

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ ԱՆՆԱ ՎԱՐԴԵՍԻ

ALCALIGENACEAE ԸՆՏԱՆԻՔԻ ՆՈՐ ՏԵՍԱԿԻ ՄԱՆԲԵՆԵՐԻՑ
D-ԱՄԻՆԱՍՅԻԼԱԶԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ, ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ ԵՎ ԿԻՐԱՌՄԱՆ
ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան 2015

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

МХИТАРЯН АННА ВАРДГЕСОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
D-АМИНОАЦИЛАЗЫ ИЗ НОВОГО ВИДА МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА
*ALCALIGENACEAE***

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.14 – «Биотехнология»

Ереван 2015

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

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Ա. Ա. Համբարձումյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ.
Շ. Բ. Հակոբյան
կ.գ.թ. Պ. Վ. Թոզալաբյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Հր. Բունիայանի անվ.
կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կայանալու է 2015 թ. մարտի 6-ին, ժամը 15⁰⁰ -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 2015 թ. փետրվարի 6-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կ.գ.թ. Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).

Научный руководитель: к.б.н. А. А. Амбарцумян

Официальные оппоненты: член-корр. НАН РА, д.б.н. Ж. И. Акопян
к.б.н. П. В. Тозалакян

Ведущая организация: Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА

Защита диссертации состоится 6 марта 2015 г. в 15⁰⁰ 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 6 февраля 2015 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н. Г. Е. Аветисова

Աշխատանքի ընդհանուր բնութագիրը

Խնդրի արդիականությունը

Համաշխարհային շուկայում սպիտակուցային և ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների պահանջարկի մեծացմանը զուգընթաց մեծանում է նաև դրանց նկատմամբ հետաքրքրությունը և փնտրվում են վերջիններիս ստացման նորագույն եղանակներ, որոնք առավել նպատակահարմար և գործնականում կիրառելի կլինեն:

Սովորաբար ամինաթթուները ստացվում են մանրէաբանական, քիմիական, ինչպես նաև կենսատրանսֆորացիոն եղանակներով, որոնք փոխադարձաբար լրացնելով միմյանց, հանդիսանում են նաև խիստ մրցակցային: Ներկայումս ամինաթթուների արտադրության մեջ գործնականում ավելի կիրառելի են մանրէաբանական և կենսատրանսֆորացիոն եղանակները: Այժմ բնական ամինաթթուները մեծամասամբ ստացվում են մանրէաբանական սինթեզով: Ի տարբերություն մանրէաբանական սինթեզի, կենսատրանսֆորացիոն եղանակով ամինաթթուների ստացման պրոցեսը անհամեմատ ավելի պարզ է և մատչելի: Դա մասնավորապես պայմանավորված է կենսակատալիզատորի ստացման համար համեմատաբար փոքր քանակությամբ կենսազանգվածի օգտագործմամբ, գործընթացի պարզությամբ, արտադրության իրականացման ժամանակ խոշոր կապիտալ ներդրումների անհրաժեշտության բացակայությամբ, շահութաբերությամբ և փոքրածավալ արտադրության դեպքում գործընթացի արդյունավետությամբ:

Կենսատրանսֆորացիոն եղանակի իրականացման ժամանակ հիմնական դերը պատկանում է ֆերմենտներին: Չնայած բարձր էլքերով նպատակային ֆերմենտային պատրաստուկների ստացման տեխնոլոգիաների կատարելագործմանը, դրանց գինը շարունակում է մնալ բարձր:

Օպտիկապես մաքուր ամինաթթուների ստացման համար առավել պահանջված ֆերմենտներ են հանդիսանում ամինաացիլազները: Կենսակատալիտիկ եղանակով այս ֆերմենտներով կարելի է ստանալ օպտիկապես ակտիվ D- և L-ամինաթթուներ:

Քիմիական եղանակով ստացված N-ացետիլ-DL-ամինաթթուներից կենսատրանսֆորացիոն եղանակով D-ամինաթթուների ստացման պրոցեսի նկատմամբ հետաքրքրությունը գնալով մեծանում է: Առավել նպատակահարմար է իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների կիրառումը:

Հողի տարբեր նմուշներից D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ նոր շտամների անջատումը, համապատասխան ֆերմենտի մաքրման արդյունավետ եղանակների մշակումը, ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ հատկությունների ուսումնասիրությունը, իմոբիլիզացումը և ի վերջո կենսատրանսֆորացիայով D-ամինաթթուների ստացումը ակնհայտորեն արդիական է և կարևոր:

Հետազոտության նպատակը և խնդիրները

Աշխատանքի նպատակն է

Հողի նմուշներից անջատել D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ նոր բակտերիալ շտամներ, բնութագրել առավել հեռանկարային շտամի D-ամինաացիլազը և հետազոտել համապատասխան ֆերմենտի իմոբիլիզացման հնարավորություններն ու ստացվող կենսակատալիզատորի կիրառման հետևնկարները կենսատեխնոլոգիայում:

- Այդ նպատակին հասնելու համար դրվել են հետևյալ խնդիրները՝
- Հողի նմուշներից անջատել D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ բակտերիալ շտամներ և կատարել դրանց նախնական բնութագրում:

- Ստացված առավել տեխնոլոգիական շտամից անջատել, մաքրել D-ամինաացիլազը և հետազոտել դրա ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրերը;
- Հետազոտել ստացված D-ամինաացիլազի իմոբիլիզացման հնարավորությունները և ստացվող կենսակատալիզատորի որոշ տեխնոլոգիական բնութագրերը:

Գիտական նորույթը

- Սկրինինգի արդյունքում հողի տարբեր նմուշներից անջատվել է գրականության մեջ չնկարագրված D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ մանրէ (AM6.1) և 16S rDNA-ի 1002 գույգ նուկլեոտիդների հաջորդականության մանրէների համամասն տվյալների բազայի հետ համեմատելիս 83 % հոմոլոգիայի հիման վրա այն վերագրվել է Alcaligenaceae ընտանիքի նոր տեսակի, և ըստ երևույթին նոր ցեղի:
- Նպատակային D-ամինաացիլազ ֆերմենտը անջատվել է մաքրվել է դասական մեթոդներից կազմված սխեմայով, ուսումնասիրվել է դրա ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրերը (մոլեկուլային կշիռը, ջերմային և pH օպտիմումները և կայունությունները, կայունացման պայմանները, սուբստրատային սպեցիֆիկությունը, կինետիկական բնութագրերը և այլն):
- Իրականացվել է մասնակիորեն մաքրած ֆերմենտային պրեպարատի իմոբիլիզացում որպես կրիչ օգտագործելով սիլոքսոմ C-80 խեժը, որի արդյունքում ստացված որոշակի տեխնոլոգիական պարամետրերով կատալիզատորը հանգամանորեն բնութագրվել է:
- Համեմատվել են իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի և ազատ ֆերմենտային պրեպարատի որոշ ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրեր, ինչպես նաև ուսումնասիրվել են համապատասխան ռացեմատներից դրա կիրառմամբ սպիտակուցային և ոչ սպիտակուցային D-ամինաթթուների ստացման հնարավորությունները:

Կիրառական արժեքը

- Հողից անջատվել է D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ նոր շտամ: Ցույց է տրվել, որ այն պատկանում է Alcaligenaceae ընտանիքին, բայց գենետիկորեն շատ հեռու է մինչ այժմ նկարագրված տեսակներից:
- Մանրամասնորեն նկարագրվել են նոր D-ամինաացիլազի ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրերը:
- Ստացվել է ուրույն սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ D-ամինաացիլազային նոր կենսակատալիզատորներ՝ ինչպես ազատ ֆերմենտի տեսքով, այնպես էլ իմոբիլիզացված տարբերակով, որոնք լիովին բավարարում են արտադրական նշանակություն ունեցող կենսակատալիզատորների նկատմամբ ներկայացվող հիմնական պահանջներին:
- Ցույց է տրվել, որ ստացված կենսակատալիզատորը կարող է օգտագործվել սպիտակուցային և ոչ սպիտակուցային N-ացետիլ-DL-ամինաթթուներից օպտիկապես ակտիվ D-ամինաթթուների ստացման կենսատրանսֆորմացիոն պրոցեսներում:

Պաշտպանության է ներկայացվում

- D-Ամինաացիլազային ակտիվությամբ նոր շտամի անջատումն ու նախնական դասակարգումը:
- Նպատակային ֆերմենտի անջատման և մաքրման սխեման:

- Ֆերմենտի ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրերը:
- Ֆերմենտի իմոբիլիզացիայի արդյունքը և իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի կատալիտիկ բնութագրերը:
- Ազատ և իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի կիրառմամբ օպտիկապետակտիվ D-ամինաթթուների ստացման գործընթացների պարամետրերը:

Աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ

Աշխատանքը իրականացվել է «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ ՊՈԱԿ-ի 2008-2010 թթ. թիվ 462, «D-Ամինաթթվային ացիլազի, հիդանտոինազի և կարբամոլիլազի իմոբիլիզացված պրեպարատների ստացումը և կիրառումը կենսատրանսֆորմացիոն պրոցեսներում» և 2011-2013 թթ. 11-2i381, «D- և L-ամինաացիլազների մակադոմիկոպիլիզացիայի կողմնորոգումը ռեկոմբինանտ պլազմիդներով շտամների ստացում և համապատասխան ֆերմենտների բնութագրում» թեմատիկ ծրագրերի շրջանակներում:

Հայցորդի անձնական ներդրումը

- Գիտական ղեկավարի հետ համատեղ նպատակների և խնդիրների հարցադրումը:
- Թեմայի վերաբերյալ գիտական գրականության վերլուծությունը և ամփոփումը:
- Փորձնական աշխատանքի իրականացումը.
 - N-ացետիլ-ամինաթթուների սինթեզ;
 - D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ շտամների սկրինինգ և նախնական իդենտիֆիկացում;
 - նպատակային D-ամինաացիլազային շտամի ընտրություն և իդենտիֆիկացում ըստ 16S rDNA-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության;
 - ընտրված շտամից D-ամինաացիլազի անջատում, մաքրում և բնութագրում;
 - հետազոտված ֆերմենտի հիման վրա նոր կենսակատալիզատորի ստացում, իմոբիլիզացում, բնութագրում և կիրառում:
- Ստացված արդյունքների ամփոփումը:
- Ինքնուրույն և համահեղինակների հետ համատեղ գիտական հոդվածների և թեզիսների ձևակերպումը:
- Ստացված արդյունքների քննարկումը ղեկավարի հետ, ատենախոսության, սեղմագրի և եզրակացությունների ձևակերպումը:

Ատենախոսության քննարկումը

Աշխատանքի արդյունքները քննարկվել են մոլեկուլային կենսաբանության լաբորատորիայում և «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդում: Ատենախոսության նյութերը ներկայացվել են «Կենսատեխնոլոգիական զարգացումների արդի վիճակը և առևտրայնացման ուղիները» ՄԳՏԿ գիտական սեմինարին (2012 թ., Երևան, ՀՀ), «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության զարգացման հեռանկարներ-3» երիտասարդ գիտնականների միջազգային գիտաժողովին (2012 թ., Երևան, ՀՀ), «Երիտասարդների ավանդը կենսատեխնոլոգիայի զարգացման գործընթացում» երիտասարդ գիտնականների միջազգային գիտաժողովին (2013 թ., Երևան, ՀՀ), «Մանրէաբանության և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի նվաճումները» միջազգային գիտաժողովին (2014 թ., Երևան, ՀՀ):

Տպագրված աշխատանքներ

Ատենախոսական աշխատանքում շարադրված հետազոտության արդյունքները

հրապարակված են 8 գիտական աշխատանքներում՝ 4 հոդվածներ, որոնցից երկուսն առանց համահեղինակների և 4 միջազգային գիտաժողովների թեզիսներ:

Աշխատանքի իրականացման վայրը

Աշխատանքը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ ՊՈԱԿ-ում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը

Աշխատանքը կազմված է 104 էջից, 3 գլխից, պարունակում է 12 աղյուսակներ, 20 նկարներ և 193 գիտական հղումներ:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԼՈՒՄՈՒԹՅՈՒՆ

Գրական ակնարկը նվիրված է թեմայի հետ առնչվող առավել հայտնի աշխատանքների ամփոփմանը: Առաջին մասում հանգամանորեն քննարկվում են քիմիական և կենսատրանսֆորացիոն եղանակներով D-ամինաթթուների ստացման հնարավորությունները: Այնուհետև նկարագրված և համեմատված են տարբեր շտամներից անջատված D-ամինաացիլազները, որոնք կատալիզում են N-ացետիլ-D-ամինաթթուների դեացիլացման միջոցով ռացեմատներից D-ամինաթթուների ստացման եղանակները: Առանձին բաժին նվիրված է կովալենտ իմոբիլիզացիայի եղանակով ստացված կենսակատալիզատորներին և դրանց կիրառական նշանակությամբ:

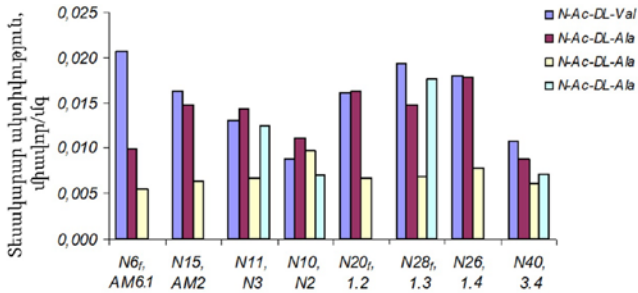
ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Աշխատանքի այս բաժնում նկարագրված են օգտագործված նյութերը, սննդամիջավայրերը և մեթոդները: Մեթոդների բաժնում նկարագրված է N-ացետիլ-D-ամինաթթուների ստացումը, D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ շտամների սկրինինգը, շտամի աճեցումը և ամինաացիլազային ակտիվության չափումը: Նկարագրված են նաև N-ացետիլ-D-ամինաթթուների դեացիլացման ռեակցիան կատալիզող ֆերմենտի անջատման, մաքրման և բնութագրման մեթոդները, ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրերի, ինչպես նաև կինետիկական պարամետրերի հետազոտման մեթոդները: Մանրամասնորեն քննարկված է ֆերմենտի իմոբիլիզացման մեթոդաբանությունը:

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱԿՆՈՒՄ

3.1. D-Ամինաացիլազային ակտիվությամբ շտամների սկրինինգ և հեռանկարային շտամի ընտրություն

D-Ամինաացիլազային ակտիվությամբ օժտված շտամների հայտնաբերման նպատակով հողի տարբեր նմուշներից ըստ N-ացետիլ-D-ալանինի վրա աճելու ունակության ընտրված 300-ից ավել բակտերիալ գաղութներից 50-ից ավելին մաքրվել են նույն միջավայրի վրա և D-ամինաացիլազային ակտիվության քանակական որոշման թեստով ընտրվել են 8 առավել ակտիվ շտամներ: Տարբեր N-ացետիլ-D-ամինաթթուների վրա այդ շտամների աճն ու տեսակարար ակտիվությունները ներկայացված են նկար 1-ում: Նկարում տարբեր գույներով նշված են աճի միջավայրերը, որոնցում առանձին փորձերում չափվել են ակտիվությունները: Շտամների համարակալման մեջ f ինդեքսը ցույց է տալիս, որ N-ացետիլ-DL-ալանինի վրա աճեցնելիս շտամները ֆլուորեսցենտում են:



Տարբեր ընտրանքային փորձերում ստացված անկախ գաղութներ

Նկար 1. D-Ամինաացիլազային ակտիվությամբ շտամների փնտրտուքի արդյունքները

Ստացված արդյունքներից հետևում է, որ ընտրված շտամները հիմնականում կայուն տեսակարար ակտիվություն են ցուցաբերում անկախ աճի միջավայրի բաղադրությունից և փորձից: Դա առավել լավ է արտահայտված N3, N2 և 3.4 շտամների մոտ, իսկ երկուական փորձերում նաև AM2, 1.2, 1.3 և 1.4 շտամների մոտ: Նշվածը վկայություն է շտամների կայունության և փորձի հավաստիության վերաբերյալ:

Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է AM6.1 շտամից անջատված ֆերմենտը կարելի է հեշտությամբ և արդյունավետ կերպով մաքրել դասական քրոմատոգրաֆիական մեթոդներով: Այս շտամը իր արտադրած D-ամինաացիլազով հանդերձ ընտրվել է որպես հետագա հետազոտությունների օբյեկտ:

3.2. D-Ամինաացիլազային ակտիվությամբ AM6.1 շտամի նախնական դասակարգում

Եվրոպական Eurofine ընկերությունը իրականացրել է AM6.1 շտամի 16S ռԴՆԹ-ի գենի մասնակի սեքվենս, որի արդյունքները ներկայացված են նկար 2-ում:

```

ORIGIN
1  GTTACGACTT  CACCCCAGTC  ATGAGACCTA  CCGTGGTCTG  CGCCCCCTT  CCGGGGTGCA
61  AACTACTTCT  GGTGAAACCC  CCTCCCTGGT  GAGACGGGGG  GTGGGACAAA  GACCGGGGAA
121  CGTATTCTCC  GCCACATGTT  TATCCACCAT  TAATAACGAT  TCACACTTCC  TTCCTGGGTT
181  TTAGTTACTG  AAATCCAGAC  TAACAGAGAG  TTTCTGGGAT  GGGATCCCCC  CCACGGGTTG
241  GCGACCCCTC  GTCCCGACCA  TTGTATGACG  TGTGAAGCCC  TACCTGTAFA  GGCCGTGAAG
301  ACTTACTTTC  CTCCCCCCTT  TCCTCCCGTT  TGTCTCACGG  CGGCTCTTTC  TAATGACCTT
361  TCACCCTAAC  TAGCGACAAA  GGTTCGACTC  GTTGGCGGAC  TTATCCGAGA  ATCTCACCAC
421  CCTCTCTGAC  GACAGCCATA  CAACACCTGT  GTTCCGGTTC  TCCTGCGAGC  ACTACCAAA
481  CTCTTTCTCA  TTCATATAT  GGTATGGGTA  GGTAAGGTTT  TTCGTTCTTG  CATCTAATTA
541  ATAAATATCA  TCCACCGCTT  GTGCGGGTCC  CCGGCCATTC  CTTTGAGTTT  TAATCTGGCG
601  ACCGTACTCC  CCACTCCGTC  AACTTCACGC  TTTATGCTGC  GCTACCAAGG  ACCGAAGGCC
661  CCGACAGAAC  CTTGACATCG  TTTAGGGCGT  TGACTACGTT  GACTACTCAA  GCCTGTTTGC
721  TCCCCAGCCT  TTCACGCATG  AGCGTCAGTG  TTATCCACCA  CAGGCTGCCT  TCGCCATCTT
781  CTGTTCTCTG  GCATATCTAC  GATATTTTAC  TGCTACACGG  GCATAATFCA  CCACTCTCTG
841  ATCCACTCTA  GCTCCGTTAG  CAGCAATGCA  TCTTCCAAAA  TTAAGCTCTG  GGATTTGCAC
901  ATCTTTCTTT  CCGACCCGAC  TGAGCAGGCT  ATTACGTCCA  TTAATCCGAG  ATTTATCGCG
961  TAGCACCCCTA  CGCACTTAAC  GCAGCTAGCT  GGGACTGCAA  GG

```

Նկար 2. AM6.1 շտամի 16S ռԴՆԹ-ի գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը

Ներկայացված նուկլեոտիդային հաջորդականության BLAST անալիզի արդյունքները ցույց են տալիս, որ D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ AM6.1 շտամի 16S ռիբոսոմային ԴՆԹ-ի գենի մասնակի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը առավելագույնը 83 % նմանություն է ցույց տալիս բակտերիալ և արքեալ 16S ռիբոսոմային ԴՆԹ-ի գեների տվյալների բազաների հետ: BLAST անալիզի 7 լավագույն

արդյունքները, ավելացրած նաև *Alcaligenes faecalis*-ի 100 լավագույն BLAST անալիզի արդյունքներից № 29-ը և № 30-ը, ներկայացված են աղյուսակ 1-ում: Պարզվել է, որ այն շտամները, որոնք առավելագույն հունուրգիա են ցուցաբերել մեր կողմից ուսումնասիրվող շտամի հետ պատկանում են *Achromobacter* և *Bordetella* ցեղերին: Սակայն հետազոտվող գենի հունուրգիան 2% խզվածքների պարագայում լավագույն դեպքում 83% է, ինչը կասկածի տակ է դնում դրանց նույն ցեղին պատկանելու հնարավորությունը:

Ներկայացված արդյունքների հիման վրա կարելի է ենթադրել, որ մեր կողմից հողից անջատված D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ օժտված աերոբ բակտերիան պատկանում է նոր տեսակի և հավանաբար նոր ցեղի: Սակայն, այնուամենայնիվ, խնդրի վերջնական լուծման համար նախատեսվում է իրականացնել 16S ռիբոսոմային ՌՆԹ-ի գենի ամբողջական նուկլեոտիդային հաջորդականության սեքվենսը (1542 նուկլեոտիդ):

Աղյուսակ 1.

AM6.1 շտամի 16S ռիբոսոմային ՌՆԹ-ի գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության BLAST անալիզը

N	16S ռիբոսոմային ՌՆԹ-ի աղբյուրը	Նույնակա- նություն	Խզվածքներ	NCBI հղում
1	<i>Achromobacter insolitus strain LMG 6003</i>	831/999 (83%)	27/999 (2%)	NR_025685.1
2	<i>Bordetella hinzii LMG 13501</i>	831/999 (83%)	27/999 (2%)	NR_027537.1
3	<i>Bordetella avium strain ATCC 35086</i>	831/999 (83%)	27/999 (2%)	NR_041769.1
4	<i>Achromobacter xylosoxidans strain : DSM 10346</i>	830/999 (83%)	27/999 (2%)	NR_044925.1
5	<i>Achromobacter xylosoxidans A8 strain A8</i>	829/999 (83%)	27/999 (2%)	NR_074754.1
6	<i>Achromobacter denitrificans strain DSM 30026</i>	829/1000 (83%)	29/1000 (2%)	NR_042021.1
7	<i>Bordetella holmesii strain CDC F5101</i>	829/1000 (83%)	29/1000 (2%)	NR_029173.1
8	<i>Alcaligenes faecalis strain IAM12369</i>	808/1000 (80%)	37/1000 (3%)	NR_043445.1
9	<i>Alcaligenes faecalis subsp. parafaecalis G</i>	781/971 (80%)	30/971 (3%)	NR_025357.1

3.3. AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի անջատում, մաքրում և բնութագրում

AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազը անջատվել, մասնակիորեն մաքրվել և բնութագրվել է: Այդ շտամի D-ամինաացիլազ ֆերմենտի արդյունավետ անջատման և բարձր մաքրության ֆերմենտային պրեպարատ ստանալու համար մեր կողմից մշակվել է 5 էտապներ պարունակող մաքրման սխեմա, կազմված իոնափոխանակային և ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիաներից: Մաքրման էտապների և դրանց հերթականության ընտրությունը մշակվել է մի շարք փորձերի արդյունքում, ինչը հնարավորություն է տվել D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ օժտված AM6.1 շտամից անջատել և բավականին բարձր մաքրության աստիճանի հասցնել նոր D-ամինաացիլազ ֆերմենտը:

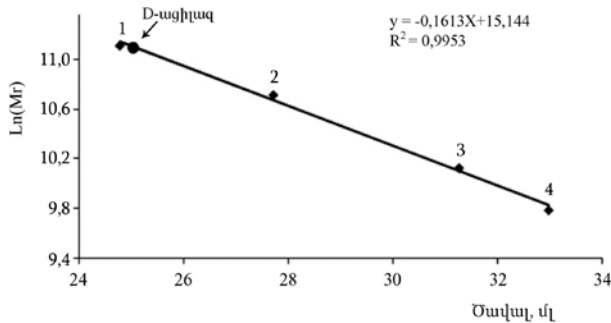
AM6.1 շտամից անջատված D-ամինաացիլազի մաքրման արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում: Ինչպես երևում է աղյուսակից կիրառված մաքրման սխեմայի արդյունքում ֆերմենտի տեսակարար ակտիվությունը բարձրացել է ավելի քան 870 անգամ, գրեթե 3% էլքով:

Նման ձևով մաքրված ֆերմենտային պրեպարատը օգտագործվել է ամինաացիլազի ֆիզիկա-քիմիական, կատալիտիկ բնութագրերի ուսումնասիրման համար:

AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի մաքրման սխեման

Մաքրման էտապներ	Ծավալ, մլ	Սպիտակուց, մգ/մլ	Տեսակարար ակտիվություն, միավոր/մգ	Ելք, %
Կոպիտ էքստրակտ	31	8,55	0,10	100,0
ԴԷԱԷ-տոյոպերլ	36	0,58	1,66	130,7
Հիդրօքսիապատիտ	14	0,67	2,61	92,4
100-30 կՂա կտրում	0,93	0,55	12,1	23,3
ԴԷԱԷ-տոյոպերլ	0,17	0,05	87,1	2,7

Գել-ֆիլտրացիայի եղանակով որոշվել է ֆերմենտային պրեպարատի մոլեկուլային կշիռը: Արդյունքները բերված են նկ. 3-ում: Ինչպես երևում է նկար 3-ից D-ամինաացիլազի մոլեկուլային կշիռը 66 կՂա է:



Նկար 3. D-ամինաացիլազի մոլեկուլային կշռի որոշումը

1– ցլի շիճուկի ալբումին (67 կՂա), 2 – ձվի ալբումին (45 կՂա), 3 – քիմոտրիպսինոզեն (25 կՂա), 4 – ձիու միոզոլոբին (17,8 կՂա):

Մեր կողմից անջատած AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի 66 կՂա մոլեկուլային կշիռը մոտ է 58 կՂա մոլեկուլային կշիռ ունեցող *Alcaligenes denitrificans* DA181-ի [Yunn-Bor Yang, 1992], 55 կՂա մոլեկուլային կշռով *Alcaligenes faecalis* DA1-ի [Yunn-Bor Yang, 1991], 55 կՂա մոլեկուլային կշռով *Trichoderma* sp. SKW-36-ի [Wakayama et al., 2004], 56 կՂա մոլեկուլային կշռով *Deffluvibacter* sp.-ի [Kumagai et al., 2004] D-ամինաացիլազներին: Իսկ *Pseudomonas* sp. 1158-ի [Kubo et al., 1980] 100 կՂա մոլեկուլային կշռով D-ամինաացիլազը իր չափսերով բավականին տարբերվում է նշված ֆերմենտներից:

AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի ակտիվության վրա որոշ նյութերի ջերմակայունացնող ազդեցության ուսումնասիրման նպատակով ֆերմենտը նշված նյութերի ներկայությամբ բուֆեր Ա-ի միջավայրում 20 ր պահվել է 40 °C ջերմաստիճանի ս pH-ի 7,2 արժեքի պայմաններում (50 %-ով նատիվ ֆերմենտի ինակտիվացման պայմաններ): Ջերմային մշակումից հետո ֆերմենտային

պրեպարատի նմուշները հավաքվել են 4 °C ջերմաստիճանի սառցե բաղնիքում, իսկ մնացորդային ֆերմենտային ակտիվությունները չափվել են, որպես սուբստրատ կիրառելով 20 մմոլ/լ N-ացետիլ-D-մեթիոնին: Ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3

Ամինաթթուների և այլ միացությունների ազդեցությունը D-ամինաացիլազի ջերմակայունության վրա

Նյութեր	Հարաբերական ակտիվություն, %	
	Առանց ջերմային մշակման	Ջերմային մշակումից հետո
–	100,0*	27,3
DL-մեթիոնին (20 մմոլ/լ)	–	6,9
D-ասպարագինաթթու (10 մմոլ/լ)	–	49,0
D-վալին (10 մմոլ/լ)	–	52,9
D-պրովին (10 մմոլ/լ)	–	29,1
ԷԴՏՔ (2 մմոլ/լ)	–	39,1
ՄԷ (5 մմոլ/լ)	–	15,4
Գլիցերին (10 %)	67,3	33,6

* ֆերմենտային պրեպարատի 100 % ջերմակայունությանը համապատասխանում է ֆերմենտի 57,5 միավոր/նգ տեսակարար ակտիվությանը:

Ստացված արդյունքներից ակնհայտ է, որ գլիցերինը իր որոշակի ջերմակայունացնող ազդեցությամբ հանդերձ ինակտիվացնում է D-ամինաացիլազ ֆերմենտը ավելի քան 30 %-ով: Միաժամանակ, նշված կոնցենտրացիայով էթիլենդիամին տետրաքացախաթթուն (ԷԴՏՔ) որոշակի կայունացնող ազդեցություն է թողնում ֆերմենտի ջերմային ինակտիվացման դեմ այն դեպքում, երբ մերկապտոէթանոլը (ՄԷ), ընդհակառակը, ավելի անկայուն է դարձնում նշված ֆերմենտը ջերմային մշակման նկատմամբ: Բնչ վերաբերվում է ուսումնասիրվող ամինաթթուներին՝ D-վալինը և D-ասպարագինաթթուն ակնհայտորեն բարձրացնում են D-ամինաացիլազի ջերմակայունությունը, այն պարագայում, երբ DL-մեթիոնինը թողնում է հակառակ ազդեցությունը:

Ֆերմենտի ակտիվության վրա որոշ երկվալենտ մետաղների իոնների ազդեցության ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ 1 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով Zn²⁺-ը ավելի քան 30 %-ով արագացնում է D-ամինաացիլազով կատալիզվող ռեակցիայի ընթացքը, այն դեպքում, երբ միննույն կոնցենտրացիայով այլ երկվալենտ մետաղների իոնները (Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ և Ni²⁺) ակնհայտորեն նվազեցնում են D-ամինաացիլազի ակտիվությունը: Հայտնի է, որ *Deffluvibacter Sp. A131-3*-ի համատն ֆերմենտի համար վերը նշված բոլոր մետաղների իոնները, այդ թվում և Zn²⁺-ը հանդես են գալիս որպես արգելակիչներ [Kumagai et al., 2004]:

ԴԹՆԲ-ով օքսիդացնելուց հետո ՄԷ-ով մշակումը D-ամինաացիլազ ֆերմենտի ակտիվության վրա գրեթե ոչ մի ազդեցություն չի ունենում, դրանով իսկ ցույց տալով, որ SH-խմբերի առկայությունը ֆերմենտի գործունեության համար էական չէ: Միաժամանակ ԷԴՏՔ-ով մշակելուց և Zn²⁺-ով վերականգնելուց հետո ֆերմենտային պրեպարատի ակտիվությունը բավականին բարձրանում է, ցույց տալով, որ Zn²⁺-ի

իոնները կարևոր են ֆերմենտի գործունեության համար: D-Ամինաացիլազ ֆերմենտի վերաբերյալ այս առումով գրականության մեջ հայտնի տվյալները հակասական են [Wakayama et al., 2004]:

Դեացիլացման ռեակցիաներում D-ամինաացիլազի սուբստրատային սպեցիֆիկության ուսումնասիրման արդյունքները բերված են աղյուսակ 4-ում:

N-ացետիլ D-, L- և DL-մեթիոնինների որպես սուբստրատ կիրառման դեպքում ստացված ֆերմենտային պրեպարատի ցուցաբերած ակտիվությունների համեմատումը ցույց է տալիս, որ մի կողմից այն գրեթե գուրկ է L-ամինաացիլազային ակտիվությունից, մյուս կողմից էլ սուբստրատի D- և DL- տարբերակներում D-ի միևնույն կոնցենտրացիայի դեպքում ֆերմենտային պրեպարատը ցուցաբերում է նույնական ակտիվություն: Նման արդյունք է դիտվում նաև N-ացետիլ D-, L- և DL-վալինների որպես սուբստրատ կիրառման դեպքում: Հետևաբար, ստացված ֆերմենտային պրեպարատը կարելի է համարել L-ամինաացիլազից գուրկ, իսկ N-ացետիլ ամինաթթուների D- և DL- տարբերակները (DL-ի կրկնակի կոնցենտրացիայի դեպքում)՝ համարժեք:

AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազը չի կատալիզում հիդրոֆիլ և թթվային N-ացետիլ-ամինաթթուների դեացիլացումը: Փոխարենը այն բավականին լավ է փոխազդում հիդրոֆոր, արոմատիկ և հիմնային N-ացետիլ-ամինաթթուների հետ: Այս շարքում համեմատաբար լավ սուբստրատ են հանդիսանում N-ացետիլ-D-ալանինը, N-ացետիլ-D-ֆենիլալանինը և N-ացետիլ-DL-թիրոզինը:

Հատկանշական է, որ հետազոտվող ֆերմենտը բավականին բարձր սուբստրատային սպեցիֆիկություն է ցուցաբերում ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների ացետիլ ածանցյալներից N-ացետիլ-DL-օքսիվալինի և N-ացետիլ-DL-ալիլգլիցինի նկատմամբ: Այս փաստը կարելի է օգտագործել նշված կարևոր ամինաթթուների և այլ նման ամինաթթուների D-ձևերն ստանալու համար:

Աղյուսակ 4-ից հետևում է, որ այլ աղբյուրներից անջատված D-ամինաացիլազները նույնպես սուբստրատային սպեցիֆիկություն են ցուցաբերում N-ացետիլ-D-ամինաթթուների նկատմամբ և ակտիվ չեն դրանց L-ստերեոիզոմերների նկատմամբ: Ներկայացված բոլոր 7 շտամներից անջատված D-ամինաացիլազների դեպքում N-ացետիլ-D-մեթիոնինը, N-ացետիլ-D-ֆենիլալանինը և N-ացետիլ-D-լեյցինը լավ սուբստրատներ են հանդիսանում:

Սակայն, եթե AM6.1 և *A. faecalis* DA1 շտամներից անջատած D-ամինաացիլազները առավելագույն ակտիվություն են ցուցաբերում N-ացետիլ-D-մեթիոնինի նկատմամբ, ապա *A. xylosoxydans* A6 և *Sebekia benihama* շտամների D-ամինաացիլազների համար լավագույն սուբստրատ է հանդիսանում N-ացետիլ-D-լեյցինը, *Streptomyces coelicolor*-ի, *Streptomyces olivaceus*-ի և *Pseudomonas* sp. 6029-ի ֆերմենտների համար N-ացետիլ-D-ֆենիլալանինը, իսկ *Deffluvibacter* sp. A 131-3-ի D-ամինաացիլազի դեպքում N-ացետիլ-D-վալինը:

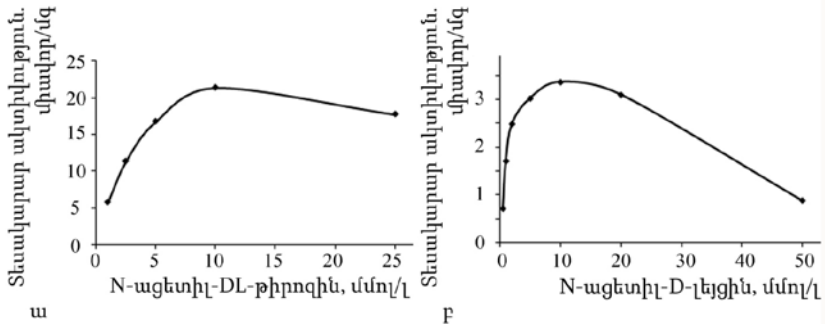
Ուսումնասիրվել է AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազով որոշ սուբստրատների դեացիլացման կինետիկական պարամետրերը (K_m, V_{max}): Առավել ակտիվ սուբստրատի՝ N-ացետիլ-D-մեթիոնինի դեացիլացման ռեակցիայի արագության կախվածության գրաֆիկը սուբստրատի կոնցենտրացիայից՝ Լայնուիվեր-Բերկի կոորդինատային համակարգում օրդիտատների առանցքը հատող ուղիղ գիծ է, ինչը վկայում է այն մասին, որ ռեակցիան ընթանում է ըստ Միխաելիս-Մենտենի կինետիկայի: Նման արդյունքներ են նկատվել նաև N-ացետիլ-D-ալանին, N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին, N-ացետիլ-D-վալին և N-ացետիլ-DL-օքսիվալին սուբստրատների դեպքում:

Որոշ օրգանիզմների և AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազաների սուբստրատային սպեցիֆիկության համեմատումը

Սուբստրատ	Հարաբերական ակտիվություն, %							
	AM6.1	<i>A. xyloxydans</i> A6	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>A. faecalis</i> DA1	<i>Sebekia benihama</i>	<i>Streptomyces olivaceus</i>	<i>Defluviobacter</i> sp. A 131-3	<i>Pseudomonas</i> sp. 6029
N-ացետիլ-L-մեթիոնին	1	-	-	-	0	0	-	-
N-ացետիլ-D-մեթիոնին	100	67,2	30	100	100	100	13	23
N-ացետիլ-DL-մեթիոնին	99	-	-	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-D-ալանին	30,7	-	7	14	1,1	40	-	-
N-ացետիլ-L-վալին	0	-	-	-	0	0	-	-
N-ացետիլ-D-վալին	12,2	8	8	6	33	40	100	0
N-ացետիլ-DL-վալին	9,3	-	-	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-D-լեյցին	6,8	100	7	52	255	21	73	23
N-ացետիլ-DL-սերին	0	-	7**	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-DL-թրեոնին	0	-	3**	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-DL-արգինին	4,9	-	-	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-DL-ասպարագինաթթու	0	-	5	8**	1,4	-	-	-
N-ացետիլ-DL-օքսիվալին	71,2	-	-	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-DL-ալիլլիցին	51,2	-	-	-	-	-	-	-
N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին	28,8	87,6	100	65	100	144	11	100
N-ացետիլ-DL-տրիպտոֆան	5,8	-	48**	14**	64**	105**	0,2*	-
N-ացետիլ-DL-թիրոզին	35,1	-	25**	-	-	-	1**	-
Գրականության աղբյուր	Տվյալ աշխատանք	[Moriguchi et al., 1993]	[Jennifer et al., 2009]	[Yang et al., 1991]	[Shinji, 2000]	[Shinji and Akinobu, 2003]	[Kumagai et al., 2004]	[Kameda et al., 1978]

* AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի հարաբերական ակտիվության 100 %-ը համապատասխանում է 22,6 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը:

** Տվյալ N-ացետիլ ամինաթթուն օգտագործվել է D-տարբերակում:



Նկար 4. N-Ացետիլ-DL-թիրոզինի և N-ացետիլ-D-լեյցինի դեպիլացման ռեակցիայի արագության կախվածությունը սուբստրատի կոնցենտրացիայից

Հետազոտված սուբստրատներից N-ացետիլ-D-լեյցինի և N-ացետիլ-DL-թիրոզինի դեպքում դիտվել է ֆերմենտային պրեպարատի սուբստրատային արգելակում՝ համապատասխան N-ացետիլ-D-ամինաթթուներով: Ֆերմենտային պրեպարատի սուբստրատային արգելակման ուսումնասիրման արդյունքները բերված են նվ. 4-ում:

Աղյուսակ 5

AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի կինետիկական պարամետրերը որոշ սուբստրատների համար

Ամինաթթուներ	K_m , մմոլ/լ	V_{max} , միավոր/մգ	K_s , մմոլ/լ
N-ացետիլ-D-մեթիոնին	4,7±0,5	32,4±2,4	—
N-ացետիլ-D-ալանին	27,3±4,9	6,4±0,8	—
N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին	2,4±0,2	12,6±0,5	—
N-ացետիլ-D-լեյցին	2,0±1,0	5,0±1,3	35,5±28,3
N-ացետիլ-D-վալին	2,8±0,4	0,8±0,0	—
N-ացետիլ-DL-օքսիվալին*	66,9±15,3	21,3±4,3	—
N-ացետիլ-DL-թիրոզին*	8,5±2,0	52,2±8,7	15,8±4,5

* N-Ացետիլ-DL-ամինաթթուների դեպքում կոնցենտրացիայի հաշվարկը կատարվել է ըստ D-բաղադրիչի:

Բոլոր հետազոտված սուբստրատների համար K_m -ի, V_{max} -ի և K_s -ի արժեքները հաշվարկվել են բազմաչափ գծային ռեգրեսիոն անալիզով, կիրառելով համապատասխանաբար պարզ Միխաելիս-Մենտենի կինետիկայի կամ սուբստրատային արգելակմամբ կինետիկայի բանաձևերը: Հաշվարկները կատարվել են Gauss 4.0 ծրագրային փաթեթի կիրառմամբ: Աղյուսակները բերված են աղյուսակ 5-ում: Աղյուսակում ներկայացված արդյունքներից հետևում է, որ, թեև N-ացետիլ-D-մեթիոնինը, N-ացետիլ-D-ֆենիլալանինը, N-ացետիլ-D-լեյցինը և N-ացետիլ-D-վալինը գրեթե նույն կարգի թվացյալ K_m են ցուցաբերում, այնուամենայնիվ այդ շարքում V_{max} -ի ուժեղ անկում է դիտվում: Հետաքրքիր է N-ացետիլ-D-ալանինի և N-ացետիլ-DL-օքսիվալինի դեպքում գրանցված բավականին բարձր K_m -ի արժեքները: Իսկ սուբստրատային սպեցիֆիկության փորձի համեմատ աղյուսակ 5-ում N-ացետիլ-DL-

թիրոզինի դեպքում դիտվող շատ բարձր V_{max} -ի արժեքը հավանաբար պետք է բացատրել վերջինիս բարձր կոնցենտրացիայում սուբստրատային արգելակմամբ ($K_m=15,8$ մմոլ/լ), ինչը հավանաբար դանդաղեցնում է ռեակցիայի ընթացքը սուբստրատային սպեցիֆիկության փորձում:

Աղյուսակ 6

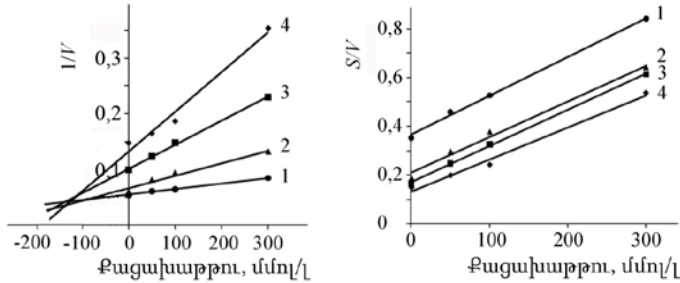
Տարբեր D-ամինաացիլազաների որոշ սուբստրատների նկատմամբ ցուցաբերած K_m -երի արժեքների համեմատումը

Շտամներ	K_m , մմոլ/լ						Գրականություններում
	N-ացետիլ-D-մեթիոնին	N-ացետիլ-D-լեյցին	N-ացետիլ-DL-թիրոզին	N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին	N-ացետիլ-D-վալին	N-ացետիլ-D-ալանին	
AM6.1	4,7±0,5	2,0±1,0	8,5±2,0	2,4±0,2	2,8±0,4	27,3±4,9	Տվյալ աշխ.
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	-	9,8	-	-	-	-	[Moriguchi et al., 1993]
<i>Trichoderma</i> sp. SKW-36	1,89	2,0	-	-	-	-	[Wakayama et al., 2004]
<i>Gluconobacter oxydans</i>	1,8±0,3	3,2±0,2	7,1±0,5*	2,5±0,3	4,1±0,2	18,0±2,0	[Jennifer et al., 2009]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	6,2±1,0	-	9,1±0,5*	0,53±0,0	-	-	[Jennifer et al., 2009]

*** Օգտագործվել է ացետիլամինաթթվի D-ձևը:**

Աղյուսակ 6-ում որոշ սուբստրատների նկատմամբ AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի ցուցաբերած K_m -ի արժեքները համեմատվել են այլ աղբյուրներից անջատված ֆերմենտների համանման ցուցանիշների հետ: Աղյուսակից հետևում է, որ N-ացետիլ-D-մեթիոնին, N-ացետիլ-D-լեյցին, N-ացետիլ-DL-թիրոզին, N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին, N-ացետիլ-D-վալին և N-ացետիլ-D-ալանին սուբստրատների դեպքում AM6.1 և *Gluconobacter oxydans* շտամների D-ամինաացիլազները բավական լավ համընկնող K_m -ի արժեքներ են ցուցաբերում: N-Ացետիլ-D-մեթիոնին, N-ացետիլ-DL-թիրոզին և N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին սուբստրատների դեպքում լավ համընկնում է դիտվում նաև AM6.1 և *Streptomyces coelicolor* շտամների D-ամինաացիլազների K_m -ի արժեքների համար: N-Ացետիլ-D-մեթիոնին և N-ացետիլ-D-լեյցին սուբստրատների դեպքում համընկնում են AM6.1 և *Trichoderma* sp. SKW-36 շտամների D-ամինաացիլազների K_m -ի արժեքները:

Ուսումնասիրվել է D-ամինաացիլազի քացախաթթվով արգելակման մեխանիզմը: Նկար 5-ում բերված է քացախաթթվով D-ամինաացիլազայի արգելակման մեխանիզմի ուսումնասիրման արդյունքները:



Նկար 5. Քացախաթթվով D-ամինաացիլազի արգելակման մեխանիզմի որոշումը 1/V-ի (ա) և S/V-ի (բ) կախումը քացախաթթվի կոնցենտրացիայից N-ացետիլ-D-մեթիոնինի հետևյալ կոնցենտրացիաների դեպքում՝ 1 – 10 մմոլ/լ, 2 – 4 մմոլ/լ, 3 – 2 մմոլ/լ, 4 – 1 մմոլ/լ:

Նկար 5ա-ից հետևում է, որ 1/V –ի I –ից (արգելակիչի կոնցենտրացիա) կախվածության կորերը իրենցից ներկայացնում են կոորդինատային համակարգի վերին ձախ քառորդում հաստվող ուղիղ գծեր: Միաժամանակ նկար 5բ-ից հետևում է, որ S/V –ի I –ից կախվածության կորերը իրենցից ներկայացնում են զուգահեռ ուղիղ գծեր: Ամբողջական գրաֆիկական անալիզի արդյունքում պարզ է դառնում, որ D-ամինաացիլազի քացախաթթվով արգելակման ժամանակ առկա է մրցակցային արգելակում: Ստացված փորձնական արդյունքների բազմաչափ գծային ռեգրեսիոն անալիզով մշակման արդյունքում նույնպես դիտվել է մրցակցային արգելակում հետևյալ կինետիկական պարամետրերով՝ $K_i=104, 7 \pm 21,6$ մմոլ/լ, $K_m=2,5 \pm 0,4$ մմոլ/լ, $V_{max}=25,1 \pm 1,5$ միավոր/մգ: Այս փորձում N-ացետիլ-D-մեթիոնինի համար ստացված K_m –ի և V_{max} –ի արժեքները լավ են համընկնում կինետիկայի փորձում ստացված արժեքների հետ (աղյուսակ 5), ինչը վկայում է տարբեր պայմաններում կատարված փորձերի հավաստիության մասին:

3.4. AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի իմոբիլիզացումը և կատալիզում կիրառման հնարավորությունները

Կենսատրանսֆորմացիոն գործընթացներում ազատ ֆերմենտը փորձարկելու նպատակով ուտոմնասիրվել է 200 մմոլ/լ N-ացետիլ-D-մեթիոնինի հիդրոլիզը կայունարարի՝ D-վալինի ներկայությամբ և առանց դրա: Արդյունքները ցույց են տալիս, որ կիրառված պայմաններում (pH-ի 8,5 արժեքի դեպքում) կայունարարի D-վալինի առկայությամբ D-ամինաացիլազը 200 մմոլ/լ N-ացետիլ-D-մեթիոնինը դեացիլացնում է 28 օրվա ընթացքում: Այս պայմաններում ռեակցիան ընթանում է 97-98 % խորությամբ, այն դեպքում երբ նշված ամինաթթվի բացակայության դեպքում, նույն ժամանակամիջոցում ռեակցիայի խորությունը կազմում է 48-52 %: Համեմատության համար *A. denitrificans*-ի դեպքում 20 մմոլ/լ N-ացետիլ-D-մեթիոնինի կոնվերսիան կազմում է 94,3 %, իսկ 30 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում՝ ընդամենը 79,1 %: Իսկ *A. faecalis*-ի համար ռեակցիայի ելքը սուբստրատի 20 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում կազմում է 79,7 %, իսկ 30 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում՝ 72,5 % [Tripathi et al., 2000]:

Ֆերմենտների իմոբիլիզացիան արդյունաբերական կենսատեխնոլոգիայում կարևորագույն գործընթաց է [Aggarwal and Sahni, 2012]: Ֆերմենտային պրեպարատի իմոբիլիզացման հիմնական նպատակը բարձր կայունությամբ և արտադրական նպատակովոր հաստկություններով օժտված կենսակատալիզատորի ստացումն է:

Ֆերմենտի բազմակի կիրառումը, պրոցեսի արագ կանգնեցման հնարավորությունը, կենսատրանսֆորացիոն պրոցեսի ինքնարժեքի նվազեցումը, արդյունավետության բարձրացումը, ինչպես նաև արտադրանքի անջատման պարզագույն գործընթացը հիմնական առավելություններն են իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների օգտագործման դեպքում: Իմոբիլիզացման մեթոդի ընտրության համար որոշիչ գործոն է հանդիսանում ֆերմենտ-կրիչ համակարգի կայունությունը: Բայց, այնուամենայնիվ իմոբիլիզացիոն պրոցեսի ընթացքում ֆերմենտի ակտիվության կորուստներն անխուսափելի են: Այդ իսկ պատճառով խնդիր է դրվել հետազոտել AM6.1 շտամից անջատած D-ամինաացիլազի իմոբիլիզացման օպտիմալ պայմանները և այդ պայմաններում ստացված կենսակատալիզատորով իրականացնել D-ամինաթթուների ստացման կենսատրանսֆորացիոն պրոցես:

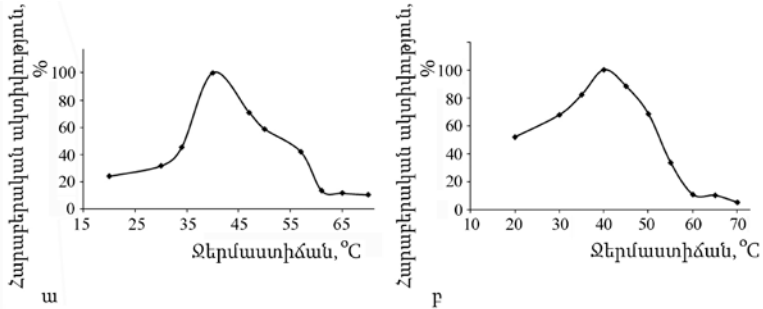
Ֆերմենտային ակտիվության առավելագույն պահպանման պայմաններով ուսումնասիրվող D-ամինաացիլազի իմոբիլիզացման պայմանների փնտրտուքի արդյունքում որպես կրիչ ընտրվել է սիլոքրոմ C 80-ը, իսկ որպես կարող ազենտ գլուտարալդեհիդը: Իմոբիլիզացման աշխատանքներում կիրառվել է մասնակիորեն մաքրված ֆերմենտային պրեպարատը, որի մաքրումը ներառել է աղյուսակ 2-ում ներկայացված մաքրման սխեմայի միայն առաջին 2 էտապը:

Ուսումնասիրվել է իմոբիլիզացման պրոցեսի արդյունավետության վրա միջավայրին ավելացված ալբումինի, խառնման, ինչպես նաև ջերմաստիճանի ազդեցությունները: Իմոբիլիզացման պրոցեսում ինչպես ալբումինի ավելացումը, այնպես էլ ռեակցիոն միջավայրի խառնումը դրական ազդեցություն չեն ցուցաբերել: Ջերմաստիճանի ազդեցության ուսումնասիրման ժամանակ երկու նմուշներից մեկը սպիտակուցը կրիչին կարման ամբողջ ընթացքում պահվել է սենյակային ջերմաստիճանում (18-20 °C), իսկ մյուսը՝ սառնարանում (4 °C): Այս դեպքում սառնարանում պահված նմուշի մոտ նկատվել է ակտիվության ելքի բարձրացում:

Գրականության մեջ բերված են տվյալներ, ըստ որոնց իմոբիլիզացման ընթացքում տարբեր սուբստրատների և այլ լիզանտների առկայությունը կայունացնում է ֆերմենտը [Paloyan, 2012; Дюкова и др., 2011; Mavrides and Orr, 1975]: Ուսումնասիրվել է որոշ նյութերի ազդեցությունը իմոբիլիզացման պրոցեսի ելքի վրա: Որպես կայունարարներ օգտագործվել են D-վալին (10 մմոլ/լ), Zn²⁺ (1 մմոլ/լ), N-ացետիլ-D-մեթիոնին (10 մմոլ/լ), գլիցերին (10 % ծավալային): Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ իմոբիլիզացման պրոցեսի ընթացքում ֆերմենտային պրեպարատի տրված ակտիվության մինչև 20 %-ը պահպանվում է ռեակցիոն միջավայրում 10 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով D-վալինի առկայության պայմաններում:

Այսպիսով հետազայում սիլոքրոմ C 80-ի վրա մասնակիորեն մաքրված ֆերմենտային պրեպարատի իմոբիլիզացումն իրականացվել է 4 °C ջերմաստիճանում, առանց խառնման և 10 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով D-վալինի առկայության պայմաններում:

Սկար 6-ում բերված է D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ ֆերմենտային պրեպարատի իմոբիլիզացված և ազատ ձևի ջերմաստիճանային օպտիմումների որոշման արդյունքները: Սկարից երևում է, որ ինչպես ազատ (սկար 6ա), այնպես էլ իմոբիլիզացված (սկար 6բ) ֆերմենտային պրեպարատների ջերմաստիճանային օպտիմումը 40 °C է: Համեմատության համար, *Alcaligenes faecalis* DA1-ից անջատված D-ամինաացիլազի ինչպես նատիվ, այնպես էլ իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի դեպքում օպտիմալ է եղել 45 °C ջերմաստիճանը [Tsai et al., 1992]:

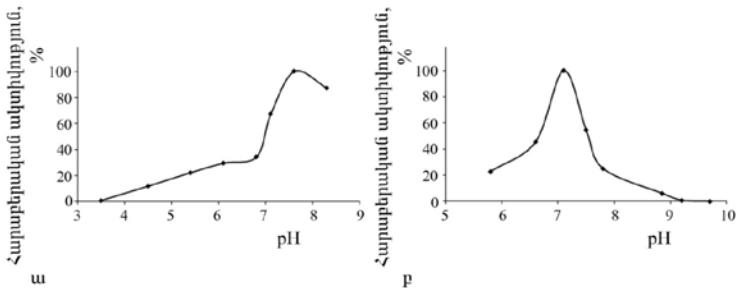


Նկար 6. Ազատ և իմոբիլիզացված D-ամինաացիլազների ակտիվության կախումը ջերմաստիճանից

ա) ազատ ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 57,6 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը): **բ)** իմոբիլիզացված ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 0,0024 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը):

Նկար 7-ում բերված է հետազոտվող D-ամինաացիլազի իմոբիլիզացված և ազատ ձևի pH օպտիմումների որոշման արդյունքները: Բնչպես երևում է ստացված արդյունքներից, եթե ազատ ֆերմենտային պրեպարատի pH օպտիմումը (նկար 7ա), գտնվում է pH-ի 7,5-7,8 տիրույթում, իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի համար (նկար 7բ) այն գտնվում է pH-ի 7,1-7,5 տիրույթում:

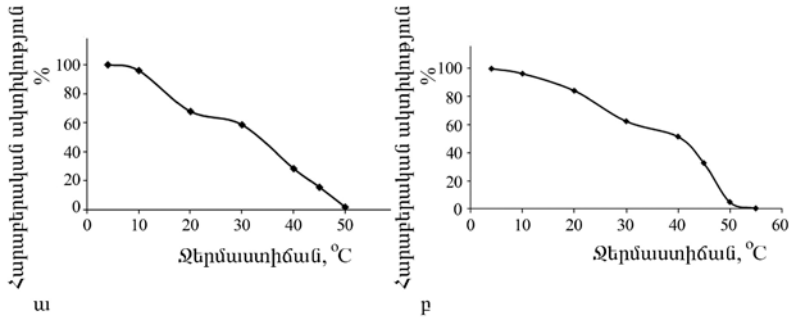
Համեմատության համար *Alcaligenes faecalis* DA1-ից անջատված D-ամինաացիլազայի ինչպես ազատ, այնպես էլ իմոբիլիզացված պրեպարատների համար օպտիմալ է եղել pH-ի 8,0 արժեքը [Tsai et al., 1992]:



Նկար 7. D-Ամինաացիլազի ազատ և իմոբիլիզացված ֆերմենտային պրեպարատների ակտիվության կախվածությունը pH-ից:

ա) ազատ ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 7,6 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը):

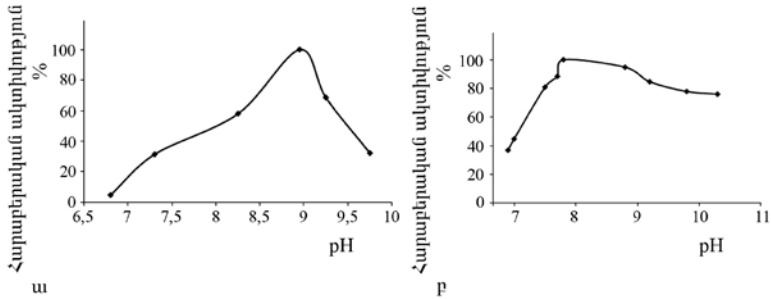
բ) իմոբիլիզացված ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 0,0024 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը):



Նկար 8. Ազատ և իմոբիլիզացված D-ամֆինացիլազի ջերմակայունությունը ա) ազատ ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 57,5 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը): բ) իմոբիլիզացված ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 0,0024 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը):

Նկար 8-ում բերված է իմոբիլիզացված և ազատ ֆերմենտային պրեպարատի ջերմակայունության որոշման արդյունքները: Ինչպես երևում է նկար 8ա-ից նշված ջերմաստիճաններում, 20 րոպե ինկուբացումից հետո ազատ ֆերմենտային պրեպարատի սկզբնական ակտիվությունը պահպանվում է մինչև 20 °C ջերմաստիճանը, իսկ ինկուբացման ջերմաստիճանների հետագա բարձրացումների դեպքում այն աստիճանաբար սկսում է ընկնել: Ազատ D-ամֆինացիլազը իր ակտիվության 50 %-ը կորցնում է 35 °C ջերմաստիճանում: Իմոբիլիզացված ֆերմենտը (նկար 8բ) նշված ջերմաստիճաններում, pH-ի 7,8 արժեքի դեպքում, 20 րոպե ինկուբացումից հետո նույնպես իր սկզբնական ակտիվությունը պահպանում է մինչև 20 °C ջերմաստիճանը, որից հետո այն աստիճանաբար սկսում է ինակտիվանալ: Իր ակտիվության կեսը իմոբիլիզացված D-ամֆինացիլազը կորցնում է 40 °C ջերմաստիճանում 20 րոպե ինկուբացնելիս: Արդյունքների համեմատությունից երևում է, որ իմոբիլիզացված ֆերմենտը ի տարբերություն նատիվ ֆերմենտի 5 °C-ով ավելի ջերմակայուն է: Համեմատության համար *Alcaligenes faecalis* DA1 շտամից անջատված D-ամֆինացիլազը և ազատ, և իմոբիլիզացված վիճակում ջերմակայուն է 40 °C ջերմաստիճանային պայմաններում [Tsai et al., 1992]:

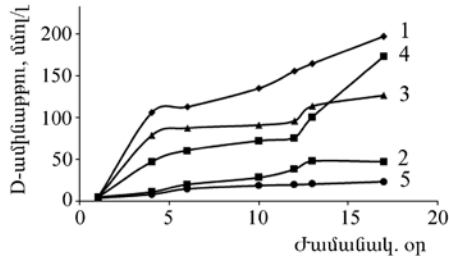
Նկար 9-ում բերված են իմոբիլիզացված և ազատ ֆերմենտային պրեպարատի pH-ից կախված ջերմակայունության որոշման արդյունքները: Ինչպես երևում է նկար 9ա-ից ազատ D-ամֆինացիլազը 40 °C ջերմաստիճանում, pH-ի տարբեր արժեքներում 20 րոպե ինկուբացնելիս կայուն է pH-ի 8,8-9,3 տիրույթներում, իսկ իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորը 40 °C ջերմաստիճանային պայմաններում pH-ի տարբեր արժեքներում 20 րոպե ինկուբացնելիս առավել ջերմակայուն է pH-ի ավելի լայն՝ 7,5-10,2 տիրույթում: Համեմատության համար *Alcaligenes faecalis* DA1 շտամից անջատված D-ամֆինացիլազն ազատ վիճակում ջերմակայուն է pH-ի 5-ից 11-ի տիրույթում, իսկ իմոբիլիզացված վիճակում՝ սկսած 9-ից [Tsai et al., 1992]:



Նկար 9. Ազատ և իմոբիլիզացված D-ամինաացիլազի ջերմակայունության կախումը pH-ից

ա) ազատ ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 19,1 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը): բ) իմոբիլիզացված ֆերմենտային պրեպարատ (100 %-ը համապատասխանում է 0,0024 միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությանը):

Նկար 10-ում բերված են 200 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով տարբեր սուբստրատների առկայությամբ իմոբիլիզացված ֆերմենտային պրեպարատի էնզիմատիկ ռեակցիայի խորության որոշման արդյունքները: Արդյունքներից երևում է, որ 400 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով N-ացետիլ-DL-մեթիոնինի D-բաղադրիչի դեացետիլացման ռեակցիայի խորությունը կազմում է 99 %՝ 17 օրվա ընթացքում, այն դեպքում, երբ միևնույն ժամանակահատվածում նույն կոնցենտրացիայով N-ացետիլ-DL-թիրոզինի, N-ացետիլ-DL-ալիլզիլիցինի, N-ացետիլ-DL-օքսիվալինի և N-ացետիլ-DL-տրիպտոֆանի D-բաղադրիչների դեացիլացման ռեակցիաների խորությունները կազմում են համապատասխանաբար 23,7 %, 58,3 %, 86,5 %, 11,6 %:



Նկար 10. Իմոբիլիզացված D-ամինաացիլազով տարբեր սուբստրատների դեացիլացումը

1- N-ացետիլ-DL-մեթիոնին, 2-N-ացետիլ-DL-թիրոզին, 3- N-ացետիլ-DL-ալիլզիլիցին, 4- N-ացետիլ-DL-օքսիվալին, 5- N-ացետիլ-DL-տրիպտոֆան:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Հողի տարբեր նմուշներից անջատվել են D-ամինաացիլազային ակտիվությամբ օժտված նոր մանրէներ, որոնցից հետագա ուսումնասիրությունների համար ընտրվել է AM6.1 շտամը: 16S ռԴՆԹ-ի 1002 զույգ նուկլեոտիդների հաջորդականության մանրէների համանման տվյալների բազայի հետ ԲԼԱՍՍ

անալիզի արդյունքում ընդամենը 83 % հումուլոզիայի հիման վրա այն վերագրվել է *Alcaligenaceae* ընտանիքի նոր տեսակի, և ըստ երևույթին նոր ցեղի:

2. Մշակվել է AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի անջատման և մաքրման սխեմա, որի արդյունքում ֆերմենտային պրեպարատի տեսակարար ակտիվությունը բարձրանում է ավելի քան 870 անգամ՝ ակտիվության 3 % ընդհանուր էլքի պայմաններում: Որոշվել է ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը, ջերմաստիճանային և pH օպտիմումները, ջերմակայունությունը, pH-ից կախված ջերմակայունությունը: Հետազոտվել է ֆերմենտի ակտիվության վրա որոշ ջերմակայունացնող նյութերի, Zn-ի և այլ երկվալենտ մետաղների իոնների, ինչպես նաև SH-խմբերի ռեագենտների ազդեցության պատկերը:
3. Սուբստրատային սպեցիֆիկության հետազոտությունները ցույց են տվել որ AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազը բացարձակ ստերեոսպեցիֆիկություն է ցուցաբերում N-ացետիլ ամինաթթուների D-ստերեոիզոմերների նկատմամբ: Ֆերմենտը առավել բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում N-ացետիլ-D-մեթիոնինը, ինչպես նաև արոմատիկ և հիդրոֆոբ N-ացետիլ-ամինաթթուները որպես սուբստրատ կիրառելիս և թույլ ակտիվության՝ հիմնային N-ացետիլ-ամինաթթուները որպես սուբստրատ կիրառելիս: Այն բոլորովին ակտիվ չէ հիդրոֆիլ և թթվային N-ացետիլ-ամինաթթուների դեպքում:
4. Գծային ռեգրեսիոն անալիզի կիրառմամբ N-ացետիլ-D-մեթիոնին, N-ացետիլ-D-ալանին, N-ացետիլ-D-ֆենիլալանին, N-ացետիլ-D-վալին, N-ացետիլ-D-օքսիվալին, N-ացետիլ-D-լեյցին և N-ացետիլ-D-թիրոզին սուբստրատների համար հաշվարկվել են Միխաելիսի թվացյալ հաստատունները և համապատասխան ռեակցիաների թվացյալ մաքսիմալ արագությունները: Ցույց է տրվել, որ ֆերմենտային պրեպարատի մոտ սուբստրատային արգելակում է դիտվում N-ացետիլ-D-լեյցինով և N-ացետիլ-D-թիրոզինով (K_s ՝ 35,5±28,3 և 15,8±4,5, համապատասխանաբար): D-Ամինաացիլազի մրցակցային արգելակում է դիտվել ռեակցիայի պրոդուկտով՝ քացիաթթվով ($K_i=104,7 \pm 21,6$ մմոլ/լ, $K_m=2,5 \pm 0,4$ մմոլ/լ, $V_{max}=25,1 \pm 1,5$ միավոր/մգ):
5. Իրականացվել է AM6.1 շտամի D-ամինաացիլազի ամինախմբերով կովալենտ իմոբիլիզացում սիլոքսոմ C-80 խեժի վրա: Ռեակցիայի պայմանների օպտիմալացման արդյունքում պահպանվել է իմոբիլիզացման միջավայր տրված ֆերմենտային ակտիվության 20 %-ը: Հետազոտվել են իմոբիլիզացված D-ամինաացիլազի ջերմաստիճանային և pH-օպտիմումները, ջերմակայունությունն ու ջերմակայունության կայսումը pH-ից:
6. Ազատ և իմոբիլիզացված D-ամինաացիլազի կիրառմամբ 200 մմոլ/լ N-ացետիլ-D-մեթիոնինի դեացիլացումը ընթացել է 97-98 % խորությամբ: Ցույց է տրվել, որ 10 մմոլ/լ D-վալինը նպաստում է ինչպես կենսակատալիզի պրոցեսի արագացմանը, այնպես էլ ֆերմենտի իմոբիլիզացման արդյունավետության բարձրացմանը:
7. Իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորով N-ացետիլ-DL-մեթիոնինից զատ իրականացվել է նաև 400-ական մմոլ/լ N-ացետիլ-DL-թիրոզինից, N-ացետիլ-DL-ալիլզիլիցինից, N-ացետիլ-DL-օքսիվալինից և N-ացետիլ-DL-տրիպտոֆանից D-ամինաթթուների ստացման կենսատրանսֆորմացիոն պրոցեսներ, որոնց էլքերը 17 օրվա ընթացքում կազմել են համապատասխանաբար 23,7 %, 58,3 %, 86,5 % և 11,6 %, ինչը ցույց է տալիս, որ ստացված կենսակատալիզատորը կարելի է

օգտագործել նաև որոշ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների ստացման գործընթացներում:

Ստենսիստության հիմնական արդյունքները տպագրված են հետևյալ աշխատանքներում.

1. **Mkhitaryan A.V.**, Aghanyants H.A., Koloyan H.O., Hovsepian A.S., Hambardzumyan A.A. Study of bacterial D- and L-aminoacylases // Scientific Seminar “Modern State of Biotechnological Developments and Ways of Commercialization”, Book of Abstracts, September 11-12, **2012**, Yerevan, Armenia. – P. 74.
2. Aghanyants H.A., **Mkhitaryan A.V.**, Koloyan H.O., Hovsepian A.S., Hambardzumyan A.A. Preparation and Study of Aminoacylases from Thermophilic Bacteria *Geobacillus stearothermophilus* // Scientific Seminar “Modern State of Biotechnological Developments and Ways of Commercialization”. Book of Abstracts, September 11-12, **2012**, Yerevan, Armenia. – P. 51.
3. **Mkhitaryan A.V.** Isolation of strains with D-aminoacylase activity from soil samples and preliminary characterization of corresponding enzymes // Proceedings of International young scientists conference "Perspectives for development of molecular and cellular biology - 3", September 26-29, **2012**. Yerevan, Armenia. – P. 161-165.
4. Аганянц О.А., **Мхитарян А.В.**, Дадаян А.С., Коляян А.О., Овсепян А.С. Разработка метода получения L- и D-валина из D,L-валина с использованием L-аминоацилазы // Биолог. журн. Армении, **2012**, №3 (64). – С. 91-96.
5. **Mkhitaryan A.V.** Isolation and identification of strain with D-aminoacylase activity: preliminary characterization of the enzyme // Biological journal of Armenia, **2013**, №4 (65). – P. 58-63.
6. **Mkhitaryan A.V.**, Paloyan A.M., Hambardzumyan A.A. Some catalytic properties of D-aminoacylase of newly isolated strain N6.1 // 2nd International Scientific Conference of Young Researchers "Contribution of young generation in the development of biotechnology". Book of Articles and Abstracts, October 1-4, **2013**, Yerevan, Armenia. – P. 148-152.
7. Hambardzumyan A.A., **Mkhitaryan A.V.**, Paloyan A.M. Immobilization of new D-aminoacylase of AM6.1 strain // International Scientific Workshop "Trends in microbiology and microbial biotechnology". Book of Abstracts, October 5-8, **2014**, Yerevan, Armenia. – P. 57.
8. Paloyan A.M., **Mkhitaryan A.V.**, Hambardzumyan A.A. Substrate specificity of new D-aminoacylase of AM6.1 strain // International Scientific Workshop "Trends in microbiology and microbial biotechnology". Book of Abstracts, October 5-8, **2014**, Yerevan, Armenia. – P. 79.

Мхитарян Анна Вардгесовна

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ D-АМИНОАЦИЛАЗЫ ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ НОВЫХ МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА *ALCALIGENACEAE*

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: D-Аминоацилаза, новый штамм, семейство *Alcaligenaceae*, выделение и очистка, субстратная специфичность, стационарная кинетика, биотрансформация, ковалентная иммобилизация.

Параллельно с повышением спроса на белковые и небелковые аминокислоты на мировом рынке, также увеличивается интерес к этим веществам и разыскиваются инновационные способы получения последних, которые были бы наиболее приемлемыми и

практичными в исполнении. Выделение новых штаммов с D-аминоацилазой активностью из различных образцов почвы, разработка эффективных методов очистки соответствующего фермента, изучение его физико-химических и каталитических свойств, иммобилизация, и в конечном итоге, получение D-аминокислот биотрансформационным способом, несомненно актуально и важно.

Данная диссертационная работа посвящена выделению бактериальных штаммов с D-аминоацилазной активностью из образцов почвы и их предварительной характеристике, очистке D-аминоацилазы из штамма с наилучшими характеристиками и изучению его физико-химических и каталитических свойств, иммобилизации полученного фермента и изучению некоторых технологических характеристик иммобилизованного фермента.

Из разных образцов почвы были выделены новые бактерии, владеющие D-аминоацилазной активностью, из числа которых для дальнейшего изучения был отобран штамм АМ6.1. БЛАСТ анализ 1002 п.о. нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штамма АМ6.1 с базой данных аналогичных последовательностей эубактерий и археобактерий выявил максимум 83% гомологии с представителями семейства *Alcaligenaceae* – *Achromobacter* и *Bordetella*. На основании полученных результатов мы отнесли штам АМ6.1 к новому виду и даже к новому роду семейства *Alcaligenaceae*.

На основе ионообменной хроматографии и хроматографии на гидроксипатите нами была разработана схема выделения и очистки D-аминоацилазы штамма АМ6.1 в результате которой удельная активность ферментного препарата увеличивается в 870 раз с общим выходом активности – 3 %. Методом гель-фильтрации было показано, что молекулярный вес D-аминоацилазы штамма АМ6.1 составляет 66 кДа. Были изучены температурный и рН оптимумы, термостабильность и зависимость термостабильности от рН для изучаемого фермента.

Изучали действие некоторых термопротекторных соединений, ионов двухвалентных металлов, реагентов SH-групп на активность фермента. Было показано, что D-аминокислоты, в частности D-валин, являются хорошим термостабилизаторами для D-аминоацилазы штамма АМ6.1. Также, было показано, что SH-группы не имеют особой значимости для действия фермента, а ионы Zn^{2+} по видимому являются коферментом.

Исследования субстратной специфичности показали, что D-аминоацилаза штамма АМ6.1 проявляет абсолютную стереоспецифичность к D-стереоизомерам N-ацетил-аминокислот. N-ацетил-D-метионин, а также ароматические и гидрофобные N-ацетил-аминокислоты являются хорошими, а основные N-ацетил-аминокислоты – плохими субстратами для фермента. Кислые и гидрофильные N-ацетил-D-аминокислоты не являются субстратами для фермента.

С применением линейного регрессионного анализа рассчитаны константы Михаелиса (K_m) и максимальные скорости реакции (V_{max}) для следующих субстратов: N-ацетил-D-метионин, N-ацетил-D-аланин, N-ацетил-D-фенилаланин, N-ацетил-D-тирозин, N-ацетил-D-валин, N-ацетил-D-оксивалин, N-ацетил-D-лейцин. Показано субстратное ингибирование D-аминоацилазы N-ацетил-D-лейцином ($K_i=35,5 \pm 28,3$ мМ) и N-ацетил-D-тиозином ($K_i=15,8 \pm 4,5$ мМ). Наблюдалось конкурентное ингибирование изучаемого фермента продуктом – уксусной кислотой ($K_i=104,7 \pm 21,7$ мМ, $K_m=2,5 \pm 0,5$ мМ, $V_{max}=25,1 \pm 1,5$ Ед/мг).

Нами проведена ковалентная иммобилизация D-аминоацилазы штамма АМ6.1 на силихроме С-80 посредством аминогрупп. В результате оптимизации условий реакции нам удалось сохранить 20 % ферментативной активности препарата после иммобилизации. Температурный и рН опимумы, термостабильность и зависимость термостабильности от рН для иммобилизованного фермента сравнивались с аналогичными показателями свободного фермента. Было показано, что после иммобилизации оптимальная температура остается неизменным – 40 °С, оптимальный рН сдвигается из области 7,5-7,8 в область 7,1-7,5, термостабильность повышается на 5 °С, а область максимальной термостабильности расширяется от рН 8,8-9,3 до рН 5,0-11,0.

Деацилирование 200 мМ N-ацетил-D-метионина доходило до глубины 97-98 % как с применением свободной, так и иммобилизированной D-аминоацилазы. Было показано, что 10 мМ D-валин способствует как ускорению процесса биокатализа, так и эффективности иммобилизации фермента.

Кроме N-ацетил-D-метионина реакции деацилирования, с применением иммобилизированной D-аминоацилазы, были проведены со следующими субстратами: N-ацетил-DL-аллилглицин, N-ацетил-DL-оксивалин, N-ацетил-DL-триптофан, N-ацетил-DL-тирозин, каждый в концентрации 400 мМ. Выхода реакций составляли: 23,7 %, 58,3 %, 86,5 % и 11,6 %, соответственно, что указывает на возможность применения полученного биокатализатора для получения некоторых D-аминокислот различной природы.

В обобщение проведенных исследований мы предлагаем новую иммобилизованную D-аминоацилазу в качестве биокатализатора для синтеза D-аминокислот из соответствующих рацематов, который отличается высокой удельной активностью, стабильностью в широком диапазоне pH, медленной инактивацией при биосинтезе целевой аминокислоты, высокой стереоспецифичностью и широкой субстратной специфичностью, а также высокими выходами реакций деацилирования.

Mkhitaryan Anna V.

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND POSSIBILITIES OF APPLICATION OF D-AMINOACYLASE ISOLATED FROM NEW MICROBS OF *ALCALIGENACEAE* FAMILY

SUMMARY

Key words: *D-Aminoacylase, new strain, Alcaligenaceae family, isolation and purification, substrate specificity, stationary kinetics, biotransformation, covalent immobilization.*

In parallel with the increase in demand for protein and non-protein amino acids in the global market is also increasing interest in these substances and sought innovative ways to get the latest, which would be the most appropriate and practical to implement. Isolation of new strains with the D-aminoacylase activity of various soil samples, the development of effective methods of purification of the corresponding enzyme, the study of its physico-chemical and catalytic properties, immobilization, and ultimately, obtaining D-amino acids by biotransformation process, is certainly relevant and important.

This thesis deals with the isolation of bacterial strains with D-aminoacylase activity from soil samples and their preliminary characterization, purification of D-aminoacylase from the strain with the best characteristics and the study of physico-chemical and catalytic properties of the enzyme, immobilization of obtained enzyme and the study of some technological characteristics of the immobilized enzyme.

From different soil samples were allocated new bacteria possessing D-aminoacylase activity, of which for the further study strain AM6.1 was selected. BLAST analysis of the 1002 bp nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of strain AM6.1 with a database of similar sequences of eubacteria and archaea revealed a maximum 83 % homology with the representatives of the family *Alcaligenaceae* - *Achromobacter* and *Bordetella*. Based on these results we refer the new strain AM6.1 to the new species, and even to the new genus of the family *Alcaligenaceae*.

Based on ion exchange chromatography and hydroxylapatite chromatography, we developed a scheme for isolation and purification of D-aminoacylase of strain AM6.1, in which result the specific activity of the enzyme preparation increased to 870 times with a total activity yield - 3%. By gel filtration was found that the molecular weight of D-aminoacylase of AM6.1 strain is 66 kDa. We studied the temperature and pH optima, thermal stability and dependence of thermostability on pH for studied enzyme.

The effect of some thermoprotective compounds, divalent metal ions, reagents of SH-groups in the activity of the enzyme was studied. It has been shown that D-amino acids, in particular D-valine, are good for thermostabilization of D-aminoacylase of AM6.1 strain. Also, it has been

shown that SH-groups have no particular significance for the enzyme activity, and Zn^{2+} ions seems to be coenzyme.

Studies of substrate specificity revealed that the D-aminoacylase of AM6.1 strain exhibits absolute stereospecificity to the D-stereoisomers of N-acetyl-amino acids. N-acetyl-D-methionine, as well as aromatic and hydrophobic N-acetyl-amino acids are good substrates and the basic N-acetyl-amino acids are poor substrates for studied enzyme. The acidic and hydrophilic N-acetyl-D-amino acids can not serve as substrates for studied D-aminoacylase.

Using linear regression analysis Michaelis constant (K_m) and maximum reaction velocity (V_{max}) were calculated for the following substrates: N-acetyl-D-methionine, N-acetyl-D-alanine, N-acetyl-D-phenylalanine, N-acetyl-D-tyrosine, N-acetyl-D-valine, N-acetyl-D-oxyvaline, N-acetyl-D-leucine. Substrate inhibition of D-aminoacylase was displayed with N-acetyl-D-leucine ($K_s = 35.5 \pm 28.3$ mM) and N-acetyl-D-tyrosine ($K_s = 15.8 \pm 4.5$ mM). Competitive inhibition of the studied enzyme with product – acetic acid was observed ($K_i = 104.7 \pm 21.7$ mM, $K_m = 2.5 \pm 0.5$ mM, $V_{max} = 25.1 \pm 1.5$ U/mg).

We carried out the covalent immobilization of D-aminoacylase of AM6.1 strain on silochrome C-80 through amino groups. As a result of optimizing the reaction conditions, we were able to save 20% of the enzyme activity after immobilization of preparation. Temperature and pH optima, thermostability, and dependence of thermostability on pH for immobilized enzyme were compared with those of the free enzyme. It was shown that after immobilization optimum temperature remains unchanged - 40 °C, the optimum pH shifted from 7.5-7.8 to 7.1-7.5, the thermal stability is increased by 5 °C, and a region of maximum thermal stability extends from pH 8.8-9.3 to pH 5.0-11.0.

Deacylation of 200 mM N-acetyl-D-methionine reached a depth of 97-98% using free and immobilized D-aminoacylase. It was shown that 10 mM D-valine contributes both to accelerate the biocatalysis and the efficiency of enzyme immobilization.

Besides N-acetyl-D-methionine deacylation reactions, using immobilized D-aminoacylase, were conducted with the following substrates: N-acetyl-DL-allylglycine, N-acetyl-DL-oxyvaline N-acetyl-DL-tryptophan, N-acetyl-DL-tyrosine, each at a concentration of 400 mM. The yields of reactions were: 23.7%, 58.3%, 86.5% and 11.6%, respectively, indicating the possibility of applying the obtained biocatalyst to produce some D-amino acids of different nature.

In generalization of the research, we propose a new immobilized D-aminoacylase as a biocatalyst for the synthesis of D-amino acids from the corresponding racemates, which has a high specific activity, stability over a wide range of pH, the slow inactivation during the biosynthesis of the target amino acid, high stereospecificity and a broad substrate specificity, and also high yields of deacylation reactions.