիությունը *Rba. sphaeroides* տեսակին:

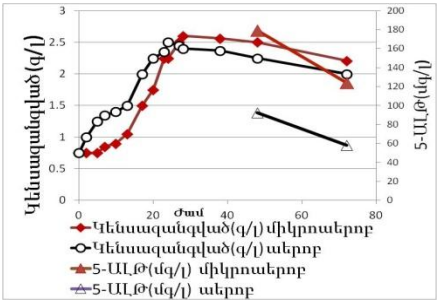
Այսպիսով, իրականացվել է մոլեկուլային գենետիկական նույնականացում ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների երկու շտամների 16S ռՌՆԹ գենի անալիզի

հիման վրա: Վերոնշյալ երկու շտամների համապատասխան գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության համեմատական վերլուծության արդյունքում որոշվել են այս շտամների հստակ տեսակային պատկանելիությունները:

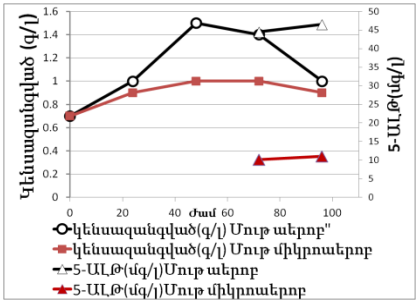
## ԳԼՈՒԽ 6. 5-ԱԼԹԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄԱԼԱՑՈՒՄ

### 6.1. E-10 շտամի աճի և 5-ԱԼԹի ելքի գնահատումը լուսավորության, մթության, միկրոաերոբ և աերոբ պայմաններում

Հաշվի առնելով, որ ծիրանագույն ֆոտոսինթեզող բակտերիաները միկրոաերոֆիլ են, գնահատվել է ընտրված E10 մուտանտ շտամի աճը և 5-ԱԼԹ-ի սինթեզը կուլտիվացման աերոբ և միկրոաերոբ պայմաններում: Աճը գնահատվել է ըստ չոր կենսազանգվածի: Հայտնաբերվել է, որ կենսազանգվածի առավելագույն քանակությունդիտվում է լուսավորության և միկրոաերոբ պայմաններում՝ կուլտիվացիան սկսելուց 28 ժ անց (էքսպոնենցիալ փուլ) (նկ. 4ա): 5-ԱԼԹ-ի առավելագույն ելք ստանալու նպատակով անհրաժեշտ է էքսպոնենցիալ փուլի ավարտին սննդամիջավայրի մեջ ավելացնել կենսասինթեզի միջանկյալ միացություններ (գլիցին և սուկցինատ) ինչպես նաև լևուլինաթթու, որը հանդիսանում է 5-ԱԼԹ-դեհիդրատազ ֆերմենտի արգելակիչ (նկ. 4):




**ա**




**բ**

***Նկար. 4. E-10 շտամի կուլտիվացումն աերոբ և միկրոաերոբ պայմաններում***

*(**ա**– անընդհատ լուսավորություն, **բ** - մթություն)*

Սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակությունն որոշվել է Էրլիխի գունաչափական եղանակով: Հայտնաբերվել է այն ժամանակահատվածը, որի ընթացքում 5-ԱԼԹ-ն սինթեզվում է առավելագույն քանակությամբ: Ստացված տվյալները բերված են աղյուսակում:

***Աղյուսակ***

***Կենսազանգվածի և 5-ԱԼԹի ելքը՝ կախված լուսավորությունից և աերացիայից***

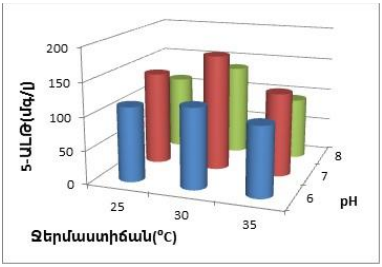
| Աճի պայմաններ | Լուսավորություն | | Մթություն | |
|---|---|---|---|---|
| | Կենսազանգված, գ/լ | 5-ԱԼԹ, մգ/լ | Կենսազանգված, գ/լ | 5-ԱԼԹ, մգ/լ |
| **Միկրոաերոբ** | 2.6 | 179.0 | 1.0 | 11.0 |
| **Աերոբ** | 2.5 | 58.1 | 1.4 | 46.5 |

Ինչպես երևում է բերված տվյալներից E10 շտամի աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի լավագույն պայմաններ են հանդիսանում կուլտիվացումը լուսավորության և միկրոաերոբ պայմաններում: 28 ժ կուլտիվացումից հետո սննդամիջավայրի մեջ գլիցին, սուկցինատ և լուլինաթթու ավելացնելուց, և ևս 24 ժամ կուլտիվացումից հետո կենսազանգվածի ելքը կազմել է 2.6գ/լ, իսկ 5-ԱԼԹ-ի ելքը՝ 179մգ/լ: Երկարատև կուլտիվացման դեպքում (48 և 72 ժ) 5-ԱԼԹ-ի քանակը նվազել է՝ կազմելով համապատասխանաբար 124.5 և 89.5 մգ/լ:

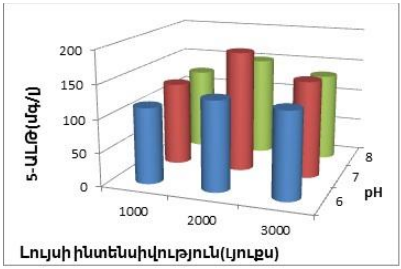
Հետագա ուսումնասիրությունները կատարվել են լուսավորության և միկրոաերոբ պայմաններում:

### 6.2. Լույսի ինտենսիվության, ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունները 5-ԱԼԹի կենսասինթեզի վրա

Ուսումնասիրվել է լույսի ինտենսիվության, ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունները 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա (նկ. 5):




**ա**



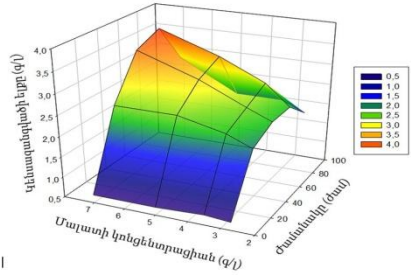

**բ**

***Նկար 5 ա,բ. Լույսի ինտենսիվության, ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունները 5-ԱԼԹի կենսասինթեզի վրա***

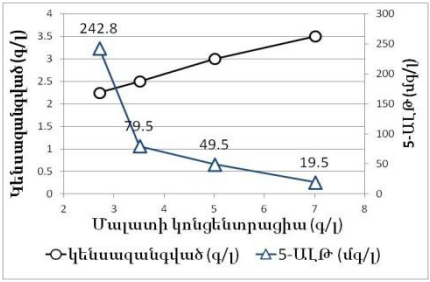
Ինչպես երևում է նկար 5-ից E10 *Rba. azotoformans* մուտանտ շտամի մոտ 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի համար օպտիմալ պայմաններ են հանդիսացել 2000 լյուքս անընդհատ լուսավորությունը և $30^0$C ջերմաստիճանը՝ pH-ի 7,0 արժեքի դեպքում: Այդ պայմաններում նպատակային նյութի սինթեզի առավելագույն ելքը կազմել է 182 մգ/լ:

### 6.3. Մալատի կոնցենտրացիայի ազդեցությունը բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹի կենսասինթեզի վրա

Ուսումնասիրվել է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը՝ կախված սննդամիջավայրում մալատի ելային կոնցենտրացիայից: Վերցվել են մալատի 2.7, 3.5, 5 և 7գ/լ կոնցենտրացիաները (նկ. 6, 7):




***Նկար 6. E10 շտամի աճը՝ կախված մալատի կոնցենտրացիայից***

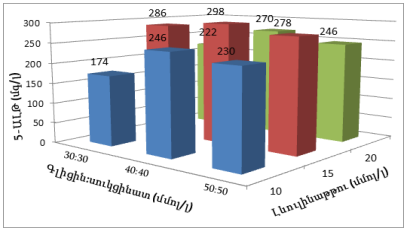


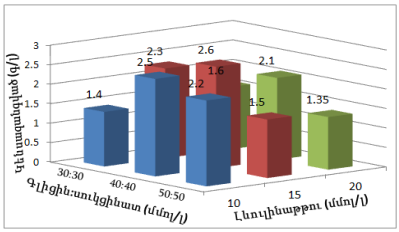

***Նկար 7. 5-ԱԼԹ-ի և կենսազանգվածի ելքը՝ կախված մալատի կոնցենտրացիայից***

Նկար 6-ում և 7-ում բերված տվյալները վկայում են, որ կենսազանգվածի ելքը կախված է մալատի կոնցենտրացիայից. որքան մեծ է մալատի կոնցենտրացիան, այնքան բարձր է կենսազանգվածի ելքը, մինչդեռ 5-ԱԼԹ-ի ելքը մալատի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում նվազում է: Որպես մալատի օպտիմալ կոնցենտրացիա ընտրվել է 2.7 գ/լ կոնցենտրացիան, որի պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի ելքն առավելագույնն է՝ 242.8մգ/լ (նկ. 7):

**6.4. Գլիցինի, սուկցինատի, լևուլինաթթվի և գլուտամատի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի և բակտերիաների աճի վրա**

Ուսումնասիրվել է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը՝ կախված սննդամիջավայրում լևուլինաթթվի կոնցենտրացիայից: Լևուլինաթթուն ավելացվել է սննդամիջավայրին կուլտիվացումից 28 ժ անց: Վերցվել են լևուլինաթթվի 10, 15 և 20 մմոլ/լ կոնցենտրացիաները: Արդյունքները բերված են նկ. 8-ում:

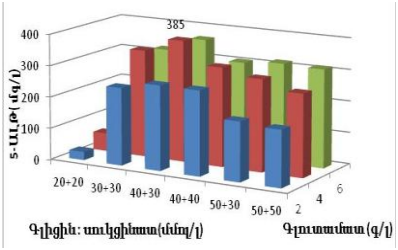



***Նկար 8. Լևուլինաթթվի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի և բակտերիաների աճի վրա***

Պարզվել է, որ 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի տեսանկյունից լևուլինաթթվի օպտիմալ կոնցենտրացիա է հանդիսանում 15 մմոլ/լ-ը, որի պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի ելքը կազմել է 298մգ/լ, իսկ կենսազանգվածի ելքը՝ 2,6գ/լ (նկ. 8):

Ուսումնասիրվել է նաև 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը՝ կախված սննդամիջավայրում գլուտամատի, գլիցինի և սուկցինատի կոնցենտրացիաներից (նկ. 9):




***Նկար 9. Գլուտամատի, գլիցինի, սուկցինատի ազդեցությունները բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա***

Վերցվել են գլուտամատի հետևյալ ելային կոնցենտրացիաները՝ 2, 4, 6 գ/լ: Կուլտիվացումից 28 ժ անց սննդամիջավայրին ավելացվել են գլիցին և սուկցինատ՝ հետևյալ հարաբերակցություններով՝ 20:20, 30:30, 40:40, 50:50, 40:30 և 50:30 մմոլ/լ:

Ինչպես երևում է գրաֆիկից, 5-ԱԼԹ-ի առավելագույն ելքը՝ 385 մգ/լ, դիտվել է 4 գ/լ գլուտամատ 40 մմոլ/լ գլիցին և 30 մմոլ/լ սուկցինատ պարունակող սննդամիջավայրում:

**6.5. E10 շտամի կուլտիվացումը կենսառեակտորների մեջ՝ մթության և լուսավորության պայմաններում**

Հետագա կուլտիվացումն իրականացվել է կենսառեակտորներում՝ զուգահեռաբար մթության և լուսավորության պայմաններում: Կուլտիվացման ընթացքում ավտոմատ կերպով կարգավորվել է միջավայրի pH-ը (7.0), ջերմաստիճանը ($30^0$ C) և խառնիչի արագությունը (400 պտ/ր): Ապակե կենսառեակտորը տեղադրվել է 2000 լյուքս լուսավորության պայմաններում: Մթության պայմաններում ստացվել է 5-ԱԼԹ-ի 290 մգ/լ ելք, իսկ լուսավորության պայմաններում՝ 579 մգ/լ: Մինչդեռ փորձարարական պայմաններում ստացվել էին համապատասխանաբար 46.5 մգ/լ և 385 մգ/լ:

## ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ցույց է տրվել, որ Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rba. sphaeroides* MDC 6511 և *Rps. palustris* MDC 6506

վայրի շտամները աճեցման ստանդարտ պայմաններում սինթեզում են համապատասխանաբար՝ 2.5, 13.0, 1.8 և 13.3 մգ/լ 5-ԱԼԹ:

2. Ինդուկցված մուտագենեզի եղանակով ստացված *Rba. azotoformans* E10 կայուն մուտանտի մոտ զգալիորեն բարձրացել է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի արդյունավետությունը:
3. *Rhodobacteraceae* ընտանիքին պատկանող *Rba. capsulatus* MDC 6508 շտամի ֆիլոգենետիկ անալիզի և 16S ռՌՆԹ գենի սեքվենավորման տվյալների հիման վրա այն նույնականացվել է որպես *Rba. azotoformans* տեսակ:
4. Ցույց է տրվել, որ միջավայրում գլիցինի, գլուտամատի, մալատի, սուկցինատի և լևուլինաթթվի առկայությունը, ինչպես նաև արտաքին գործոնները (pH, լուսավորություն, ջերմաստիճան) էականորեն ազդում են *Rba. azotoformans*-ի E10 մուտանտ շտամի կողմից 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի գործընթացի վրա:
5. Հաստատվել է, որ անընդհատ կուլտիվացման պայմաններում *Rba. azotoformans* շտամի E10 մուտանտի կողմից 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի առավելագույն ելքը՝ 385 մգ/լ, դիտվում է 2,7 գ/լ մալատ և 4 գ/լ գլուտամատ պարունակող սննդամիջավայրին 40 մմոլ/լ գլիցին, 30 մմոլ/լ սուկցինատ, 15 մմոլ/լ լևուլինաթթու ավելացնելու դեպքում:
6. Ցույց է տրվել, որ կենսառեակտորում լուսավորության պայմաններում կուլտիվացման դեպքում *Rba. azotoformans* շտամի E10 մուտանտը սինթեզում է 579 մգ/լ 5-ԱԼԹ, մինչդեռ մթության մեջ այն չի գերազանցում 290 մգ/լ:
7. Ցույց է տրվել մանրէաբանական ճանապարհով *Rba. azotoformans*-ի E10 մուտանտ շտամի կիրառմամբ 5-ԱԼԹ-ի ստացման տնտեսական արդյունավետությունը կիսաարտադրական պայմաններում:
8. *Rba. azotoformans*-ի E10 մուտանտ շտամն ավանդադրվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում՝ MDC 6523 շիֆրի և համարի ներքո՝ որպես 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ:

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


1. Kalantaryan N., Goginyan V., Saghatelyan L., **Harutyunyan B**. Composition of fatty acids synthesized by green microalgae *Dunaliella salina* Pa-018 // Electronic Journal of Natural Sciences, 2016, 1 (26), 43-48.
2. **Harutyunyan B.** Mutagenesis of purple non-sulfur photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides* // 4th International

Scientific Conference of Young Researchers "Biotechnology. Science and Practice", Book of abstracts, September 28-30, 2017, Yerevan, Armenia, 12-13.
3. **Harutyunyan B**. Determination of 5-aminolevulinic acid synthesized by purple non-sulfur photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides* // 4th International Scientific Conference of Young Researchers "Biotechnology: Science and Practice", Book of abstracts, September 28-30, 2017, Yerevan, Armenia, 50-51.
4. Novak M., Pavlečić M., **Harutyunyan B**., Goginyan V., Horvat P., Šantek B. Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers // Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 2017, 12 (3-4), 113-119.
5. Novak M., **Harutyunyan B**., Goginyan V., Pavlečić M., Horvat P., Šantek B. Influence of initial malate concentration on 5-ALA synthesis during cultivation of *Rhodobacter capsulatus* B-6508 // Electronic Journal of Natural Sciences NAS RA, 2018, 2(31), 3-7.
6. **Harutyunyan B**., Novak M., Pavlečić M., Goginyan V., Hovhannesyan R., Melkumyan I., Šantek B. Influence of glycine, succinate, levulinic acid and glutamate concentrations on growth of purple non-sulfur photosynthetic bacteria and 5-aminolevulinic acid production // International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 2018, Vol. 7, Issue 4, 3839-3846.
7. **Harutyunyan B**. Molecular-genetic verification of the taxonomic status of two strains of purple non-sulfur photosynthetic bacteria based on the analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA genes // Electronic Journal of Natural Sciences NAS RA, 2018, 2(31), 57-60.
8. **Арутюнян Б.А**. Выявление продуцентов 5-аминолевулиновой кислоты среди культур пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий // Биологический Журнал Армении, 2018, 2(70), 6-13.

**АРУТЮНЯН БАГИШ АШОТОВИЧ**

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

## РЕЗЮМЕ

**Ключевые слова:** *пурпурные несерные фотосинтезирующие бактерии, 5-аминолевулиновая кислота, биосинтез*

Диссертационная работа посвящена изучению биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) пурпурными несерными фотосинтезирующими бактериями.

В соответствие с поставленной целью были сформулированы и решены задачи, посвященные отбору и сравнительной характеристике потенциальных штаммов-продуцентов 5-АЛК среди культур пурпурных несерных фотосинтезирующих

бактерий родов *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* и *Rhodospirillum*. В рамках исследований выполнена молекулярно-генетическая идентификация и уточнение таксономического положения наиболее активных штаммов-продуцентов. Проведен индуцированный химический мутагенез с целью повышения выхода 5-АЛК у штаммов-продуцентов. Изучено влияние различных компонентов в составах питательных сред и факторов внешей среды (температурный режим, параметры освещения, pH) на рост и синтез 5-АЛК у отобранных мутантов пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий. Выполнена оптимизация условий выхода 5-АЛК в лабораторных условиях и биореакторах. Проведены расчеты экономической эффективности получения синтез 5-АЛК микробиологическим способом.

Отбор потенциальных штаммов-продуцентов 5-АЛК осуществлялся с учетом имеющихся литературных данных, указывающих на высокую возможность и перспективность получения целевого продукта путем микробиологического синтеза, и обусловлен наличием значительной коллекции культур фотосинтезирующих бактерий в лаборатории альтернативных источников энергии НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Для уточнения таксономического положения проведена молекулярно-генетическая идентификация культур *Rba. capsulatus* MDC 6508 и *Rba. sphaeroides* MDC 6509. Молекулярно-филогенетический анализ полученной нуклеотидной последовательности 16S рРНК штамма *Rba. capsulatus* и поиск в GenBank сходных последовательностей пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий с помощью megablast алгоритма показал, что сиквенс *Rba. capsulatus* на 99% совпадает с секвенированным штаммом NR_113300.1 *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 [Hiraishi et al. 1997]. Между тем, анализ результатов определения нуклеотидной последовательности 16S рРНК штамма *Rba. sphaeroides* показал, что сиквенс *Rba. sphaeroides* на 95% сходен с секвенированным в GenBank NCBI штаммом MG928439.1 *Rhodobacter sphaeroides* DBNRh32 [van Niel, 1944; Imhoff *et al*., 1984].

Предварительная оценка биосинтеза 5-АЛК у пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий видов *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505 и *Rps. palustris* MDC 6506 проведена на общеизвестной жидкой питательной среде Ормерода в стандартных условиях культивирования. Показано, что при выращивании штаммов в течение 15 дней, при температуре $28^0$C и освещении 2000 люкс *Rba. azotoformans* синтезирует 2,5 мг/л, *Rba. sphaeroides* MDC 6509 – 13,0 мг/л, *Rsp. rubrum* MDC 6505 – 1,8 мг/л и *Rps. palustris* MDC 6506 – 13,3 мг/л 5-АЛК.

С помощью индуцированного химического мутагенеза получен ряд мутировавших штаммов пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий. По результатам сравнительной характеристики биосинтеза 5-АЛК отобран наиболее активный мутант E10 культуры *Rba. azotoformans*, который синтезировал в питательной среде 179 мг/л 5-АЛК, в то время, как дикий штамм *Rba. azotoformans* при тех же условиях культивирования синтезировал всего лишь 2,5 мг/л 5-АЛК.

Дальнейшие исследования были направлены на повышение выхода 5-АЛК у мутанта E10 *Rba. azotoformans*. В частности, изучен рост штамма микроаэробных и аэробных условиях, при круглосуточном освещении и полной темноте. Показано,

что в микроаэробных условиях культивирования при круглосуточном освещении за 28 часов, штамм *Rba. azotoformans* синтезирует 179 мг/л 5-АЛК, при этом количество образовавшейся сухой биомассы составило 2,6 г/л. В то же время, при отсутствии освещения штамм синтезировал всего 11 мг/л, а количество образовавшейся сухой биомассы составило 1,0 г/л. Между тем, в аэробных условиях, при круглосуточном освещении штамм *Rba. azotoformans* синтезировал 58,1 мг/л (масса сухой биомассы – 2,5 г/л), а в отсутствие света – 46,5 г/л (масса сухой биомассы – 1,4 г/л). Таким образом, микроаэробные условия и круглосуточное освещение являются наиболее оптимальными для накопления биомассы и синтеза 5-АЛК штаммом *Rba. azotoformans*.

Изучено влияние интенсивности освещения, температуры и pH на синтез 5-АЛК у мутанта E10 *Rba. azotoformans*. В результате многочисленных экспериментов установлены оптимальные значения освещения (2000 люкс), температуры ($30^0$C) и pH (7,0), при которых наибольший выход целевого продукта составил 182 мг/л.

Изучено влияние различных концентраций малата в питательной среде на рост и синтез 5-АЛК у мутанта E10 *Rba. azotoformans*. Установлено, что при исходной концентрации малата 2,7 г/л выход 5-АЛК является максимальным и составляет 242.8 мг/л. Были оптимизированы концентрации глицина, сукцината, левулиновой кислоты и глютамата, обеспечивающие наилучший рост у продуцента и синтез 5-АЛК. Установлено, что при концентрациях глицина - 40 ммоль/л, сукцината – 30 ммоль/л, левулиновой кислоты – 15 ммоль/л и глютамата – 4 г/л синтез 5-АЛК достигает 385 мг/л. Оптимизированные условия культивирования были применены при выращивании мутанта E10 *Rba. azotoformans* в биореакторе, где максимальный выход 5-АЛК составил 579 мг/л.

**HARUTYUNYAN BAGHISH ASHOT**

## STUDY OF BIOSYNTHESIS OF 5-AMINOLEVULINIC ACID BY PHOTOSYNTHETIC BACTERIA

## SUMMARY

**Key words:** *purple non-sulfur photosynthetic bacteria, 5-aminolevulinic acid, synthesis*

The thesis is devoted to the study of biosynthesis of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) by purple non-sulfur photosynthetic bacteria.

In accordance with the goal were formulated and solved tasks on the selection and comparative characteristics of potential strains producing 5-ALA among cultures of purple non-sulfur photosynthetic bacteria of the genera *Rhodobacter, Rhodopseudomonas* and *Rhodospirillum*. Within the framework of the research, molecular-genetic identification and specification of the taxonomic position of the most active producing strains were carried out; induced chemical mutagenesis was performed to increase the yield of 5-ALA in strain-produces; the influence of various compounds in the compositions of nutrient media and environmental factors (temperature, illumination

parameters, pH) on the growth and synthesis of 5-ALA in selected mutants of purple non-sulfur photosynthetic bacteria was studied. A maximal yield of 5-ALA under laboratory conditions and in bioreactors were optimized. Economic efficiency of the synthesis of 5-ALA by a microbiological method was calculated.

The selection of potential strain-producers of 5-ALA was carried out taking into account available literature data indicating high possibility and prospects for obtaining the target product by microbiological synthesis and based on the presence of a vast collection of cultures of photosynthetic bacteria in the Laboratory of Energy Alternative Sources of the SPC "Armbiotechnology", NAS RA.

To clarify the taxonomic position, molecular-genetic identification of cultures of *Rba. capsulatus* MDC 6508 and *Rba. sphaeroides* MDC 6509 was carried out. Phylogenetic analysis of the obtained nucleotide sequence of 16S rRNA of the strain *Rba capsulatus* and search in the GenBank for similar sequences of purple non-sulfur photosynthetic bacteria using the megablast algorithm showed that the sequence *Rba. capsulatus* had 99% similarity with the sequenced strain NR_113300.1 *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 [Hiraishi et al. 1997]. Meanwhile, analysis of the results of the nucleotide sequence determination of 16S rRNA of the *Rba. sphaeroides* strain showed that sequence of *Rba. sphaeroides* was 95% similar to the GenBank NCBI-sequenced strain MG928439.1 *Rhodobacter sphaeroides* DBNRh32 [(van Niel, 1944) Imhoff et al., 1984].

Preliminary assessment of 5-ALA biosynthesis by purple non-sulfur photosynthetic bacteria of species *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505 and *Rps. palustris* MDC 6506 was performed on the well-known Ormerod liquid nutrient medium under standard cultivation conditions. It is shown that when growing strains for 15 days, at a temperature of 28 $^{o}$C and illumination of 2000 lux, *Rba. azotoformans* synthesizes 2.5 mg/l, *Rba. sphaeroides* MDC 6509 - 13.0 mg/l, *Rsp. rubrum* MDC 6505 - 1.8 mg/l and *Rps. palustris* MDC 6506 - 13.3 mg/l of 5-ALA.

By induced chemical mutagenesis, a number of mutated strains of purple non-sulfur photosynthetic bacteria were obtained. Based on the results of comparative characteristics of 5-ALA biosynthesis, the most active mutant E10 of *Rba. azotoformans* culture was selected, which synthesized 179 mg/l of 5-ALA in the nutrient medium, while the wild-type strain *Rba. azotoformans* under the same conditions of cultivation synthesized only 2.5 mg/l of 5-ALA.

Further studies aimed at increasing the yield of 5-ALA in the mutant strain *Rba. azotoformans* E10. In particular, the growth of the strain in microaerobic and aerobic conditions with 24-hour illumination and in complete darkness was studied. It is shown that under microaerobic conditions of cultivation at 24-hour illumination, for 28 hours, strain Rba. azotoformans synthesizes 179 mg/l of 5-ALA, while the amount of dry biomass formed was 2.6 g/l. At the same time, in the absence of illumination, the strain synthesized only 11 mg/l, and the amount of dry biomass formed was 1.0 g/l. Meanwhile, under aerobic conditions at 24 h illumination, the *Rba. azotoformans* strain synthesized 58.1 mg/l (weight of dry biomass – 2.5 g/l), and in the absence of light – 46.5 g/l (weight of dry biomass – 1.4 g/l). Thus, microaerobic conditions and 24 h illumination are the most optimal for biomass accumulation and synthesis of 5-ALA by *Rba. azotoformans* strain.

The effect of illumination intensity, temperature and pH on the synthesis of 5-ALA in the mutant E10 of *Rba. azotoformans* was studied. As a result of numerous experiments optimal values of light (2000 lux), temperature (30 $^{o}$C) and pH (7.0) at which the highest yield of the target product was 182 mg/l, have been determined.

The effect of different concentrations of malate in the nutrient medium on the growth and synthesis of 5-ALA in the mutant E10 of *Rba. azotoformans* was studied. It was found that with the initial malate concentration of 2.7 g/l the yield of 5-ALA is maximal and consists 242.8 mg/l. The concentrations of glycine, succinate, levulinic acid and glutamate were optimized ensuring the best growth with producers and the synthesis of 5-ALA. It was established that at concentrations of glycine 40 mmol/l, succinate – 30 mmol/l, levulinic acid – 15 mmol/l and glutamate – 4 g/l, the synthesis of 5-ALA reached 385 mg/l. Optimized cultivation conditions were applied to the cultivation of mutant E10 of *Rba. azotoformans* in the bioreactor, where the maximum yield of 5-ALA was 579 mg/l.