

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

Շահինյան Գրիգոր Սմբատի

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՐԿՐԱԶԵՐՄԱՅԻՆ ԱՂԲՅՈՒՐՆԵՐԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ԱԵՐՈՔ,
ԷՆԴՈՍՊՈՐԱՆՈՐ ԱՌԱՋԱՑՆՈՂ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԼԻՊԱԶՄԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ
ԴՐԱ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՀԵՌԱՆԿԱՐՆԵՐԸ**

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

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2015

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

Шагинян Григор Смбатович

**ЛИПАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АЭРОБНЫХ, ЭНДОСПОРОБРАЗУЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ
ИСТОЧНИКОВ АРМЕНИИ И ПОТЕНЦИАЛ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН – 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ, կ.գ.դ.,
պրոֆեսոր Ա. Ն. Թռչունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ. գ. դ., պրոֆեսոր
Ն. Գ. Հովհաննիսյան
կ. գ. թ., դոցենտ
Լ. Ս. Գաբրիելյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) Համալսարան:

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015 թ. հունիսի 15-ին, ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

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

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

Սեղմագիրն առաքված է 2015 թ. հունիսի 15-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ.

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель:

член корр. НАН РА, д.б.н.,
профессор А. А. Трчунян

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Г. Г. Оганесян
к.б.н., доцент Л.С. Габриелян

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский) Университет.

Защита диссертации состоится 15 июля 2015 г. в 15:00 часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 15 июня 2015 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н.

Г. Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Աշխատանքի արդիականությունը: Լիպազները (E.C.3.1.1.3) լայնորեն տարածված, մեծ ֆիզիոլոգիական և արտադրական կարևորություն ունեցող ֆերմենտներ են, որոնք իրականացնում են եռզիցերիդների հարաբերականորեն երկար (ացիլ շղթայի երկարությունը >10 ածխածնային ատոմից) շղթաների հիդրոլիզ (Thomson et al., 1999; Verger, 1997): Լիպազները կատալիզում են նաև էսթերների հիդրոլիզը և տրանսէսթերիֆիկացիան, ինչպես նաև ցուցաբերում են էնանտոմերային ընտրողական հատկություններ:

Լիպազները գտել են լայն կիրառություն սննդի, կաթնամթերքների, լվացող միջոցների, դեղագործության, կոսմետիկ միջոցների արտադրություններում, ինչպես նաև կաշվի վերամշակման և վառելանյութերի ստացման գործընթացներում (Lotti and Alberghina, 2007):

Լիպազները լայնորեն տարածված են կենդանական աշխարհում և հանդիպում են բույսերի, կենդանիների և մանրէների մոտ: Ներկայումս արտադրական մեծ կիրառություն են գտել մանրէային լիպազները, հատկապես ջերմասեր մանրէներից ստացվածները (Sharma et al., 2013): Ջերմասեր մանրէներից ստացված ջերմակայուն լիպազները ձեռք են բերում ավելի մեծ արտադրական և կենսատեխնոլոգիական հետաքրքրություն շնորհիվ դրանց ունակությանը գործելու միջավայրի ծայրահեղ պայմաններում, որոնք օրինակ առկա են որոշ արտադրական գործընթացներում:

Մի շարք *Anoxybacillus*, *Bacillus* և *Geobacillus* ցեղերին պատկանող ջերմասեր բացիլների տեսակներ մեկուսացվել են տարբեր երկրաջերմային աղբյուրներից և ներկայացվել են որպես ջերմակայուն լիպազների արտադրիչներ (Bae et al., 2005; Kim et al., 2014; Lee et al., 1999; Leow et al., 2004; Olusesan et al., 2009; Rahman et al., 2005; Schmidt-Dannert et al., 1994; Sharma et al., 2001; Wang et al., 1995): Մակայն ջերմակայուն լիպազների հանդեպ արտադրության պահանջը խթանում է նոր ջերմակայուն մանրէների մեկուսացմանը (Sharma et al., 2013):

Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող քեմոօրգանոտրոֆ մանրէները, շնորհիվ ջերմային սթրեսին դիմակայելու ճկուն մեխանիզմների առկայության, հայտնաբերվում են գրեթե բոլոր երկրաջերմային հանքային աղբյուրներում: Հայաստանը և Լեռնային Ղարաբաղը ևս հարուստ են ընդերքային տաք և ջերմային աղբյուրներով և վերջին ժամանակներս ցույց է տրվել դրանցում ջերմասեր մանրէների, ներառելով էնդոսպոր առաջացնող ջերմասեր բակտերիաների, տարածվածությունը (Hedlund et al., 2013; Panosyan, 2010; Panosyan and Birkeland, 2014): Չնայած այս առաջընթացին Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներում լիպազ արտադրող մանրէների կենսաբազամագանությունը դեռ բավարար ուսումնասիրված չէ:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Աշխատանքի նպատակն է եղել Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի տարածքներում գտնվող երկրաջերմային աղբյուրներից լիպազ արտադրիչ բացիլների մեկուսացումը և նույնականացումը, լիպազային ակտիվության ուսումնասիրությունը, լիպազները կողավորող գեների հայտնաբերումը և լիպազի սպիտակուցի կառուցվածքի մոդելավորումը:

Նպատակի իրականացման համար առաջ են քաշվել հետևյալ խնդիրները.

- Մեկուսացնել լիպագ արտադրող ջերմասեր բացիլներ *Sarfin* և *Քարվաճառի* երկրաջերմային աղբյուրների ջրի և տիղմի նմուշներից:
- Ընտրել և նույնականացնել առավել ակտիվ լիպագ արտադրիչ ջերմասեր բացիլների կուլտուրաներ, մեկուսացված բացիլներից ու Մանրէաբառության, բույսերի և մանրէների կենսաստեխնոլոգիայի ջերմասեր բացիլների հավաքածուից,
- Ուսումնասիրել ակտիվ լիպագ արտադրիչների լիպագ արտադրելու քանակական և որակական փոփոխությունները՝ կախված միջավայրի պայմաններից,
- Բացահայտել լիպագների արտադրության համար պատասխանատու գեները,
- Մոդելավորել լիպագային ֆերմենտի մոլեկուլի տարածական կառուցվածքը գեների նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հիման վրա:

Աշխատանքի գիտական նորույթը: Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներում լիպագ արտադրիչ ջերմասեր բացիլների տարածվածությունը: Ցույց է տրվել, որ հայկական երկրաջերմային աղբյուրներում ջերմասեր ակտիվ լիպագ արտադրիչները ներկայացված են *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* և *Geobacillus* ցեղերով:

Ցույց է տրվել, որ մեկուսացված շտամների կողմից արտադրվող լիպագներն օժտված են բարձր ջերմադիմացկունությամբ (45-75°C), ինչպես նաև պահպանում են ակտիվությունը թթվահիմնային լայն արժեքներում (pH 5-10):

Առաջին անգամ կատարվել է հայկական երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացված լիպագ արտադրիչ շտամների լիպագների գեների ուսումնասիրությունը և դրանց նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հիման վրա լիպագների մոլեկուլների կառուցվածքի մոդելավորումը՝ կենսահինֆորմատիկ մեթոդների կիրառմամբ: Մեթոդի օգտագործման շնորհիվ բացահայտվել է, որ ուսումնասիրված *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 (MDC 11857) և *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 (MDC 11855) շտամները արտադրում են GDSL, իսկ *Geobacillus* sp. T-65-4 (MDC 11856) շտամը արտադրում է Lip 1 ընտանիքներին պատկանող լիպագներ: *Geobacillus* ցեղին պատկանող բացիլների լիպագները իրենց կառուցվածքում պարունակում են Zn^{2+} և Ca^{2+} իոններ, որոնք հանդես են գալիս որպես ֆերմենտի ստաբիլիզատորներ:

Աշխատանքի կիրառական արժեքը: Մեկուսացված շտամների կողմից արտադրվող լիպագները ունեն բարձր ջերմադիմացկունություն և գործում են միջավայրի թթվահիմնային լայն արժեքներում, որը կարող է մեծ կիրառություն գտնել արտադրության տարբեր ոլորտներում: *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2-ի շտամի չմաքրված ֆերմենտը առավելագույն ակտիվություն է դրսևորել 65°C ջերմաստիճանային և pH 10 պայմաններում, որը հեռանկարային է արտադրական, հատկապես լվացող միջոցների արտադրության առումով:

Geobacillus ցեղին պատկանող բացիլների լիպագների համար Zn^{2+} և Ca^{2+} իոնները հանդես են գալիս որպես բարձր ջերմաստիճաններում ֆերմենտի

ստաբիլիզատորներ և կարող են կիրառվել արտադրական գործընթացները բարելավման նպատակով:

Ստեղծվել է ջերմասեր լիպազ արտադրիչ բացիլների հավաքածու, որոնք հեռանկարային կարող են լինել, ոչ միայն արդյունաբերության մեջ կիրառման, այլ նաև գիտահետազոտական աշխատանքներ իրականացման համար:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները.

1. Ուսումնասիրված շտամների կողմից արտադրվող լիպազներն օժտված են բարձր ջերմադիմացկունություն (45-75°C), և պահպանում են ակտիվությունը թթվահիմնային լայն արժեքներում (pH 5-10):
2. Ուսումնասիրված ջերմասեր բացիլները արտադրում են GDSL և Lip 1 ընտանիքներին պատկանող լիպազներ:
3. *Geobacillus* ցեղին պատկանող բացիլների լիպազների կառուցվաքում առկա Ca^{2+} և Zn^{2+} իոնները հանդես են գալիս բարձր ջերմաստիճաններում ֆերմենտի կառուցվածքի կայունացուցիչներ:
4. Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներում ջերմասեր ակտիվ լիպազ արտադրիչները ներկայացված են *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* և *Geobacillus* ցեղերով:

Աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ Կրթության և գիտության նախարարության Գիտության պետական կոմիտեի բազային ֆինանսավորման, CPEA-2011/10081 (Norwegian Cooperation Programme in Higher Education with Eurasia) և Գիտության և կրթության հայկական ազգային հիմնադրամի (ԳԿՀԱՀ-2011 Microbio-2493) դրամաշնորհների միջոցներով:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է նմուշառումը, ձևակերպված խնդիրների փորձնական իրականացումը, թեմայի վերաբերյալ գիտական գրականության ուսումնասիրությունը և վերլուծությունը, գիտական հոդվածների ևատենախոսության ձևակերպումը: Հիմնական խնդիրների ձևակերպումը և մեթոդների մշակումը, ինչպես նաև հետազոտությունների արդյունքները քննարկվել և մշակվել են գիտական ղեկավար, ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ., պրոֆ. Ա. Հ. Թոչույանի, ինչպես նաև դոցենտ, կ.գ.թ Շ. Հ. Փանոսյանի և կ.գ.թ. Ա. Ա. Մարգարյանի հետ համատեղ:

Աշխատանքի ապրոքացիան: Ատենախոսության արդյունքները զեկուցվել են Եվրոպայի կենսաքիմիկների ընկերությունների ֆեդերացիայի (FEBS) երիտասարդ գիտնականների ֆորումին (Փարիզ, Ֆրանսիա, 27-30 օգոստոսի, 2014), FEBS-ի կոնգրեսում (Փարիզ, Ֆրանսիա, 30 օգոստոսի - 4 սեպտեմբերի, 2014), “Մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի նվաճումները” միջազգային գիտաժողովում (Երևան, Հայաստան, 5-8 հոկտեմբերի, 2014), “Կենսաբանությունը XXI դարի գիտություն” 19-րդ երիտասարդ գիտնականների միջազգային դպրոց-գիտաժողովում (Պուշչինո, Ռուսաստան, 20-24 ապրիլի, 2015), ինչպես նաև Մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում իրականացվող սեմինարներում:

Հրատարակված աշխատություններ: Ատենախոսության արդյունքները ներկայացված են 7 հրատարակումներում, այդ թվում՝ 3 գիտական հոդվածներում և 4 գիտաժողովի թեզիսում:

Աշխատանքի կատարման վայրը: Աշխատանքը կատարվել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում:

Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտությունների նյութերից և մեթոդներից, հետազոտությունների արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է 112 էջի վրա, ներառում է 15 աղյուսակ, 21 նկար և 209 գրական հղում:

Գ.ԼՈՒԻՍ I. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկը նվիրված է թեմայի հետ առնչվող առավել հայտնի աշխատանքների ամփոփմանը: Առաջին մասում հանգամանորեն քննարկվում են բակտերիական լիպազների դասակարգումը և ֆիզիոլոգիական նշանակությունը, ինչպես նաև նկարագրված են ջերմասեր մանրէների լիպազների կառուցվածքային առանձնահատկությունները: Այնուհետև բնութագրվում են լիպազ արտադրիչ մանրէները և դրանց տարածվածությունը: Առանձին բաժին նվիրված է լիպազների կենսատեխնոլոգիական և արտադրական կիրառությանը:

Գ.ԼՈՒԻՍ II. ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԻՐՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Ուսումնասիրության նյութ են ծառայել ԵՊՀ Մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի հավաքածուում պահպանվող 72 աերոբ սպորառաջացնող թերմոֆիլ բացիլների կուլտուրաները, ինչպես նաև նոր մանրէներ (թվով 31), որոնք մեկուսացվել են Տաթևի և Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրներից:

Ակտիվ լիպազ արտադրիչների մեկուսացումը և ընտրությունը: Լիպազ արտադրող ջերմասեր բացիլների մեկուսացումը իրականացվել է կուտակիչ կուլտուրաների ստացման եղանակով՝ օգտագործելով ձիթապտղի յուղ կամ տվին 80 պարունակող սննդամիջավայրեր: Ակտիվ լիպազ արտադրիչների ընտրությունը իրականացվել է Ռոդամին B և ձիթապտղի յուղ, կամ տվին 80 և կալցիումի քլորիդ պարունակող պինդ սննդամիջավայրերի վրա մանրէների ցանքի միջոցով: Լիպազային ակտիվության ինդեքսի արժեքը (ԼԱԻ), օգտագործվել է լիպազի արտադրության մակարդակը չափելու համար:

Ընտրված լիպազ ակտիվ բակտերիաների նույնականացումը իրականացվել է ըստ ֆենոտիպական հատկանիշների և 16S rԴՆԹ-ի հաջորդականությունների սեքվենավորման և վերլուծության միջոցով:

Մանրէների կողմից լիպազի առավելագույն արտադրության համար պայմանների (pH և ջերմաստիճան) օպտիմալացման համար բակտերիաներն աճեցվել են pH 4.0-11 ինդուկցող պինդ սննդամիջավայրում: Ջերմաստիճանային

օպտիմալ պայմանները գտնելու համար բացիլները աճեցվել են օպտիմալ pH-ի արժեքով ինդուկցող սննդամիջավայրում և ինկուբացվել 25-65°C ջերմասիճանային պայմաններում՝ 10°C միջակայքով:

Բացիլների լիպազային ակտիվությունը որոշվել է գունաչափական եղանակով՝ օգտագործելով p-նիտրոֆենոլ պալմիտատը (p-NPP) որպես սուբստրատ:

Լիպազային ակտիվության փոփոխության կախումը ջերմաստիճանից և pH-ից որոշելու համար օգտագործվող ռեակցիոն խառնուրդը պարունակել է ացետատային բուֆեր (pH < 6), Ֆոսֆատային բուֆեր (pH 6-9), կամ Տրիս-NaOH բուֆեր (pH 9-11)), 10 մկլ տրիտոն-X 100, 100 մկլ p-NPP (3 մգ/մլ) լուծված իզոպրոպանոլի մեջ, 100 մկլ չմաքրված ֆերմենտ և ինկուբացվել է 35°C-65°C ջերմաստիճաններում (10°C միջակայքով) 30 րոպեների ընթացքում: Ինկուբացիայի փուլի ավարտից հետո անջատված p-նիտրոֆենոլի քանակը որոշվել է 410 նմ ալիքի երկարությամբ գունաչափական եղանակով: Լիպազի ակտիվության տեսակարար միավորը (U/մլ) համարվում է ֆերմենտի այն քանակությունը, որը 1 րոպեի ընթացքում սուբստրատից առաջացնում 1 մկմոլ p-նիտրոֆենոլ (p-NP):

Լիպազները կոդավորող գեների հայտնաբերման համար ստեղծվել են համապատասխան փրայմերների գույգ օգտագործելով Primer3 (v.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) և NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) առցանց ծրագրերը: Որպես հիմք հանդիսացել են NCBI GeneBank գենադարանում դեպոնացված լիպազների համապատասխան գեները՝ *Anoxybacillus flavithermus* WK1 GDSL family lipase [NC_011567], *Bacillus licheniformis* strain D4 lipase gene [KC663720] և *Geobacillus* sp. HH01 lipase (lipA) [JQ360624]:

Տերմինտի կառուցվածքի մոդելավորման համար սեքվենավորման արդյունքում ստացված նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հիման վրա սինթեզվել են սպիտակուցի հաջորդականությունը ExPASy Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) առցանց համակարգի միջոցով: Սպիտակուցի երկրորդային և երրորդային կառուցվածքները պարզաբանվել են PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>) և SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) առցանց ծրագրերի միջոցով:

Տվյալների վիճակագրական վերլուծությունը իրականացվել է Microsoft Excel 2010 և R-Project (<http://www.r-project.org/>) ծրագրերի միջոցով:

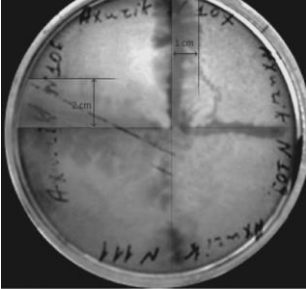
ԳԼՈՒԽ III. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

Լիպազ արտադրիչների մեկուսացումը և ակտիվ շտամ արտադրիչների ընտրությունը

Նմուշներից մեկուսացվել են տարբեր կուլտուրային և ձևաբանակն հատկանիշներ ունեցող մոտ 31 քեմոօրգանոտրոֆ աերոբ էնդոսպոր առաջացնող ջերմասեր բացիլներ: Հետագա ուսումնասիրությունների համար իրականացվել է ակտիվ լիպազ արտադրիչների ընտրություն՝ իրականացնելով բոլոր մեկուսացված կուլտուրաների, ինչպես նաև ԵՊՀ Մանրէաբանության, բույսերի և

մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում պահպանվող մանրէների հավաքածուից 72 աերոբ էնոսպոր առաջացնող ջերմասեր բացիլների ցանք համապատասխան սննդամիջավայրերի վրա:

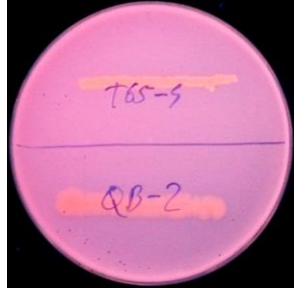
Սննդամիջավայր 3.1.-ում 55 և 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում 72 ժամվա ընթացքում մանրէների աճեցումից հետո լիպագ ակտիվ արտադրողիչներն ընտրվել են ըստ մանրէի աճի շուրջ առաջացած ճարպաթթուների և կալցիումական աղի պրեցիպիտացիոն գոտիների մեծության (նկար 1):



Նկար 1. Բացիլների աճը տվին պարունակող սննդամիջավայրում:



Նկար 2. Լիպագի արտադրության հայտնաբերումը ձիթապտղի յուղ և ռոդամին-Յ պարունակող պինդ սննդամիջավայրի վրա:



Ընտրված կուլտուրաների լիպագային ակտիվությունը հաստատվել է ռոդամին-Յ պարունակող պինդ սննդամիջավայրի վրա ցանքի միջոցով: Տվյալ սննդամիջավայրում բացիլների լիպագ արտադրելու ունակության ուսումնասիրության արդյունքները ներկայացված են նկար 2-ում:

Լիպագաների կողմից ճարպերի քայքայման արդյունքում առաջացած ճարպաթթուները կապվում են սննդամիջավայրում առկա ռոդամին-Յ-ի հետ, և ՌԻՄ ճառագայթման ներքո առաջացած կոմպլեքսները ձեռք են բերում լուսարձակելու հատկություն:

Ռոդամին B պարունակող սննդամիջավայրի վրա մեկուսացված շտամների և հավաքածուից ընտրված շտամներից ընտրվել են 9 ակտիվ լիպագ արտադրող կուլտուրաներ (Akhourik 106, Akhourik 107, Tatev 65-1, Tatev 65-2, Tatev 65-3, Tatev 65-4, Karvachar QV-1, Karvachar QB-2 և Karvachar QS-1), որոնք և հանդիսացել են ուսումնասիրությունների հետագա օբյեկտները (աղյուսակ 1):

Աղյուսակ 1. Տվին 80 և ձիթապտղի յուղ պարունակող սննդամիջավայրերում մեկուսացված բացիլների և ընտրված ակտիվ լիպագ արտադրողիչների թիվը:

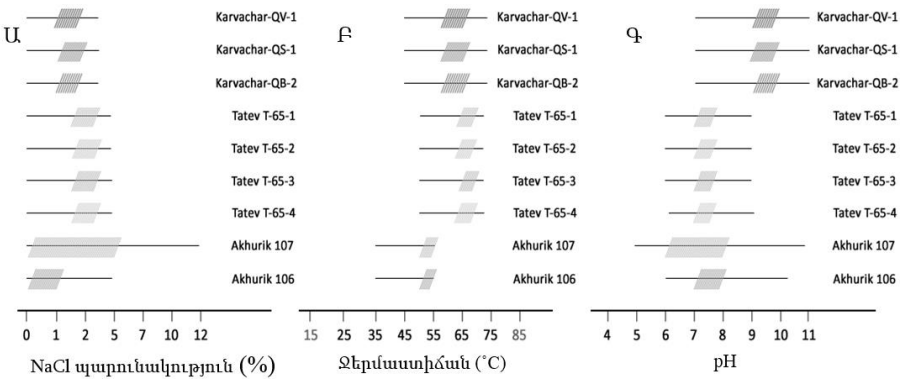
Երկրաջերմային աղբյուրը	Տվին 80 միջավայրում մեկուսացված բացիլների թիվը	Ձիթապտղի յուղով միջավայրում մեկուսացված բացիլների թիվը	Ակտիվ լիպագ արտադրողիչների ընդհանուր թիվը
Ախուրիկ	10	-	2
Տաթև	11	8	4
Քարվաճառ	8	4	3

Մեկուսացված բակտերիաներն անվանակոչվել են ըստ այն տեղանքի կամ աղբյուրի անվանման, որից կատարվել է դրանց մեկուսացումը:

Բոլոր կուլտուրաները պահպանվում են ԵՊՀ Մանրէաբանության, բույսերի և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում առկա մանրէների հավաքածուում, շեղ ազարային սննդամիջավայրի վրա, 4°C պայմաններում:

Լիպազ արտադրիչ բակտերիաների ֆենոտիպական հատկանիշների բնութագրումը

Ընտրված լիպազ արտադրիչները բնութագրվել են ըստ դրանց կուլտուրային, ձևաբանական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկանիշների: Բացիլները միմյանցից տարբերվել են ըստ պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացրած գաղութների ձևով, գույնով և մակերևույթով: Դրանք առաջացնում են բաց դեղին, սպիտակ կամ կաթնագույն, շրջանաձև, հարթ, թափանցիկ 0.5 – 2.0 մմ տրամագծով գաղութներ: Ընտրված լիպազ ակտիվ բացիլները ըստ Գրամի ներկվում են դրական, էնդոսպոր առաջացնող, շարժուն ձողաձև բջիջներ են: Բջիջները ունեն 1.8 - 7.8 մկմ երկարություն և 0.5 - 2.0 մկմ լայնություն: Բոլոր մեկուսացված բացիլները ֆակուլտատիվ անաերոբ են և ցուցաբերել են տարբեր pH և ջերմաստիճանների արժեքներում աճելու ունակություն (նկար 3):



Նկար 3. Զերմասեր բացիլների աճի ջերմաստիճանային (F) և pH (Q) տարբեր արժեքներում, ինչպես նաև NaCl-ի տարբեր խտություններ պարունակող սննդամիջավայրերում (U): Աճի օպտիմալ արժեքների սանդղակը ներկայացված է շեղագծերով:

Ուսումնասիրված բակտերիաներն ունակ են օպտիմալ աճ ցուցաբերելու 55°C-65°C ջերմաստիճանային միջակայքում: Ախուրիկի երկրաջերմային աղբյուրից անջատված բակտերիաներն (Akhourik 106 և Akhourik 107) ունակ են նաև աճելու 37°C և ստորև ջերմաստիճաններում, ինչը պարզորոշ է դարձնում այս մանրէների ջերմատուլերանստ լինելը:

Մասնավորապես հետաքրքիր է այն փաստը, որ Տաթևի և Ախուրիկի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացված բացիլներն ունակ են օպտիմալ աճ ցուցաբերել 65°C ջերմաստիճանում, չնայած այն բանին, որ բնական աղբյուրների

վերգետնյա հատվածներում, որտեղ կատարվել է նմուշառումը, ջերմաստիճանը տատանվում է 28-30°C ջերմաստիճանային միջակայքում: Ախուրիկի և Տաթևի տարածաշրջաններում 42°C և ավելի ջերմաստիճան ցույց է տրվել օգտագործելով քիմիական, երկրաբանական ջերմաչափեր, երբ կատարվել են երկրի խորքային շերտերի ջերմաստիճանի չափումներ՝ փորելով մինչև 1000 մ: Խորքային ջրերի ջերմաստիճանների համեմատությունը մանրէների կողմից ցուցաբերված օպտիմալ աճի ջերմաստիճանի հետ թույլ է տալիս եզրակացնել, որ այս մանրէները ի վիճակի են աճելու խորքային ավազաններում և չպետք է համարվեն վերին շերտերի ջրերի աղտոտիչներ:

Ջերմասեր բակտերիաներն առավելագույն աճ են ցուցաբերում pH 7.0 միջավայրում, բացառությամբ Karvachar QV-1, Karvachar QB-2 և Karvachar QS-1 շտամների, որոնց աճի օպտիմալ pH-ի արժեքները տատանվում են 9.0-10 սահմաններում (նկար 3):

NaCl պարունակության հանդեպ ամենաբարձր դիմացկունություն ցուցաբերել է Akhurik 107 կուլտուրան: Վերջինս ունի նաև կերակրի աղի պարունակությամբ միջավայրում օպտիմալ աճ ցուցաբերելու ամենաբարձր արժեքը, որը կազմում է 5%: Մյուս ուսումնասիրված կուլտուրաները ի վիճակի են եղել դիմանալու կերակրի աղի 3-5% պարունակությանը և ցուցաբերել են օպտիմալ աճ 0-3% NaCl պարունակող սննդամիջավայրում:

Աղյուսակ 2. Ուսումնասիրված բակտերիաների որոշ ֆենոտիպական հատկանիշներ

Ֆենոտիպական հատկանիշ	Akhourik 106	Akhourik 107	Tatev 65-1	Tatev 65-2	Tatev 65-3	Tatev 65-4	Karvachar QV-1	Karvachar QB-80-2	Karvachar QS-1
Բջջի չափսը (մկմ) րախոթյուն երկարություն	1.5-2.0 4.0-5.0	1.0-2.0 4.0-5.0	1.3-1.7 4.0-4.78	1.2-1.5 4.6-7.82	1.0-1.5 3.0-3.9	1.2 4.25	1.0 3.1	1.0 1.8	0.5-0.6 5-6
Էնդոսպոր ձև տեղադրությունը	Էլիպտիդ կենտրոնական	Էլիպտիդ կենտրոնական	Էլիպտիդ բևեռային	Էլիպտիդ բևեռային	Էլիպտիդ բևեռային	Էլիպտիդ բևեռային	Էլիպտիդ բևեռային	Էլիպտիդ բևեռային	Էլիպտիդ բևեռային
սպորների ուռչեցում	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ֆոգես-Պրոսկաուերի թեսթ	-	+	-	-	-	-	-	-	-
նիտրատների նիտրիտների վերականգնում	-	+	+	+	+	+	+	-	+
օսլայի նիտրոլիզ	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Ցիտրատների օգտագործում	-	-	-	-	-	+	-	-	-
դիհիդրոքսիացետոնի առաջացում	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Akhourik 107 շտամը ցույց է տվել դրական արժեք ըստ Ֆոգես - Պրոսկաուերի թեստի, մինչդեռ մյուսներն ընդունակ չեն առաջացնելու ազոտիլմեթիլկարբինոլ (աղյուսակ 2): Akhourik 107, Tatev 65-1, Tatev 65-2 և Tatev 65-3 շտամներն առաջացրել են դիհիդրոքսիացետոն և կատարել են նիտրատների ռեդուկցիա մինչև նիտրիտների: Մեկուսացված բակտերիաները (բացառությամբ

Tatev 65-1, Tatev 65-2 և Tatev 65-4 շտամներից) կատարել են օւլայի և ժելատինի հիդրոլիզ, Tatev 65-4 բակտերիաներն ի վիճակի են եղել օգտագործել ցիտրատը որպես ածխածնի աղբյուր: Մեկուսացված շտամների ֆենոտիպական հատկանիշները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում:

Մեկուսացված բակտերիաների ձևաբանական, կենսաքիմիական և ֆիզիոլոգիական բութագրերը ցույց են տվել դրանց նմանությունը *Bacillus*, *Anoxybacillus* և *Geobacillus* հարակից ցեղերին:

Հետագա մոլեկուլային նույնականացման մեթոդներով կատարված ուսումնասիրությունները (օգտագործելով 16S *r*-ԴՆԹ սեքվենավորման մեթոդը) թույլ են տվել վերականգնելու ուսումնասիրված բացիլների ֆիլոգենետիկ ծառերը և բացահայտել մեկը մյուսի հանդեպ նմանությունը:

Լիպազ արտադրիչ բակտերիաների ֆիլոգենետիկական վերլուծությունը

Մեկուսացված բակտերիաներն ավելի խորը ուսումնասիրության համար կատարվել է գենոմային ԴՆԹ-ի անջատում և դրա հիմքով 16S *r*-ԴՆԹ-ն ամպլիֆիկացում օգտագործելով 16SF և 16SR փրայմերների զույգը: 16S *r*-ԴՆԹ-ի ամբողջականին մոտ հաջորդականությունները համադրվել են GenBank-ում գետեղված 16S *r*-ԴՆԹ հաջորդականությունների հետ՝ օգտագործելով NCBI BLASTn առցանց ծրագիրը: Մեկուսացված բակտերիաների BLAST վերլուծության արդյունքները, ըստ ամենամոտ ազգականների, ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

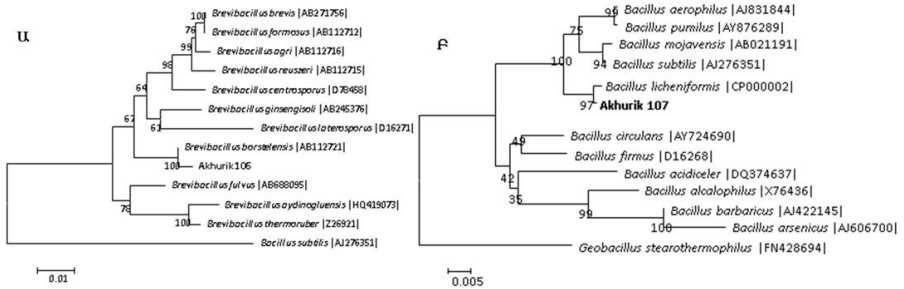
Աղյուսակ 3. Շտամների մոտ ազգականությանը ըստ 16S *r*-ԴՆԹ-ի աջորդականությունների BLAST համեմատականությանը GenBank տվյալների բազայի հետ:

Վուլտորաներ	16S <i>r</i> -ԴՆԹ-ի Հաջորդական- ույան երկարություն (bp)	Ամենամոտ ծագումնաբանական նմանակը	Նմանու- թյունը (%)
Akhourik 106	1451	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain AK2 [KC503891]	99
Akhourik 107	944	<i>Bacillus licheniformis</i> strain HT-Z71-B2 [KJ526873]	99
Tatev 65-1	1475	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 [CP001638]	99
Tatev 65-2	1480	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 [DQ642093]	99
Tatev 65-3	1477	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 [CP001638]	99
Tatev 65-4	920	<i>Uncultured compost bacterium</i> clone: 2123C1 AB555721	99
Karvachar QS-1	1453	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain AK1 [KC503890]	99
Karvachar QV-1	839	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain AK1 [KC503890]	98
Karvachar QB-2	1443	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain AK1 [KC503890]	99

16S *r*-ԴՆԹ-ի հաջորդականությունների BLAST վերլուծությունը բացահայտել է Akhourik 106 շտամի մոտ ազգականությունը *Brevibacillus borstelensis*-ին (99%), Akhourik 107՝ *Bacillus licheniformis* (100%), Tatev 65-1, Tatev 65-2 և Tatev 65-3 մեկուսացված բակտերիաներին՝ *Geobacillus* sp. (99%), և Karvachar QS-1, Karvachar QV-1 ու Karvachar QB-2՝ *Anoxybacillus flavithermus* (98-99%)։ Tatev 65-4 16S *r*-ԴՆԹ-ի հաջորդականությունները ցույց են տվել, որ այն (99%, 920 bp) ազգական է *Bacteria* դոմենի չկուլտիվացվող ներկայացուցիչներից մեկին (Uncultured compost bacterium clone: 2123C1 |AB555721|), չնայած այն բանի, որ այն 99%-ից քիչ նման է *Geobacillus*

sp. C170 [FJ848022] շտամին: Այս փաստը ցույց է տալիս, որ Tatev 65-4 շտամը հնարավոր է, որ լինի բակտերիայի նոր տեսակ: Շտամների ֆիլոգենետիկական (ծագումնաբանական) դիրքը պարզաբանելու համար կառուցվել են ֆիլոգենետիկական ծառեր օգտագործելով List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) առցանց համակարգում մուտքագրված տիպային տեսակների շտամների 16S rԴԼԹ-ի նուկլեինաթթվային հաջորդականությունները:

Akhurik 106 և Akhurik 107 շտամների և դրա տիպային շտամների ֆիլոգենետիկ ծառը ներկայացված է նկար 3-ում: Շտամների ծագումնաբանակն վորլուծությունը հաստատում է դրանց նմանությանը համապատասխանաբար *Brevibacillus borstelensis* և *Bacillus licheniformis* տեսակներին:



Նկար 4. Akhurik 106 (U) և 107 (F) շտամների ծագումնաբանական ծառերը ցույց են տալիս շտամների դիրքը տիպային տեսակների նկատմամբ:

Ծառերը կառուցվել են օգտագործելով նմանությամբ համապատասխանեցման սկզբունքը՝ օգտվելով MEGA 6.06 համակարգչային ծրագրից: **U** . Մասշտաբը համապատասխանում է 1, **F** . 0.5 նուկլեոտիդային փոփոխությանը յուրաքանչյուր 100 նուկլեոտիդներում:

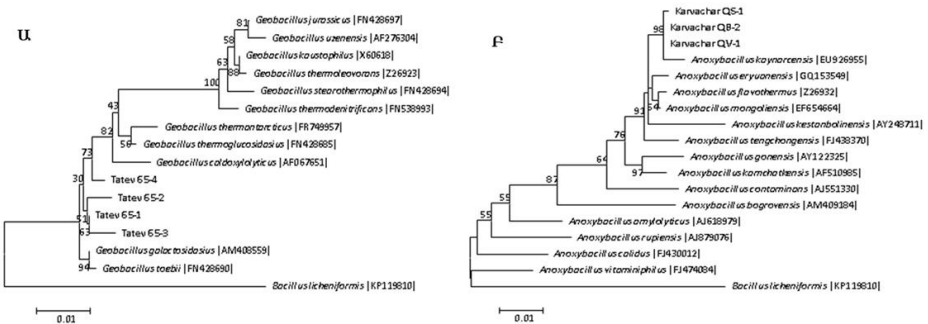
BLAST վերլուծությունը ցույց տվեց Տաթևի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված շտամների նմանությունը *Geobacillus* ցեղին, սակայն ծագումնաբանական ծառում դրանք ունեն տարբեր դիրքեր (նկար 5): *Geobacillus* sp. Tatev 65-4 շտամը իր տեղադրությամբ մոտ է գտնվում *Geobacillus caldoolyolyticus* [AF067651], սակայն վերջինիս հետ նմանությունը կազմում է 73 %:

Ակնհայտ է, որ Tatev 65-1, Tatev 65-2, Tatev 65-3 և Tatev 65-4 շտամների հեռավոր տեղադրվածությունը ծագումնաբանական ծառում ենթադրում է Տաթևի երկրաջերմային աղբյուրում նոր լիպագ արտադրիչ բացիլների առկայությունը:

Ծագումնաբանական ծառը երևան է բերում փաստեր, որոնք BLAST վերլուծության արդյունքներն ստանալուց հետո տեսանելի չեին: Չնայած այն բանի, որ BLAST արդյունքները ցույց էին տվել, որ QS-1, QV-1 և QB-2 կուլտուրաները 98-99% նման են *Anoxybacillus flavithermus* AK1 շտամին, *Anoxybacillus* ցեղի տեսակների տիպային շտամների հետ նմանությամբ համապատասխանեցման մեթոդը ցույց տվեց Karvachar QB-2, Karvachar QS-1 և Karvachar QV-1 մեկուսացված բակտերիաների նմանությունը *Anoxybacillus kaynarcensis* [EU926955] (նկար 5):

Karvachar QS-1 շտամը ծառում հարաբերականորեն ավելի հեռու է տեղակայված մյուս Karvachar QB-2 և Karvachar QV-1 շտամներից, ինչը վկայում է դրանց միջև առկա տարբերությունների մասին: Արդյունքները ցույց են տալիս

նաև, որ Karvachar QB-2 և Karvachar QV-1 մինևնայն շտամն են, սակայն դրանք, ինչպես նաև Karvachar QS-1 կուլտուրան կարող են լինել *Anoxybacillus* ցեղի նոր տեսակներ կամ ենթատեսակներ:



Սկայր 5. Tatev 65-1, Tatev 65-2, Tatev 65-3, Tatev 65-4 (U) և QB-2, QS-1, QV-1 (F) շտամների ծագումնաբանական ծառերը ցույց են տալիս շտամների դիրքը տիպային տեսակների նկատմամբ:

Մասշտաբը համապատասխանում է 1 նուկլեոտիդային փոփոխությանը յուրաքանչյուր 100 նուկլեոտիտներում:

Ներկայումս ջերմասեր, սպորառաջացնող աերոբ բակտերիաներն դասվում են մեկ դասի և յոթ ցեղերի՝ ներառելով ջերմասեր բացիլների մեծ մասը, այդ թվում *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus* և *Brevibacillus*, որոնք հայտնաբերվել են Հայաստանյան և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներում:

Մի շարք ջերմասեր բացիլներ, որոնք պատկանում են *Bacillus*, *Geobacillus* և *Anoxybacillus* ցեղերին, մեկուսացվել են տարբեր ջերմային աղբյուրներից և ներկայացվել են՝ որպես լիպազ արտադրիչներ: Նախկինում կատարված հետազոտություններից մեկում *Bacillus thermoamylovorans* CH6B լիպոլիտիկ ֆերմենտ արտադրող ջերմասեր մանրէն մեկուսացվել է Գալիցիայում (Հյուսիսարևմտյան Իսպանիա) գտնվող ջերմային աղբյուրից: Օլունեսան և ուրիշները մեկուսացրել են *Anoxybacillus kamchatkensis* շտամ KW 12 Մալազիայի ջերմային աղբյուրներից մեկից և բնութագրել է այն որպես ակտիվ լիպազ արտադրիչ: Ըստ հայտնի տվյալների և կատարված ուսումնասիրությունների բացիլների վերոհիշյալ ցեղերը տաք աղբյուրներում հանդիպող լիպազ արտադրիչ գերակշռող բակտերիաների խմբերն են: Ինչը վկայում է, որ *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* և *Geobacillus* ցեղերի տեսակները, որպես արտադրական լիպազներ աղբյուրներ, դեռ ուսումնասիրությունների կարիք ունեն:

Այս ուսումնասիրության արդյունքները հստակ ցույց են տալիս Հայաստանի Հանրապետության և Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության տարածքում գտնվող երկրաջերմային աղբյուրներից անջատված մանրէային համակեցությունների կառուցվածքի հետագա ուսումնասիրության կարևորությունը՝ բացահայտելու համար նոր լիպազ արտադրիչ ջերմասեր բակտերիաներ:

pH և ջերմաստիճանի ազդեցությունները բացիլների կողմից լիպագի արտադրության վրա

Մանրէների կողմից ֆերմենտների արտադրությունը կախված է միջավայրի ֆիզիկաքիմիական բնութագրիչներից, ինչպես օրինակ pH-ի և ջերմաստիճանի արժեքներից: Սննդամիջավայրի pH-ը շատ կարևոր դեր է խաղում մանրէների բնական կենսագործունեության, տարբեր սննդանյութերի թաղանթային տեղափոխման, մանրէների կողմից ֆերմենտների արտազատման և գործունեության վրա: Ուսումնասիրվող բացիլների կողմից լիպագային ֆերմենտներ արտադրելու օպտիմալ pH-ի արժեքները բացահայտելու համար վերջիններս աճեցվել են pH 4.0-11 արժեքներ ունեցող լիպագի արտադրությունը խթանող սննդամիջավայրում մանրէների աճի համար օպտիմալ ջերմաստիճաններում: Արդյունքները վկայում են, որ շտամները ունակ են արտադրելու լիպագներ սննդամիջավայրի բավականին լայն թթվահիմնային պայմաններում (5.0 - 11): Ստացված արդյունքները ամփոփված են աղյուսակ 4-ում:

Աղյուսակ 4. Ուսումնասիրված բացիլների լիպագների արտադրության մակարդակները տարբեր pH-ի արժեքների դեպքում արտահայտված լիպագի արտադրության ինդեքսի (ԼԱԻ) արժեքներով:

Շտամ	pH								
	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>B. licheniformis</i> Akhurik 107	-*	-	1.1	1.4	1.2	1.1	-	-	
<i>B. borstelensis</i> Akhurik 106	-	-	1.1	1.5	1.48	1.3	1.1	-	
<i>Geobacillus</i> sp. T-65-1	-	-	1.2	1.4	1.6	1.2	-	-	
<i>Geobacillus</i> sp. T-65-2	-	-	1.1	1.2	1.1	-	-	-	
<i>Geobacillus</i> sp. T-65-3	-	1.1	1.3	-	-	-	-	-	
<i>Geobacillus</i> sp. T-65-4	-	1.2	1.5	1.3	-	-	-	-	
<i>Anoxybacillus</i> sp. QS-1	-	-	-	-	1.1	1.1	1.2	1.1	
<i>Anoxybacillus</i> sp. QV-1	-	-	-	-	1.1	1.2	1.3	-	
<i>Anoxybacillus</i> sp. QB-2	-	-	-	-	-	1.2	1.5	1.3	

* “-“ համապատասխանում է ԼԱԻ 1 արժեքին:

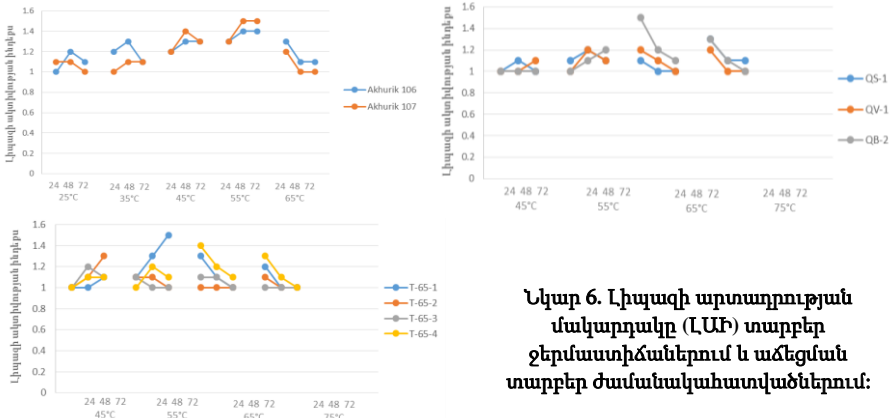
B. licheniformis Akhurik 107 շտամի լիպագների առավելագույն արտադրությունը (ԼԱԻ 1.5) դիտվում է pH 7.0 արժեքում: *B. borstelensis* Akhurik 106 շտամի լիպագների առավելագույն արտադրությունը (ԼԱԻ 1.5) դիտվում է pH 6.0 - 7.0 արժեքներում: *Geobacillus* sp. T-65-1 և *Geobacillus* sp. T-65-2 շտամների լիպագի արտադրության առավելագույն մակարդակը դիտվել է համապատասխանաբար pH 8 և 7 (ԼԱԻ 1.6 և 1.2) արժեքներում, *Geobacillus* sp. T-65-3 և *Geobacillus* sp. T-65-4 համար՝ pH 6 (ԼԱԻ 1.3 և 1.5, համապատասխանաբար): Քարվաճարի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2,

Anoxybacillus sp. Karvachar QS-1 և *Anoxybacillus* sp. Karvachar QV-1 շտամների լիպազային արտադրությունը դիտվել է հիմնային տիրույթում (pH 10):

Վիլերդինգը և ուրիջները 24 տարպեր բակտերիալ շտամների համար լիպազի առավելագույն արտադրությունը ցույց են տվել pH 8.0 և 30°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Ցույց է տրվել նաև *Bacillus* sp. J33, *B. megaterium* AKG-1 և *B. thermocatenulatus* DSM 730 շտամների լիպազի առավելագույն արտադրությունը համապատասխանաբար pH 8.0, 7.0-8.0 և 7.4 արժեքներում:

Գրականության հետ հետազոտությունների արդյունքում ստացված տվյալները համադրումից հետոնում է, որ ուսումնասիրված բացիլների կողմից արտադրվող լիպազները մնում են կայուն pH-ի լայն տիրույթում:

Լիպազի արտադրության մակարդակը նպաստավոր pH-ի պայմաններում տատանվում էր կախված ջերմաստիճանից և աճեցման ժամանակահատվածից: ԼԱԻ նվազագույն մակարդակը դիտվել է 25°C ջերմաստիճանում և 24 ժամ աճեցումից հետո: ԼԱԻ հասել է իր առավելագույն արժեքներին 55°C և 65°C ջերմաստիճաններում 48h ժամ աճեցումից հետո (նկար 6):



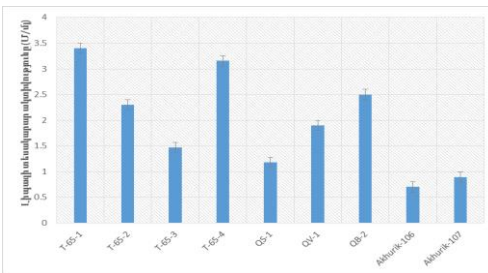
Նկար 6. Լիպազի արտադրության մակարդակը (ԼԱԻ) տարբեր ջերմաստիճաններում և աճեցման տարբեր ժամանակահատվածներում:

Սիդհուն և այլոք ցույց են տվել, որ Հնդկաստանում հողից մեկուսացված ջերմասեր *Bacillus* sp. RS-12-ի կողմից արտադրված ջերմակայուն լիպազի արտադրությունը կախված է աճեցման պայմաններից և իր առավելագույն արժեքին է հասնում 0.5% տվին 80 պարունակող սննդամիջավայրում ու 50°C ջերմաստիճանային պայմաններում աճեցման ընթացքում: Ինդոնեզիայի տաք աղբյուրներից մեկուսացված *B. thermoleovorans* ID-1 շտամը ցուցաբերել է առավելագույն արտաբջջային լիպազի արտադրություն 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Հետազոտության ընթացքում ուսումնասիրված բոլոր շտամների լիպազային ֆերմենտների արտադրությունը իր առավելագույն արժեքներին է հասնում բարձր ջերմաստիճանների պայմաններում (55°C բացիլների համար և 65°C անոքսիբացիլների և գերբացիլների համար):

Բացիլների լիպազային ակտիվության ուսումնասիրությունը pH-ի և ջերմաստիճանի տարբեր արժեքներում

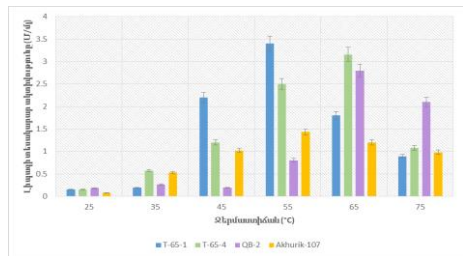
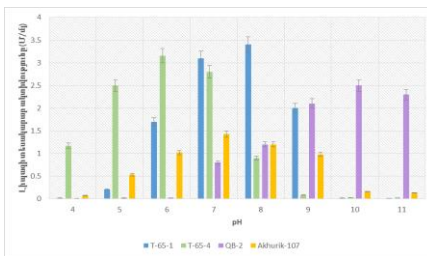
Շտամների լիպազային ակտիվությունը ուսումնասիրվել է դրանց կողմից ֆերմենտի արտադրության համար առավելագույն pH-ի և ջերմաստիճանի պայմաններում: Առավելագույն լիպազային ակտիվությունը դիտվել է *Geobacillus* sp. T-65-1 (3.4 Մ/մլ), *Geobacillus* sp. T-65-4 (3.156 Մ/մլ) և *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 (2.5 Մ/մլ) շտամների մոտ (նկար 7): Թեպետ *B. licheniformis* Akhurik 107 շտամը մյուս շտամների համեմատ ցուցաբերում է ցածր ակտիվություն (0.89 Մ/մլ), ընտրվել են հետագա ուսումնասիրությունների իրականացման համար՝ որպես *Bacillus* ցեղի ներկայացուցիչներ: Վերը նշված 3 առավել ակտիվ լիպազ արտադրիչների և *B. licheniformis* Akhurik 107 շտամի լիպազային ակտիվությունը օպտիմալացման համար ուսումնասիրվել է pH-ի և ջերմաստիճանի ազդեցությունը լիպազների ակտիվության վրա՝ գունաչափական եղանակով:



Նկար 7. Ուսումնասիրված շտամների լիպազների ակտիվությունները:

Չմաքրված լիպազի ակտիվությունը ուսումնասիրվել է pH-ի լայն սահմանում (5-10) և առավելագույն աճի համար անհրաժեշտ ջերմաստիճանային պայմաններում: Լիպազի ակտիվության ամենաբարձր մակարդակները (0.9 Մ/մլ) *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 համար գրանցվել է pH 7.0 արժեքում (նկար 8): *Geobacillus* sp. T-65-1 և *Geobacillus* sp. T-65-4 շտամների

առավելագույն ակտիվությունները՝ 3.4 և 3.2 Մ/մլ գրանցվել է համապատասխանաբար pH 8 և 6 արժեքներում, իսկ *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 շտամի 2.5 Մ/մլ առավելագույն ակտիվությունը՝ pH 10 արժեքում (նկար 8):



Նկար 8. Տարբեր pH-ի և ջերմաստիճանների արժեքների ազդեցությունը շտամների լիպազային ակտիվության վրա:

Տվյալ աշխատանքում ուսումնասիրված շտամներից ստացված չմաքրված լիպազների ակտիվության ուսումնասիրությունը pH-ի տարբեր տիրույթներում համեմատելով գրականության մեջ առկա տվյալների հետ կարող ենք փաստել, որ դրանք ունեն pH-ի լայն սահմաններում գործելու առավելություն:

Քանի որ մեկուսացված մանրէները ջերմասեր են, ենթադրելի է, որ նրանց արտադրած ֆերմենտները կայուն են և գործում են բարձր ջերմաստիճաններում, որտեղից իր հերթին հետևում է, որ ռեակցիայի արդյունավետությունը կարող է զգալիորեն աճել՝ ջերմաստիճանը բարձրացնելու դեպքում: Ջերմակայուն լիպազներ արտադրող մանրէների արտադրական հնարավորությունների ուսումնասիրման նպատակով որոշվել է ջերմաստիճանի տարբեր արժեքների դեպքում լիպազների առավելագույն ակտիվությունը: Արդյունքներից հետևում է, որ *B. licheniformis* Akhulik 107 շտամի համար ջերմաստիճանը, որում լիպազն ունի առավելագույն ակտիվություն նախապես որոշված օպտիմալ pH պայմաններում համընկնում է բակտերիայի աճի օպտիմալ ջերմաստիճանի հետ (նկար 8):

Այսպիսով, լիպազի առավելագույն ակտիվությունը դիտվում է 55°C ջերմաստիճանային պայմաններում, սակայն ֆերմենտը պահպանում է ակտիվությունը ջերմաստիճանային լայն սահմանում (25 - 65°C):

Geobacillus sp. T-65-1-ի և *Geobacillus* sp. T-65-4 շտամների չմաքրված ֆերմենտի առավելագույն ակտիվությունն դիտվել է համապատասխանաբար 55°C և 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում: *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2-ի շտամի չմաքրված ֆերմենտը առավելագույն ակտիվություն է դրսևորել 65°C ջերմաստիճանային և pH 10 պայմաններում: Արդյունքները վկայում են *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2-ի շտամի բազմաձայրահեղ (ջերմասեր և ալկալիաֆիլ) ֆերմենտի առկայության մասին, որը հեռանկարային է արտադրական, հատկապես դետերգենտների արտադրության առումով:

Լին և ուրիշները որոշել են *B. thermovorans* ID-1 օպտիմալ լիպազային ակտիվությունը pH 7.5 պայմաններում: *Bacillus* sp. J 33 կողմից արտադրվող ջերմակայուն լիպազը ուներ բարձր ակտիվություն pH 7.6 և 55°C պայմաններում: Համեմատականորեն ուշագրավ ջերմակայուն լիպազ է ստացվել Վանգի և այլոց կողմից *Bacillus* ցեղին պատկանող շտամի կողմից: Այս ֆերմենտն ուներ առավելագույն ակտիվություն 60°C ջերմաստիճանում: Սիդհուի և այլոց կողմից բացիլներից ստացված արտաբջջային լիպազը ուներ առավելագույն ակտիվություն 50°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Չիսը և այլոք հաղորդել են *A. flavithermus* շտամի մասին, որն ունակ էր արտադրելու լիպազ, որը պահպանում է իր ակտիվությունը մինչև 75°C ջերմաստիճանում և pH 9 պայմաններում, սակայն ակտիվության առավելագույն արժեքները գրանցվել են 60°C ջերմաստիճանային և pH 8 պայմաններում: Ի տարբերություն վերը նկարագրված շտամի, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 շտամը ցուցաբերել է լիպազային ակտիվություն ջերմաստիճանային լայն պայմաններում (50-75°C) և pH-ի չեզոքից հիմնային սահմաններում (7-11), այնժամ երբ օպտիմալ պայմանները առավելագույն ակտիվության համար եղել են 65°C և pH 10:

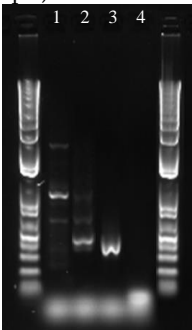
Դելվը և այլոք որոշել են *B. thermovorans* տեսակի առավելագույն լիպազային ակտիվությունը, որը համապատասխանում էր pH 7 և 50-55°C ջերմաստիճանային պայմաններին: *G. thermocatnrlatus* տեսակի մոտ նկարագրվել է լիպազ, որն ակտիվ է 55°C ջերմաստիճանային պայմաններում և հիմնային միջավայրում (pH 9-11): Ներկա աշխատանքում նկարագրված *Geobacillus* ցեղին

պատկանող շտամները, արտադրում են ջերմասեր լիպագներ, որոնք ակտիվ են և՛ թույլ հիմնային, և՛ թույլ թթվային pH-ի պայմաններում: Այսպես՝ *Geobacillus* sp. T-65-1 և *Geobacillus* sp. T-65-4 շտամների լիպագային ակտիվության օպտիմալ պայմանները գրանցվել են համապատասխանաբար pH 8, 55°C և pH 6, 65°C արժեքներում:

Արդյունքները փաստում են, որ ուսումնասիրված բացիլների շտամները կարող են կիրառվել կենսատեխնոլոգիայի և արտադրության մի շարք ոլորտներում՝ որպես լիպագ արտադրիչներ:

Լիպագների գեների հայտնաբերումը և դրանց նուկլեինաթթվային հաջորդականությունների հիման վրա սպիտակուցի կառուցվածքի մոդելավորումը

Ուսումնասիրվող բացիլների լիպագները կոդավորող գեների հայտնաբերման համար ստեղծվել են համապատասխան փրայմերների զույգ, որոնք օգտագործվել են ՊՇՌ ամպլիֆիկացման համար: Վերջինիս արդյունքում հայտնաբերվել են 1100 ն.գ., 700 ն.գ. և 600 ն.գ. մեծություն ունեցող ամպլիկոններ համապատասխանաբար *Geobacillus* sp. T-4 (*lipG*), *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 (*lipA*) և *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 (*lipB*) շտամների համար (նկար 9):



Նկար 9. *Geobacillus* sp. T-4 (1), *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 (2) և *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 (3) շտամների լիպագային գեների դեղադրությունը ազարոգային հելում:

4- բացասական ստուգիչ:

ՊՇՌ ամպլիֆիկացման միջոցով ստացված ամպլիկոնները սեքվենավորվել են, իսկ նուկլեինաթթվային հաջորդականությունները վերծանվել BLAST վերլուծությամբ: Արդյունքները ամփոփված են աղյուսակ 5-ում:

Anoxybacillus sp. Karvachar QB-2 (*lipA*) լիպագային գենի նուկլեինաթթվային հաջորդականությունը համընկնում էր *Anoxybacillus flavithermus* WK1 լիպագային գենի [CP000922] հաջորդականության հետ 88%, ինչը վկայում է դրանց միջև սպիտակուցի կառուցվածքային տարբերության մասին: *Geobacillus* sp. T-4 (*lipG*) լիպագային գենի նուկլեինաթթվային հաջորդականությունը տարբերվում է մյուս ուսումնասիրված շտամների գենային հաջորդականությունից ԳՑ-ի բարձր պարունակությամբ (56%): Վերջինս ԳՑ-ի պարունակությամբ տարբերվում է նաև 75°C ջերմաստիճանային պայմաններում բարձր ակտիվություն դրսևորող *Bacillus thermoleovorans* ID-1 շտամից (54%):

Փորձի արդյունքները հուշում են, որ *Geobacillus* sp. T-4 շտամի մաքրված լիպազը կարող է ունենալ ակտիվություն 70°C բարձր ջերմաստիճանային պայմաններում:

Աղյուսակ 5. Ուսումնասիրվող շտամների լիպազային գեների նուկլեինաթթվային հաջորդականությունների BLAST վերլուծությունը:

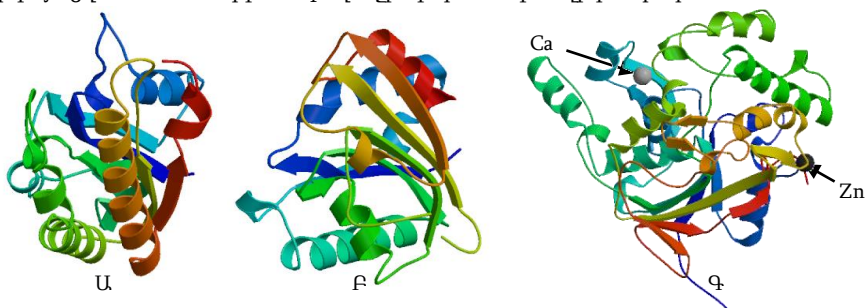
Գենի անվանումը	Հաջորդականության երկարությունը (նգ)	Ամենամոտ ծագումնաբանական նմանակը	Լճանությունը (%)	ԳՑ (%)
LipA	752	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1 լիպազ [CP000922]	88	49.7
LipB	605	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 լիպազ [CP000002]	99	45
LipG	1167	<i>Geobacillus</i> sp. HH01 լիպազ lipA [JQ360624]	99	56

Ուսումնասիրվող շտամների լիպազների կառուցվածքը պարզաբանելու նպատակով կառուցվել են դրանց երկրորդային և երրորդային կառուցվածքները PSIPRED և SWISS-MODEL առցանց ծրագրերի միջոցով: *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 շտամի լիպազը կազմված է 254 ամինաթթվային հաջորդականություններից, որոնք ձևավորում են 7 պարույրներից (helix) և 13 գալարներից (coil) (հավելված 2):

Bacillus licheniformis Akhurik 107 շտամի լիպազը ունի համեմատաբար ավելի կարճ ամինաթթվային երկարություն (207) և կազմված է 5 պարույրներից և 12 գալարներից (հավելված 3):

Նուկլեինաթթվային, հետևաբար և ամինաթթվային հաջորդականության երկարությամբ առանձնանում է *Geobacillus* sp. T-4 շտամի լիպազը (387): Այն բաղկացած է 10 պարույրներից և 19 գալարներից (հավելված 4):

Տարբեր ցեղերին պատկանող շտամների լիպազների կառուցվածքային տարբերությունների առավել խորը ուսումնասիրության համար կանխատեսվել են վերջիններից սպիտակուցի երրորդային կառուցվածքները: Ըստ կառուցվածքի *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 շտամի լիպազն իր երրորդային կառուցվածքով նման է ֆոսֆոլիպազ A1-ի (20.12%) կառուցվածքին (նկար 10 Ա): Սպիտակուցը ներկայացված է մոնոմերի տեսքով և չի պարունակում լիգանդներ:



Նկար 10. *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 (Ա), *B. licheniformis* Akhurik 107 (Բ) և *Geobacillus* sp. T-4 (Գ) շտամների լիպազի երրորդային կառուցվածքը կանխատեսված SWISS-MODEL առցանց ծրագրերով:

B. licheniformis Akhurik 107 շտամի լիպազը իր երրորդային կառուցվածքով նման է *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 շտամի լիպազին: Այն ներկայացված է

մոնոմերի տեսքով և չի պարունակում լիզանդներ, սակայն տարբերվում է գալարների տեղադրությամբ (նկար 10 Բ): Վերջինիս կառուցվածքը համընկնում է GDSL ընտանիքի լիպազ estA-ի հետ (71.52%):

Իր երոբրդային կառուցվածքով առանձնանում է *Geobacillus* sp. T-4 շտամի լիպազը: Այն 97.55% -ով համընկնում է Lip 1 լիպազի հետ և ներկայացված է Ca^{2+} և Zn^{2+} լիզանդներ պարունակող մոնոմերով (նկար 10 Գ):

Geobacillus sp. T-4 շտամի լիպազի կանխատեսված կառուցվածքը նման է լավ բնութագրված *Geobacillus thermocatenulatus* տեսակի լիպազին: Վերջինս ևս պարունակում է Ca^{2+} և Zn^{2+} լիզանդներ, ինչպես նաև պարունակում է $\alpha 6$ - և $\alpha 7$ -պարույրներ: Շտամի լիպազային առավելագույն ակտիվությունը դրսևորվում է 60–75°C և pH 8.0–10 պայմաններում: Կարբասկո-Լոպեզը և այլոք ցույց են տվել բարձր ջերմաստիճաններում Zn^{2+} իոնների կողմից ֆերմենտի կայունացնող ազդեցությունը, ինչը բնութագրական է նաև *Geobacillus* sp. T-4 շտամի լիպազին:

Zn^{2+} -ի իոններ հայտնաբերվել են նաև *Staphylococcus xylosus* լիպազի կառուցվածքում (SXL), որոնք ապահովում են լիպազի ստաբիլությունը բարձր ջերմաստիճաններում (60-70°C): *Geobacillus* sp. T-4 շտամի չմաքրված լիպազը իր ակտիվությունն էր դրսևորում ջերմաստիճանային ավել լայն տիրույթում 45 –75 °C և pH 7.0–9.0 պայմաններում:

Այսպիսով. Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացված *Anoxybaillus*, *Bacillus* և *Geobacillus* ցեղերին պատկանող լիպազ արտադրիչ շտամները իրենց լիպազային ֆերմենտի կառուցվածքով տարբերվում են ներկայումս նկարագրված լիպազներից և պահանջում են հետագա ավելի խորը ուսումնասիրություն: Հատկանշական է *Geobacillus* sp. T-4 շտամի լիպազը, իր կառուցվածքում լիզանդների պարունակությամբ, որոնցից Ca^{2+} իոնները հանդես են գալիս որպես խթանիչներ, իսկ Zn^{2+} իոնները՝ կայունացուցիչներ:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրների ջերմասեր ակտիվ լիպազ արտադրիչ էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաները հիմնականում ներկայացված են *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* և *Geobacillus* ցեղերով:

2. Առավելագույն լիպազային ակտիվությունը դիտվել է *Geobacillus* sp. T-65-1 (3.4 Մ/մլ), *Geobacillus* sp. T-65-4 (3.156 Մ/մլ) և *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 (2.5 Մ/մլ) շտամների մոտ:

3. *Geobacillus* sp. Tatev 1, Tatev 4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 և *B. licheniformis* 107 շտամների կողմից արտադրվող լիպազները կայուն են ջերմաստիճանային (45-75°C) և pH լայն տիրույթում (5-10):

4. *Geobacillus* sp. Tatev 1, Tatev 4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 և *B. licheniformis* 107 շտամների առավելագույն լիպազային ակտիվության ջերմաստիճանային օպտիմումը տատանվում է 55°C - 65°C, իսկ pH-ը՝ 6.0-8.0

Geobacillus sp. Tatev 1, Tatev 4 շտամների համար, 7.0 *B. licheniformis* 107 համար և 9.0-10 *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 համար:

5. Մոլեկուլային և կենսաինֆորմատիկ մեթոդների համադրմամբ ցույց է տրվել, որ *Geobacillus* sp. Tatev 4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 և *B. licheniformis* 107 ջերմասեր բացիլները արտադրում են են GDSL և Lip 1 ընտանիքներին պատկանող լիպազներ:

6. *Geobacillus* sp. Tatev 4 շտամի լիպազի կառուցվածքում առկա Ca^{2+} իոնները հանդես են գալիս որպես խթանիչներ, իսկ Zn^{2+} իոնները՝ բարձր ջերմաստիճաններում ֆերմենտի կառուցվածքի կայունացուցիչներ:

7. Ըստ ֆիլոգենետիկ վերլուծության Տաթևի և Քարվաճարի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացված *Geobacillus* sp. Tatev 1, Tatev 2, Tatev 3 և Tatev 4, ինչպես նաև *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2, QV-1 և QS-1 շտամները կարող են լինել նոր տեսակներ կամ ենթատեսակներ:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

1. **G. Shahinyan**, H. Panosyan, A. Trchounian (2014) Optimization of lipase production from thermophilic bacilli isolated from a geothermal spring. Book of abstracts, FEBS Young Scientists Forum. Paris, France, p. 55
2. **G. Shahinyan**, H. Panosyan, A. Trchounian (2014) Production of thermostable lipases by thermophilic bacilli. The FEBS Journal, special Issue: FEBS EMBO 2014 Congress, Volume 281, Issue Supplement s1, Paris, France, p. 668
3. **Shahinyan G.**, Panosyan H., Trchounian A. (2014) Searching for thermostable lipase producing bacilli and the optimization of lipase their production. Book of abstracts, International Scientific Workshop on “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”. Yerevan, Armenia, p. 88
4. **Shahinyan G.S.**, Panosyan H.H., Trchounian A.H. (2015) Characterization of Lipase Producing Thermophilic Bacilli Isolated from Armenian Geothermal Springs. Reports NAS RA, Volume 115, Issue 1, Yerevan, Armenia, pp. 59-68
5. **Shahinyan G.S.** (2015) New lipase producing bacilli strains isolated from geothermal springs of Armenia and Nagorno-Karabakh. The 19th International Pushchino school conference of young scientists “Biology – The Science of The XXI Century”, Pushchino, p. 153
6. **G. S. Shahinyan**, A. A. Margaryan, H. H. Panosyan, A. H. Trchounian (2015) Isolation and characterization of lipase-producing thermophilic bacilli from geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh. Biological Journal of Armenia, Vol 67, N 2, pp. 6-15.
7. **Shahinyan G.** (2015) Temperature and pH effect on lipase production and enzymatic activity of thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. Scientific Medical Journal, Vol. 10, Issue 1, pp. 9-15.

ЛИПАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АЭРОБНЫХ, ЭНДОСПОРОБРАЗУЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ
ИСТОЧНИКОВ АРМЕНИИ И ПОТЕНЦИАЛ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: геотермальные источники, термофильные бациллы, липазная активность, молекулярное моделирование.

Липазы (ЕС 3.1.1.3) катализируют гидролиз ациль-глицерольных длинных цепей, широко распространены в природе и встречаются в растениях, животных и микроорганизмах. Бациллярные липазы легко производимы, проявляют высокую толерантность к органическим растворителям и широко используются в синтезе сложных эфиров для пищевой промышленности, косметики и в производстве биодизельного топлива. Многие из них сохраняют свою активность при экстремальных температурах и рН, и, следовательно, могут быть включены в состав детергентов. Термостабильные ферменты способны выдерживать высокую температуру, таким образом, удлинять время биокатализа, что делает их предпочтительными по сравнению с мезофильными аналогами. В настоящее время исследования и характеристика новых продуцентов более термостабильных липаз из геотермальных сред, таких как горячие источники, являются перспективным с целью удовлетворения нужд в термозимах.

Целью представленной работы является скрининг и идентификация активных продуцентов липаз среди штаммов термофильных бацилл, выделенных из различных геотермальных источников Армении, оценка влияния температуры и рН на производство и активность липаз, а также изучение генов кодирующих липаз и моделирование структуры белка фермента.

В поисках новых и перспективных продуцентов внеклеточных термостабильных липаз, была выделена 31 бактериальная культура из геотермальных источников Ахурик, Татев (Армения) и Карвачар (Нагорный Карабах). Из изолятов, а также 72 бактериальных культур, отобранных из коллекции культур Кафедры микробиологии, биотехнологии растений и микроорганизмов, были выбраны 9 липаз-активные бациллы и идентифицированы как представители

родов *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* и *Geobacillus* по фенотипическим признакам и анализа последовательностей гена 16S рРНК.

Оптимальные значения pH и температуры продукции липаз для штаммов *Bacillus*, *Brevibacillus* и *Geobacillus* были соответственно 6-7 и 55-65°C, а для штаммов *Anoxybacillus* - 9-10 и 55°C. Индекс липазной активности (ИЛА) использован для определения уровня производства липаз. Максимальное значение ИЛА для штаммов *B. borstelensis* Akhurik 106, *Geobacillus* sp. T-65-4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 составляло 1.5, а для штамма *Geobacillus* sp. T-65-1 - 1.6. Предварительное изучение активности неочищенной липазы штаммов проводили в различных pH (5-11) и температурных условиях (25-75°C). Липолитическую активность определяли спектрофотометрически, используя в качестве субстрата p-нитрофенил пальмитат. Высокая липазная активность (0.89 Ед/мл) штамма *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 наблюдалась при pH 6-7 и температуре 55°C. Штаммы *Geobacillus* sp. показали высокую активность (1.5-3.4 Ед/мл) при pH 6-7 и температуре 65°C. Сырой фермент, полученный из штамма *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB2 оказался мультитермофильным, так как он проявлял активность (1.2-1.9 Ед/мл) при температурах, как правило, оптимальных для термофилов (65°C) и pH оптимальных для алкалифилов (10-11).

Гены, кодирующие липаз активных штамм-продуцентов, были определены с использованием сконструированных праймеров. ПЦР-амплификация у *Geobacillus* sp. T-4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 и *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 штаммов выявила наличие генов величиной в 1100 п.о., 700 п.о. и 600 п.о., соответственно. Нуклеотидные последовательности генов липаз были использованы для моделирования первичной и вторичной структуры фермента с помощью методов биоинформатики. Было показано, что структуры белка липаз *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 и *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 похожи друг на друга, а также - на фосфолипазу A1 (20.12%) и липазу GDSL estA (71.52%), соответственно. Структура белка липазы *Geobacillus* sp. T-65-4 на 97.55% похожа на Lip 1 липазу и содержит лиганды Ca²⁺ и Zn²⁺, которые стабилизируют молекулярную структуру фермента, а также способствуют активации фермента.

Все активные продуценты липаз сохраняются на Кафедре микробиологии и биотехнологии (ЕГУ) и будут служить перспективными источниками термозимов для различных биотехнологических приложений в промышленности.

THE LIPASE ACTIVITY OF AEOROBIC, ENDOSPORE FORMING MICROBS
ISOLATED FROM ARMENIAN GEOTHERMAL SPRINGS AND
THE PROSPECT OF THEIR APPLICATIONS

SUMMARY

Key words: geothermal springs, thermophilic bacilli, lipase activity, molecular modelling.

Lipases (E.C. 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of acyl-glycerol long chains. They are widely present in nature and are found in plants, animals and microorganisms. Lipases from bacilli are easily produced and display high tolerance toward organic solvents, proving them useful in the synthesis of esters for food industry, cosmetics and biodiesel production. Many of them preserve their activity at extreme temperatures and pH, and therefore they can be applied in laundry formulations. Thermostable enzymes are able to brave high temperature, thus endow longer half-life to the biocatalyst and make them a preferred choice over mesophilic sources. Nowadays, the study and characterization of new more thermostable lipase producers from high temperature environments such as hot springs is required in order to satisfy the need for thermozyemes.

The aim of the presented work was the screening active lipase producers among the thermophilic bacilli strains isolated from different geothermal springs of Armenia, their identification, the estimation of the effects of temperature and pH on their lipase production and activity as well as study of lipase encoding genes and modelling of the lipase protein structure.

In quest for new and prospective extracellular thermostable lipase producers, 31 bacterial cultures were isolated from Akhurik, Tatev (Armenia) and Karvachar (Nagorno-Karabakh) geothermal springs. Out of all isolates and 72 bacterial cultures chosen from the culture collection of Department of Microbiology, Biotechnology of Plants and Microorganisms, 9 lipase active bacilli were selected and identified as representatives of *Anoxybacillus*, *Bacillus*,

Brevibacillus and *Geobacillus* genera based on phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequencing.

The optimal conditions for lipase production by the strains was found to be pH 6-7, 55-65°C for *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Geobacillus* strain, pH 9-10 and 55°C for *Anoxybacillus* strains. Lipase activity index (LAI) served as a criterion for lipase production levels. The maximal LAI levels were found to be 1.5 for *B. borstelensis* Akhurik 106, *Geobacillus* sp. T-65-4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 and 1.6 for *Geobacillus* sp. T-65-1. The preliminary characterization of the activity of crude lipase of the strains was carried out in different pH (5-11) and temperatures (25-75°C). Lipolytic activity was determined spectrophotometrically using p-nitrophenyl palmitate as substrate. The highest lipase activity (0.89 U/ml) of *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 strain was observed at pH 6-7 and 55°C temperature. *Geobacillus* sp. strains showed high lipolytic activity (1.5-3.4 U/ml) at pH 6-7 and 65°C. The crude enzyme obtained from *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB2 strain turned out to be multiextremozymes, since they had their highest activity (1.2-1.9 U/ml) at temperatures typically optimal for thermophiles and pH for alkaliphiles (pH 10-11, 65°C).

The lipase genes of the studied active lipase producers were identified by using designed primer sets. The PCR amplification revealed a presence of 1100 b.p., 700 b.p. and 600 b.p. sized genes in *Geobacillus* sp. T-4, *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 and *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 strains, correspondingly. Nucleotide sequences of lipase genes were used to build the primary and the secondary structures of the lipase proteins using bioinformatics tools. It was shown that lipase protein structure of *Anoxybacillus* sp. Karvachar QB-2 and *Bacillus licheniformis* Akhurik 107 strains are similar to each other and phospholipase A1- h (20.12%) and GDSL estA (71.52%) lipases, correspondingly. The lipase structure of *Geobacillus* sp. T-4 97.55% strains close to Lip 1 lipases and consist Ca^{2+} and Zn^{2+} ligands, which are shown to have strengthening function for the molecular structure also these ions contribute in lipase activity.

All lipase active strains are maintained at the Department of Microbiology and Biotechnology (YSU) and will serve as prospective sources of extremozymes for various biotechnological applications in industry.