

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ԱԳԱՆՑԱՆՑ ՀՈՎՍԵՓ ԱԼԵՔՍԱՆԴՐԻ

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԾԱԳՍԱՆ ՈՒԿՈՄՔԻՆԱՆՏ D-ՀԻԳԱՆՏՈՒՆԱԶՆԵՐ ԵՎ
L-ԱՄԻՆԱԱՑԻԼԱԶՆԵՐ. ՄՏԱՑՈՒՄԸ, ՄԱԶՐՈՒՄԸ ԵՎ ԿԵՆՍԱԶԻՄԻԱԿԱՆ
ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսությամբ

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան – 2013

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

АГАНЯНЦ ОВСЕП АЛЕКСАНДРОВИЧ

РЕКОМБИНАНТНЫЕ D-ГИДАНТОИНАЗЫ И L-АМИНОАЦИЛАЗЫ
БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И
БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

АВТОРЕФЕРАТ

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

Ереван – 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Ա.Ս. Հովսեփյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ քրոֆեսից անդամ, կ.գ.դ.,
պրոֆեսոր Ռ.Մ. Հարությունյան

կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիսթյանի անվան
կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2013 թ. հունիսի 19-ին, ժամը 16⁰⁰,
ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018
մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654183:

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

Սեղմագիրն առաքված է 2013 թ. մայիսի 18-ին:

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

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета НППЦ «Армбиотехнология» НАН
РА

Научный руководитель: к.б.н. А.С. Овсепян

Официальные оппоненты: член-корр. НАН РА, д.б.н.,
профессор Р.М. Арутюнян
д.б.н., профессор Г.Г. Оганесян

Ведущая организация: Институт биохимии
им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

Защита диссертации состоится 19 июня 2013 г. в 16⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НППЦ «Армбиотехнология»
НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410) 654183.

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

Автореферат разослан 18 мая 2013 г.

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В современной биотехнологии особое место занимает производство аминокислот и их производных, входящих в состав различных лекарственных препаратов, биологически активных добавок и других веществ.

Традиционно аминокислоты получают микробиологическим и химическим синтезом, гидролизом белков и путем биотрансформации. Биотрансформация позволяет получить аминокислоты, у которых из-за особенностей регуляции их метаболизма создание высокоактивных штаммов-продуцентов является трудно выполняемой задачей.

В биокаталитических системах важнейшая роль отводится ферментам-катализаторам. Несмотря на определенные успехи в достижении повышения выхода целевых ферментов, применением генетических и технологических подходов, стоимость ферментных препаратов остается высокой. В настоящее время биотехнологически важные ферментные препараты получают на основе рекомбинантных штаммов. Генно-инженерные технологии позволяют не только увеличить продуктивность штаммов-продуцентов, но и получать ферментные препараты с заданными свойствами. Для ряда ферментов на основе методологии генной инженерии созданы высокоактивные штаммы-продуценты, но высокая концентрация несекретлируемых ферментов в клетках рекомбинантных штаммов приводит к их агрегации и образованию так называемых «телец включения», что отражается на конечном выходе активных ферментов. Существующие методы растворения «телец включения» не обладают высокой результативностью.

Ферменты, полученные из термофильных микроорганизмов, удобны для использования в биотехнологических процессах. Известные природные штаммы-продуценты L-аминоацилазы и D-гидантоиназы характеризуются низкой активностью. У гипертермофильной *Pyrococcus furiosus* активность L-аминоацилазы составляет всего 0,34 Ед/мг [Sherry et al., 2001], а у *Bacillus circulans* уровень удельной активности – 0,1 Ед/мг [Luksa et al., 1997].

Для получения энантиомерно чистых аминокислот наиболее востребованными ферментными препаратами являются аминокацилазы и ферментативная пара гидантоиназа-карбамоилаза. Один и тот же катализатор, созданный на основе этих ферментов, можно применять в биокаталитических процессах получения различных продуктов – оптически активных L- и D-аминокислот и их производных.

Несмотря на имеющиеся успехи в создании активных штаммов-продуцентов, пока не решены все проблемы, необходимые для создания эффективных способов получения востребованных ферментных препаратов гидантоиназы и аминокацилазы.

При создании высокоактивных рекомбинантных штаммов-продуцентов крайне важным является выбор подходящего вектора и использование сильных промоторов для обеспечения высокой экспрессии генов, контролирующих биосинтез целевых ферментов. Поэтому для осуществления молекулярного клонирования генов, кодирующих синтез гидантоиназы и аминокацилазы, целесообразным является использование системы векторов рЕТ с сильным промотором бактериофага Т7 [Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Исходя из вышесказанного, конструирование рекомбинантных высокоактивных штаммов, продуцирующих D-гидантоиназу и L-аминоацилазу, разработка эффективных способов очистки, установление каталитически важных свойств указанных ферментов является актуальным.

Целью диссертационной работы является конструирование рекомбинантных штаммов, обладающих высокой D-гидантоиназной и L-аминоацилазной активностью, очистка, физико-химическая и каталитическая характеристики этих ферментов.

В соответствии с этим нами поставлены следующие задачи:

- сравнение аминокислотных последовательностей гидантоиназ различного происхождения;

- определение локализации гена *hyd* термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus*, кодирующего синтез фермента D-гидантоиназы;
- молекулярное клонирование гена *hyd* на векторе с сильным промотором бактериофага T7 и изучение экспрессии этого гена в гетерологичных клетках *Escherichia coli*;
- разработка эффективных способов растворения «телец включения» и очистки рекомбинантных белков;
- изучение биохимических характеристик термостабильной D-гидантоиназы;
- молекулярное клонирование гена *argE* *E. coli*, кодирующего синтез N-ацетилорнитиндеацетилазы на векторе с сильным промотором бактериофага T7 и экспрессия в клетках кишечной палочки;
- изучение биохимических характеристик ферментов рекомбинантных L-аминоацилаз мезофильной и термофильной природы;
- иммобилизация термостабильной рекомбинантной L-аминоацилазы.

Научная новизна. Осуществлено молекулярное клонирование гена *hyd* *G. stearothermophilus* на векторе с сильным промотором бактериофага T7 в клетках *E. coli*. Получен новый рекомбинантный высокоактивный штамм *E. coli* BL21 AS (pHYD) – продуцент D-гидантоиназы, превосходящий активность природного штамма на два порядка. Предложены эффективный подход растворения «телец включения» с использованием N-лауроил саркозината и схема очистки рекомбинантной термостабильной гидантоиназы.

Впервые показана хромосомная локализация гена *hyd* термофильных штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195. Выявлены 96 % идентичности последовательностей аминокислотных остатков гидантоиназ обоих штаммов и полная идентичность их каталитических центров. Проведенный сравнительный анализ гидантоиназ и дигидропиримидиназ различного происхождения позволил выявить консервативные участки у этих ферментов.

Сконструирован высокоактивный штамм-продуцент L-аминоацилазы молекулярным клонированием на векторе с сильным промотором бактериофага T7 гомологичного гена *argE* *E. coli*, кодирующего синтез N-ацетилорнитиндеацетилазы. Осуществлена иммобилизация термостабильной рекомбинантной L-аминоацилазы на пористом силикагеле, способствующая значительному повышению термостабильности фермента.

Практическая ценность. Получены новые рекомбинантные высокоактивные штаммы *E. coli*, продуцирующие D-гидантоиназу и L-аминоацилазу. Разработаны эффективный способ растворения «телец включения» и схема очистки рекомбинантных ферментов. Полученные рекомбинантные ферментные препараты отличаются термостабильностью, доступностью и дешевизной. Катализаторы, созданные на основе этих ферментов, можно применять в биокаталитических процессах для получения оптически активных L- и D-аминокислот и их производных.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Идентичность последовательностей аминокислотных остатков гидантоиназ штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195.
- Хромосомная локализация гена *hyd* термофильных штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195.
- Молекулярное клонирование гена *hyd* *G. stearothermophilus* на векторе с сильным промотором бактериофага T7 и его экспрессия в гетерологическом цитоплазматическом окружении. Рекомбинантный штамм *E. coli*, продуцирующий термостабильную D-гидантоиназу.
- Эффективный способ растворения «телец включения» и схема очистки рекомбинантной термостабильной D-гидантоиназы.

• Результаты физико-химических и каталитических характеристик рекомбинантной термостабильной D-гидантоиназы и субстратная специфичность термостабильной D-гидантоиназы.

• Сверхэкспрессия гена *argE*, клонированного под контролем сильного промотора бактериофага T7, приводящая к проявлению высокой L-аминоацилазной активности у *E. coli*.

• Результаты физико-химических и каталитических характеристик рекомбинантных L-аминоацилаз мезофильной и термофильной природы.

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена в рамках тематического финансирования № 11-2i381 «Получение штаммов, несущих рекомбинантные плазмиды, кодирующие индуцибельные D- и L-аминоацилазы, и характеристика соответствующих ферментов» в НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА (2011-2013 гг.) и в рамках проекта № 261793 “Collaborative Experimental Scholarship for Central & Eastern Europe” (Federation of European Biochemical Societies (FEBS)) в университете г. Нанта (Франция).

Личный вклад соискателя. Собственный вклад включает экспериментальную реализацию сформулированных задач, поиск и анализ научной литературы по теме, обобщение результатов исследований, оформление научных статей и диссертационной работы. Постановка основных задач, разработка методологии и результаты исследований прорабатывались под руководством к.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной биологии Овсепян А.С., иностранного члена НАН РА, профессора университета г. Нанта (Франция) Саканяна В.А. и к.б.н., заведующего лабораторией молекулярной биологии Амбарцумяна А.А.

Апробация работы. Материалы работы доложены на заседании ученого совета НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА; на международном конгрессе молодых ученых, Ереванский государственный медицинский университет, Ереван, РА, 2010 г.; на международном Научном Семинаре «Современное состояние биотехнологических разработок и пути коммерциализации», Ереван, РА, 2012 г.

Место выполнения работы. НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА и университет г. Нанта (Франция).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, а также из заключения, выводов, списка литературы, включающего 252 источника. Работа оформлена на русском языке, изложена на 132 страницах, иллюстрирована 47 рисунками и 15 таблицами.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 7 научных работах, в том числе 4 статьях, опубликованных в республиканской научной прессе.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе рассматриваются организация и регуляция генов, кодирующих ферменты, участвующие в расщеплении гидантоинов у различных микроорганизмов; рассмотрены ферменты семейства циклических амидогидролаз, в том числе структура гидантоиназ. Обобщены данные о природных продуцентах гидантоиназ и генно-инженерные подходы для создания продуцентов этого фермента, описаны также проблемы «гидантоиназного процесса» и карбамоилазы, также участвующие в этом процессе. Обобщено современное представление об аминокацилазах как животного, так и бактериального происхождения, приведены данные о природных и генно-инженерных штаммах-продуцентах L- и D-аминоацилаз, представлены данные о современных тенденциях в сфере получения иммобилизованных катализаторов на основе этих ферментов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные и полученные в работе, представлены в табл.1. Валидность таксонов использованных культур сверялась по Euzéby, 2011 [www.bacterio.cict.fr].

Таблица 1.

Характеристика использованных штаммов и плазмид.

Штамм/плаزمид	Генотип	Источник
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>	Novagen
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ(<i>mcrA</i>)183 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 Tet^r]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> INVαF'	F', <i>recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, relA1, Φ80lacZΔM15, ΔlacZYA-argF)U169</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XB25	F ⁻ <i>argB nalA λ⁻ λ^S hsdR</i>	НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА
<i>E. coli</i> XS1D2 <i>recA</i>	F ⁻ Δ(<i>ppc-argE</i>)101 <i>nalA rpoB λ⁻ hsdR recA</i>	НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 31783	Дикий тип	Получен из университета г. Нанта
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 31195	Дикий тип	Получен из университета г. Нанта
pET24a	<i>T7 pr, T7 term, lac op, lacI, fl ori, His-Tag C-terminal, MCS (XhoI – BamHI)</i> , Km ^r	Novagen
pET21d(+)	<i>T7lac, lacI, His-Tag C-terminal, T7-Tag N-terminal, MCS (BamHI – XhoI)</i> , Amp ^r	Novagen
pCR [®] II	<i>lacZα, M13 reverse and forward priming site, Sp6 promoter, T7 promoter</i> , Amp ^r , Km ^r	Invitrogen
Штаммы и плазмиды, полученные в настоящей работе		Коллекционный номер по ЦДМ*
<i>E. coli</i> BL21 AS (pHYD)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i> , Amp ^r	MDC11843
<i>E. coli</i> INV AS-1 (pHYDa)	F', <i>recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, relA1, Φ80lacZΔM15, ΔlacZYA-argF)U169</i> , Amp ^r , Km ^r	MDC11844
<i>E. coli</i> INV AS-2 (pHYDb)	F', <i>recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, relA1, Φ80lacZΔM15, ΔlacZYA-argF)U169</i> , Amp ^r , Km ^r	MDC11845
<i>E. coli</i> AOE (pAMAЕ)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i> , Km ^r	MDC11846
Плазмиды		
pHYD	Получен на основе pET21d(+), содержит ген <i>hyd G. stearothermophilus</i> , Amp ^r	—
pHYDa	Получен на основе pCR [®] II, содержит ген <i>hyd G. stearothermophilus</i> , Km ^r , Amp ^r	—
pHYDb	Получен на основе pCR [®] II, содержит ген <i>hyd G. stearothermophilus</i> , Km ^r , Amp ^r	—
pAMAЕ	Получен на основе pET24a, содержит ген <i>argE E. coli</i> , Km ^r	—

Примечание: * – Центр Депонирования Микробов (отделение НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).

Среды. В качестве полноценных сред использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), L-бульон (LB), 1,6 % мясо-пептонный агар (МПА), 1,6 % L-агар. В качестве минимальных сред использовали жидкие и агаризованные среды M9 [Миллер, 1976].

Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли по методу щелочного лизиса с некоторыми модификациями [Sambrook et al., 1989], а также с использованием QIAprep Spin Miniprep Kit согласно протоколу QIAGEN.

Выделение плазмидной ДНК из *G. stearothermophilus* осуществляли с использованием Nucleobond AX nucleic acid purification kit согласно протоколу Macherey-Nagel.

Выделение хромосомной ДНК из *E. coli* проводили согласно описанной методике, с некоторыми модификациями [Zhu et al., 1993].

Выделение хромосомной ДНК из *G. stearothermophilus* проводили согласно описанным методикам, с некоторыми модификациями [Saito, Miura, 1963, Zhu et al., 1993].

Электрофорез. Для анализа ДНК использовали 0,8-1 % агарозный гель, приготовленный на Tris-ацетатном буфере [Sambrook et al., 1989]. Гель окрашивали 0,01-0,05 % раствором бромистого этидия, анализировали под ультрафиолетовыми лучами.

Гель-электрофорез в пульсирующем поле (ГЭПП). Клетки *G. stearothermophilus* перемешивали с эквивалентным объемом 1,5% агарозы, обрабатывали лизоцимом и проназой согласно Daniel (1995). Образцы агарозы обрабатывали соответствующими рестриктазами. Электрофорез проводили в 1 % агарозном геле, приготовленном на TAFE буфере с промежутками пульсирования 20 сек.

Southern blotting и гибридизация. Тотальную и плазмидную ДНК разделяли с использованием обычного или ГЭПП электрофореза. Специфичная ДНК-проба была помечена random-primer методом [Feinberg and Vogelstein, 1983] с использованием диоксигенин 11-dUTP набора согласно протоколу [DIG DNA labeling kit, Boehringer Mannheim].

Полимеразная цепная реакция (PCR) проводилась на приборе «Gene Cycler» по протоколу фирмы «Invitrogen». Амплификацию осуществляли по программе: начальная денатурация в течение 5 мин при 94°C; 30 циклов: денатурация (30 сек при 94°C), «отжиг» (30 сек при 52°C), синтез (2 мин при 72°C); заключительный синтез (7 мин при 72°C). Амплификацию ДНК подтверждали электрофоретически.

Очистка PCR-фрагментов. Выделение и очистку полученных PCR-фрагментов из агарозного геля осуществляли по протоколу QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Рестрикцию проводили по протоколам производителей. Были использованы рестрикционные эндонуклеазы *NcoI/EcoRI* и *NheI/XhoI*, а также *SmaI*, *NotI*, *SfiI*.

Лигирование проводили с использованием Quick Ligation Kit, согласно протоколу фирмы «New England Biolabs».

Трансформацию клеток *E. coli* осуществляли по известному методу [Sambrook et al., 1989].

Сравнение аминокислотных последовательностей проведено по программе ClustalW [<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>]. Для BLAST-анализа аминокислотных последовательностей использовали сайт NIH USA [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>]. Построение филогенетических деревьев проведено инструментом COBALT [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>].

SDS-PAGE электрофорез проводили по модифицированной методике Sambrook и др. (1989) в 10 % SDS-полиакриламидном геле. SDS-PAGE электрофорез проводили также с использованием 4-16 % градиентного геля.

Диск-электрофорез проводили в 10 % полиакриламидном геле в системе буферов Лаемли [Pharmacia, Швеция].

Фильтрацию ферментативных препаратов проводили на микрофильтрах 30 кДа, 50 кДа и 100 кДа, согласно протоколу Amicon.

Очистку ферментативных препаратов проводили с использованием термообработки, ионообменных колонок, адсорбционной хроматографией, насыщением сульфатом аммония, гель-фильтрацией и микрофильтрацией.

Определение молекулярной массы L-аминоацилазы и N-ацетилорнитиндеацетилазы проводили гель-фильтрацией на колонке Sepharose CL6B (1,5x82см).

Определение аминоклазной активности проводили согласно описанной методике с некоторыми модификациями [Gade and Brown, 1981]. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса [Peterson, 1983].

Определение гидантоиназной активности проводили по модифицированной методике [Takahashi et al., 1978]. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса [Peterson, 1983].

Для определения температурного оптимума активности ферментных препаратов измеряли при различных температурах: свободная и иммобилизованная аминоклазы – при 25-80°C, N-ацетилорнитиндеацетилаза – при 30-65°C и гидантоиназа – при 30-80°C.

Для определения термостабильности свободные и иммобилизованные ферментные препараты инкубировали 20 мин при различных температурах: свободная и иммобилизованная аминоклазы – при 25-75°C, N-ацетилорнитиндеацетилаза – при 30-65°C и гидантоиназа – при 30-80°C, препараты охлаждали на ледяной бане и измеряли остаточную активность.

Для определения pH оптимумов ферментативные реакции проводили при следующих значениях pH: аминоклаза – при pH 6,0-9,5, N-ацетилорнитиндеацетилаза – при pH 5,3-10,15 и гидантоиназа – при pH 6,5-10,0 в соответствующих буферах. Необходимые значения pH доводились применением 5 М HCl или 5 М NaOH.

Определение изоэлектрической точки проводили методом изоэлектрофокусировки в 5 % полиакриламидном геле. Использовались 1,6 % амфолиты, из которых 75 % в диапазоне pH 4,0-6,0, а 25 % в диапазоне pH 3,5-9,0. Для получения изоэлектрической линейки использовали белки с известными изоэлектрическими точками.

Определение значения константы Михаэлиса (K_M) рассчитывалось методом многомерного линейного регрессионного анализа [Корниш-Боуден, 1979].

Иммобилизацию аминоклазы проводили на силихроме С-80 по описанной методике [Дюкова и др., 2011].

Статистический анализ. Статистические параметры (средняя величина, стандартное отклонение) были вычислены при помощи программы Excel. Статистически значимые различия были вычислены с использованием компьютерной программы Prism 3.03 (GraphPad Software, Inc., CA) и рассмотрены при помощи дисперсионного анализа (ANOVA); множественное сравнение было проделано с использованием теста Tukey (значения $p < 0,01$; $p < 0,05$ рассматривались как значимые различия).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. РЕКОМБИНАНТНАЯ D-ГИДАНТОИНАЗА: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТА

3.1.1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей гидантоиназ бактерий рода *Geobacillus*

Первым этапом настоящей работы являлось сравнение аминокислотных последовательностей гидантоиназ штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195. Выявлено, что аминокислотные последовательности гидантоиназ обоих штаммов содержат одинаковое количество аминокислотных остатков – 472, из которых 96 % идентичны. Первичные структуры названных ферментов отличаются в основном по С-терминальному участку.

Проведено также сравнение аминокислотных последовательностей гидантоиназ этих штаммов с последовательностями гидантоиназ как других представителей рода *Geobacillus*, так и штаммов, взятых из базы данных Non redundant protein sequences [www.ncbi.nlm.nih.gov]. С целью установления уровня схожести между гидантоиназами внутри рода *Geobacillus* проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных гидантоиназ этого рода с помощью метода ClustalW [http://www.genome.jp/tools/clustalw/].

Результаты проведенного сравнительного анализа показывают, что первичные последовательности гидантоиназ *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195 идентичны с последовательностью гидантоиназы *G. stearothermophilus* SD1 на 97 % и 96 %, с *G. stearothermophilus* NS2211A – на 95 % и 93 %, с *G. kaustophilus* HTA426 – на 95 % и 93 %, с *G. thermoleovorans* CCB US3 UF5 – на 95 % и 92 %, соответственно.

Таким образом, полученные данные показали высокую схожесть между аминокислотными последовательностями этих белков за исключением их С-терминальных участков.

Проведенный сравнительный анализ аминокислотных последовательностей 28 известных гидантоиназ различного происхождения с помощью метода ClustalW [http://www.genome.jp/tools/clustalw/] позволил установить консервативные регионы в этих последовательностях.

Методом COBALT построено филогенетическое древо этих ферментов. Показано, что гидантоиназы рода *Geobacillus* находятся в отдельной группе и родственны с другими гидантоиназами.

BLAST-анализ [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov] первичных структур гидантоиназ *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195 с гидантоиназами и дигидропиримидиназами (эти ферменты, как и гидантоиназы, также входят в состав семейства циклических амидогидролаз) различного происхождения выявил идентичность в пределах 49 % – 97 %. Результаты показали, что гидантоиназы выделяются в отдельную ветвь и филогенетически родственны с дигидропиримидиназами различного происхождения.

Исходя из высокой схожести аминокислотных последовательностей исследуемых нами гидантоиназ с D-гидантоиназой *G. stearothermophilus* SD-1, у которой установлена кристаллическая структура [Cheon et al., 2002; Cheon et al., 2004], нами проведен BLAST-анализ этих гидантоиназ с целью сравнения каталитически важных участков гидантоиназ этих штаммов [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov]. Показано, что в большинстве случаев аминокислотные последовательности этих участков консервативны.

В частности, у гидантоиназ этих штаммов аминокислоты в позициях His58, His60 и Lys150, участвующие в связывании ионов цинка (кофактор), консервативны. Аминокислоты в позициях His60, Asp315 и Cys317, детерминирующие специфичность в отношении D-гидантоиновых субстратов, также консервативны в ферментах этих штаммов.

Полученные на уровне сравнения первичных структур данные относительно D-стереоспецифичности изучаемых гидантоиназ подтверждаются экспериментально.

3.1.2. Локализация гена гидантоиназы *Geobacillus stearothermophilus*

Известно, что у некоторых бактерий ген *hyd*, кодирующий синтез гидантоиназы, локализован на плазмидной ДНК [Watabe et al., 1992; Hils et al., 2001].

Анализ плазмидной ДНК, выделенной из штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195, показал наличие четырех (с размерами ~330 т.п.н., ~200 т.п.н., ~145 т.п.н. и ~100 т.п.н.) и трех (с размерами ~300 т.п.н., ~200 т.п.н. и ~140 т.п.н.) высокомолекулярных плазмид, соответственно. Тотальная ДНК штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195 была разделена гель электрофорезом в пульсирующем поле. Гибридизационный анализ нативных плазмидных ДНК этих штаммов проводили с использованием фрагмента

меченой ДНК размером 371 п.н., содержащего участок гена *hyd* штамма *G. stearothermophilus* ATCC 31783. Нами не было обнаружено положительного сигнала на уровне плазмидных полос. Далее мы проводили анализ тотальной ДНК, необработанной и обработанной эндонуклеазами рестрикции *SmaI*, *NotI* и *SfiI*. Указанные ферменты рестрикции являются редкощепящими и используются для анализа больших фрагментов ДНК. Результаты анализа представлены на рис. 1 и 2.

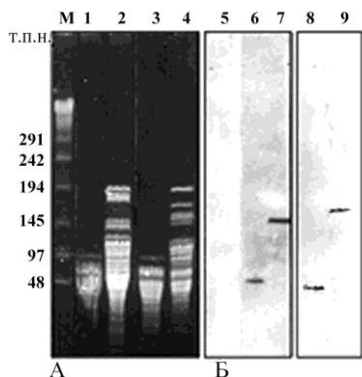


Рис. 1. Электрофореграмма (А) и флюорограмма (Б) тотальной ДНК *G. stearothermophilus* ATCC 31783 (1) и ATCC 31195 (2). 5-9 – ДНК гибридизация тотальной ДНК *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195 с фрагментом меченой ДНК размером 371 п.н.; 1,6 – тотальная ДНК (1); 3,8 – тотальная ДНК (2); 4,9 – тотальная ДНК (2), обработанная рестриктазой *SfiI*; 2,7 – тотальная ДНК (1), обработанная рестриктазой *SfiI*.

Гибридизационный анализ показал, что ни одна из нативных образцов тотальной ДНК не дает сигнала при гибридизации с фрагментом меченой ДНК размером 371 п.н., содержащий участок гена *hyd* штамма ATCC 31783. В этих же образцах, обработанных ферментом *SfiI*, сигнал гибридизации четко обнаруживается в полосе, соответствующей хромосомной ДНК, а именно в наиболее медленно мигрирующей ДНК (рис. 1 (7, 9)). Эти результаты подтверждаются также Southern blot гибридизацией тотальной ДНК, обработанной эндонуклеазами *SmaI* и *NotI*. В штамме *G. stearothermophilus* ATCC 31195 *SmaI*-фрагмент ДНК размером ~48 т.п.н. и *NotI*-фрагмент ДНК размером ~145 т.п.н. гибридизуются с последовательностью гена *hyd* размером 1,4 т.п.н. этого же штамма (рис. 2 (6, 7)). В штамме *G. stearothermophilus* ATCC31783 *SmaI*-фрагмент ДНК размером ~40 т.п.н. и *NotI* фрагмент ДНК размером ~160 т.п.н. гибридизуются с фрагментом меченой ДНК размером 371 т.п.н., содержащий участок гена *hyd* из этого же штамма (рис. 2 (8, 9)).

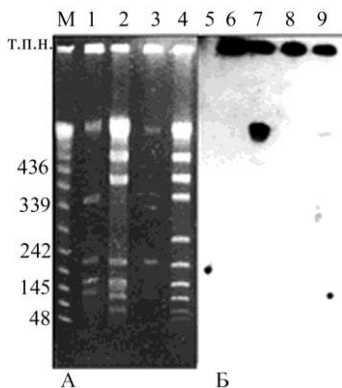


Рис. 2. Электрофореграмма (А) и флюорограмма (Б) тотальной ДНК *G. stearothermophilus* ATCC 31783 (1) и ATCC 31195 (2).

5-9 – гибридизация последовательности гена *hyd* штамма (1) размером 1,4 т.п.н. с тотальной ДНК штаммов (1) и (2); 1,6 – тотальная ДНК штамма (2), обработанная рестриктазой *SmaI*; 2,7 – тотальная ДНК штамма (2), обработанная рестриктазой *NotI*; 3,8 – тотальная ДНК штамма (1), обработанная рестриктазой *SmaI*; 4,9 – тотальная ДНК штамма (1), обработанная рестриктазой *NotI*.

Приведенные данные свидетельствуют, что у термофильных бактерий *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195 ген *hyd* расположен на хромосоме.

3.1.3. Молекулярное клонирование гена *hyd* и его экспрессия в клетках *E. coli*

С целью изучения экспрессии гена *hyd* штаммов *G. stearothermophilus* ATCC 31195 и ATCC 31783 в клетках *E. coli* нами проведен анализ клонированного фрагмента ДНК. Установлено, что кодирующей последовательности гена *hyd* предшествует участок длиной 99 п.н., в котором присутствует сайт Shine-Dalgarno (SD) на расстоянии 8 нуклеотидов от иницирующего кодона ATG, а еще выше – промотор с характерным –10-сайтом, отделенным 18 нуклеотидами от –35-сайта (рис. 3). Наличие сильных транскрипционных сигналов, характерных для узнавания фактором σ^{70} РНК-полимеразы *E. coli*, и сильных трансляционных сигналов позволило предположить, что ген *hyd* *G. stearothermophilus* может экспрессироваться в клетках *E. coli*.

```
ccgatgacatggaatgaacgctcagggcagtcattggcggaattagcagctgtagcgttgatg
                                     -35
taaaaataatcttttccataaattaagggggatgtataaATGaaaaaaattataaaaaat
      -10                               SD
```

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность регуляторного участка гена *hyd* *G. stearothermophilus* ATCC 31195. Консервативные последовательности (consensus) –10-сайт и –35-сайт в промоторе, участок связывания с рибосомой (сайт SD) и кодон инициации ATG подчеркнуты.

Ген *hyd* *G. stearothermophilus* ATCC 31195 был переклонирован на вектор pCRII. Полученными рекомбинантными плазмидами были трансформированы клетки штамма *E. coli* INV α F'. Отбор трансформантов вели на полноценной среде, содержащей Amp (200 мкг/мл). Анализом клонированного фрагмента ДНК в полученных трансформантах штамма *E. coli* INV α F' отобраны две плазмиды рHYDa и рHYDb с различной ориентацией гена относительно векторного промотора бактериофага T7. Клонированный фрагмент ДНК имеет собственный промотор и сайт связывания с рибосомой, что позволяет изучать экспрессию гена *hyd* на плаزمидях рHYDa и рHYDb непосредственно в клетках *E. coli* INV α F'.

Анализ клеточных экстрактов рекомбинантных штаммов *E. coli* INV AS-1 и *E. coli* INV AS-2, несущих плазмиды рHYDa и рHYDb, соответственно, показал наличие белка с молекулярной массой ~50 кДа, который соответствует гидантоиназе. Выход этого белка (около 13 % от общего белка) был одинаковым в обоих рекомбинантных штаммах, независимо от ориентации гена на плазмиде. Эти результаты подтверждают, что ген *hyd* экспрессируется в гетерологическом цитоплазматическом окружении при помощи собственных транскрипционных и трансляционных сигналов.

С целью получения высокоактивного штамма нами проведено молекулярное клонирование гена *hyd* штамма *G. stearothermophilus* ATCC 31783 в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3). Для этого был использован вектор рЕТ21 d(+) с сильным промотором бактериофага T7. Ген *hyd* этого штамма был амплифицирован методом PCR с использованием соответствующих праймеров и включением на фланкирующих N- и C-концах сайтов рестрикции *Nco*I и *Eco*RI, соответственно. Для успешного расщепления ДНК по сайту *Nco*I «forward» праймер был удлинён на 6 нуклеотидов с 5' конца:

```
Forward
5'-ACGTAGCCATGGCAAAAATTATAAAAAACG
      NcoI
```

```
Reverse
5'-ACTTGGGAATTCAAATGGTTAATTCCTCGCTCT
      EcoRI
```

Амплифицированная ДНК была обработана ферментами *Nco*I и *Eco*RI. Фрагмент ДНК размером ~1,4 т.п.н. был выделен из агарозного геля и лигирован с линейризованным вектором. Лигированной смесью ДНК трансформированы клетки штамма *E. coli* INV α F'.

Из отобранных колоний была выделена плазмидная ДНК и проведен рестрикционный анализ с использованием ферментов *NcoI* и *EcoRI*. Данные, приведенные на электрофореграмме (рис. 4), указывают на присутствие фрагмента ДНК размером 1,42 т.п.н., соответствующего гену *hyd*.

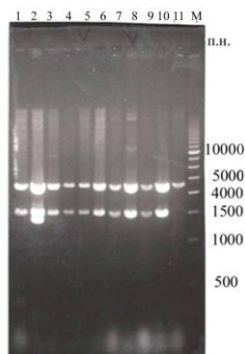


Рис. 4. Электрофореграмма рестриктв рекомбинантных плазмид, выделенных из полученных трансформантов.

1–10 *NcoI/EcoRI* рестрикты рекомбинантных плазмид;
11 – *NcoI/EcoRI* рестрикт вектора pET21 d(+);
M – DNA ladder.

Одна из полученных рекомбинантных плазмид – названная pHYD (рис. 5), была отобрана для последующих работ.

Проведено секвенирование клонированного фрагмента ДНК (Eurofins, Франция). Этой плазмидой трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) для последующего изучения гена и фермента гидантоиназы

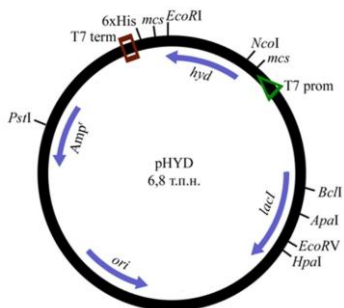


Рис. 5. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды pHYD, содержащей ген *hyd* штамма *G. stearothermophilus* ATCC 31783 и сильный промотор бактериофага T7.

3.1.4. Физико-химические и каталитические характеристики рекомбинантной гидантоиназы

С целью получения биомассы штамм *E. coli* BL21 AS (pHYD) выращивали при 37°C до ОП₅₄₀ ~0,5. Индукцию гена *hyd* проводили при тех же условиях с добавлением 1 мМ IPTG и инкубированием в течение 6 ч. SDS-PAGE анализ грубых клеточных экстрактов в денатурирующих условиях указал заметную сверхэкспрессию гена *hyd*. Выход гидантоиназы составлял около 40 % от общего белка. Анализ показал, что в нерастворимой фракции присутствует около 90 % тотальной гидантоиназы. Это свидетельствует, что рекомбинантный белок формирует так называемые «тельца включения» и агрегирует в клетках *E. coli*.

С целью растворения «телец включения» и перевода их в супернатантную фракцию нами был предложен способ с использованием *N*-лауроил саркозината в качестве растворяющего агента. В ходе получения растворимого белка на каждом этапе брали пробы и анализировали электрофорезом (рис. 6).

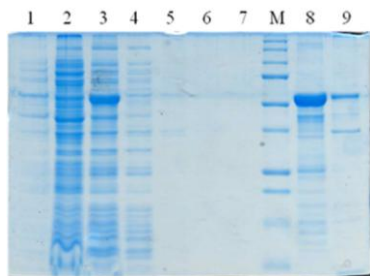


Рис. 6. Электрофореграмма этапов растворения гидантоиназы с применением *N*-лауроил саркозината.

1 – биомасса, обработанная реагентом Solulyse; 2 – побочные растворенные белки; 3 – экстракт, обработанный Solulyse и лизоцимом; 4 – растворенная фракция белков после обработки УЗ; 5, 6, 7 – остаточные побочные белки; М – белковые пробы для калибровки; 8 – растворенная гидантоиназа; 9 – остаточная нерастворенная гидантоиназа.

Из рис. 6 видно, что гидантоиназа в начале представлена в виде «телец включения». После применения способа обработки *N*-лауроил саркозинатом гидантоиназа почти полностью переходит в растворимую фракцию, указывая на ее эффективное растворение. Следует отметить, что использованный подход способствовал удалению многих белков хозяйской клетки и, тем самым, значительной очистке гидантоиназы на этой стадии. Действительно, полоса, имеющая молекулярную массу 52 кДа и соответствующая гидантоиназе, стала очень интенсивной после растворения.

В целях выбора более подходящей буферной системы для проявления потенциальной активности гидантоиназы нами был опробован ряд буферов с соответствующими рН: Tris-HCl, PBS, боратный буфер и MOPS. Если принять активность изученных гидантоиназ в буфере MOPS за 100 %, то их активность в боратном, Tris/HCl и PBS буферах можно приравнять к 30 %, 12 % и 1 %, соответственно. Поэтому целесообразно последующие исследования по биохимическому изучению гидантоиназ проводить в буфере MOPS.

Нами определено также оптимальное значение рН для проявления максимальной активности фермента. Активность рекомбинантного фермента измеряли при значениях рН 6,0-10,0 с шагом варьирования 0,5. Максимальная активность фермента была проявлена при рН 8,5-9,0 и, в последующих экспериментах использовали буферы с этим значением рН.

Известно, что ионы марганца (Mn^{2+}) значительно влияют на активность фермента [Chung et al., 2002; Shi et al., 2006] и для выяснения действия Mn^{2+} на уровень активности рекомбинантной гидантоиназы изучено влияние различных концентраций (2; 5; 10; 12,5 и 15 мМ) ионов этого металла. Результаты, приведенные на рис. 7 показывают, что в присутствии 2 мМ Mn^{2+} наблюдается повышение активности фермента на ~150 %. Дальнейшее повышение концентрации Mn^{2+} приводит к незначительной инактивации фермента (рис. 7).

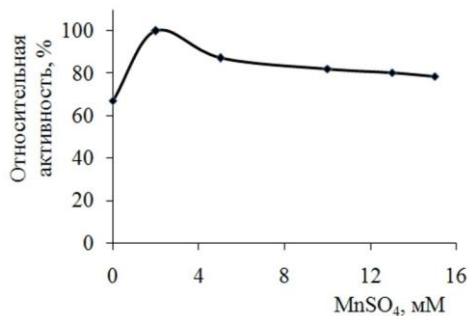


Рис. 7. Зависимость активности гидантоиназы рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 AS (pHYD) от концентрации ионов Mn^{2+} .

Определен также уровень активности рекомбинантной гидантоиназы в зависимости от температуры реакции. Результаты, представленные на рис. 8, свидетельствуют, что максимальную активность фермент проявляет при температуре 60°C

инкубацией в течение 20 мин. В отдельных экспериментах установлено, что наиболее репродуктивные результаты получаются при температуре 58°C, так как при длительной инкубации (более 30 мин) при 60°C происходит денатурация фермента. Однако другими авторами показано, что гидантоиназа термофильной бактерии *G. stearothermophilus* SD-1 проявляет максимальную активность при температуре 65°C [Lee et al., 1997].

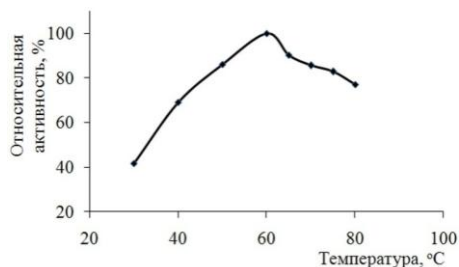


Рис. 8. Зависимость активности гидантоиназы рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 AS (pHYD) от температуры.

Для определения термостабильности фермента очищенную рекомбинантную гидантоиназу инкубировали в течение 20 мин при температурах в интервале 30°C – 80°C. После инкубации реакцию проводили при 58°C. Как показано на рис. 9, фермент сохраняет стабильность до 65°C, после чего наблюдается понижение активности. Полученные данные свидетельствуют об умеренной термостабильности фермента.

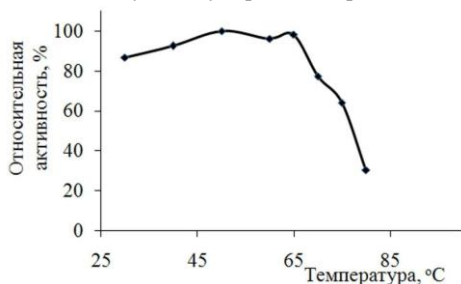


Рис. 9. Определение термостабильности гидантоиназы рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 AS (pHYD).

Одной из важных задач являлось определение стереоспецифичности рекомбинантной гидантоиназы. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что гидантоиназа обладает строгой D-стереоспецифичностью по отношению к 5-(2-метилтиозил) гидантоину. Незначительное образование L-карбамоил метионина (1,6 %), из L-5-(2-метилтиозил) гидантоина можно объяснить загрязненностью этого субстрата D-5-(2-метилтиозил) гидантоином.

Таблица 2.

Стереоспецифичность рекомбинантной гидантоиназы по отношению к 5-(2-метилтиозил) гидантоину.

Субстрат	D-Карбамоил метионин, мМ
D,L-5-(2-метилтиозил) гидантоин	48,9±2,1 (48,9 %)
D-5-(2-метилтиозил) гидантоин	98,3±2,5 (98,3 %)
L-5-(2-метилтиозил) гидантоин	1,6±0,5 (1,6 %)

Для определения субстратной специфичности термостабильной рекомбинантной D-гидантоиназы нами протестированы субстраты-предшественники коммерчески важных аминокислот, а также естественные субстраты дигидропиримидиназ и аллантоиназ. Результаты, представленные в табл. 3, показали, что фермент способен расщеплять широкий

спектр субстратов, а также аллантион, дигидроурацил и дигидротимин, естественные субстраты аллантииназы и дигидропиримидиназы.

Таблица 3.

Субстратная специфичность рекомбинантной D-гидантоиназы.

Субстрат	Относительная активность, %
Дигидроурацил	255,5±20
D,L-5-метил гидантоин	156,4±14,8
Аллантион	103,0±9,7
Гидантоин	100,0±9,5
D,L-5-(2-метилтиоэтил) гидантоин	93,3±9,1
Дигидротимин	74,6±7,0
5-бензил гидантоин	26,2±2,4
D,L-дигидрооротат	0,6±0,05
L-дигидрооротат	0,6±0,05

Примечание: 100 % относительной активности соответствует 30 Ед/мг удельной активности фермента. Концентрация субстратов составляет 40 мМ, а концентрация 5-бензил гидантоина – 20 мМ.

Показано, что из 5-монозамещенных гидантоинов – предшественников коммерчески важных аминокислот, фермент наиболее эффективно расщепляет D,L-5-метил гидантоин с образованием *N*-карбамоил-аланина и D,L-5-(2-метилтиоэтил) гидантоин с образованием *N*-карбамоил-D-метионина. Таким образом, рекомбинантная D-гидантоиназа проявляет высокую активность к 5-монозамещенным гидантоинам гидрофобных, но не ароматических аминокислот.

Нами определены также значения K_M для D,L-5-метил гидантоина, D,L-5-(2-метилтиоэтил) гидантоина и D,L-5-бензил гидантоина. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 4.

Таблица 4.

K_M значения 5-монозамещенных гидантоинов аланина, метионина и фенилаланина.

Субстрат	K_M , мМ
D,L-5-метил гидантоин	2,51±0,28
D,L-5-(2-метилтиоэтил) гидантоин	2,33±0,18
D,L-5-бензил гидантоин	0,99±0,15

Таким образом, исходя из полученных данных, можно заключить, что термостабильная рекомбинантная D-гидантоиназа может применяться в биотрансформационных процессах получения энантиомерно чистых D-аминокислот.

3.2. РЕКОМБИНАНТНЫЕ L-АМИНОАЦИЛАЗЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ

Известно, что фермент *N*-ацетилорнитиндеацетилаза обладает L-аминоацилазной активностью [Chibata et al., 1957]. С целью изучения физико-химических и каталитических свойств аминокислаз различной природы (мезофильные и термофильные) нами проведено молекулярное клонирование гена *argE* *E. coli*, кодирующего синтез *N*-ацетилорнитиндеацетилазы, в клетках *E. coli* BL21 (DE3).

3.2.1. Молекулярное клонирование гена *argE* и его экспрессия в клетках *E. coli*

Для осуществления молекулярного клонирования гена *argE* был выбран экспрессирующий вектор pET24a с сильным промотором бактериофага T7. Индукция гена РНК-полимеразы бактериофага T7 происходит в присутствии IPTG [Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Амплификацию генов проводили методом PCR. Для удобства клонирования гена *argE* на векторе pET24a в состав праймеров были включены сайты для рестрикционных эндонуклеаз – *NheI* в «forward» праймер и *XhoI* в «reverse» праймер.

Forward

5'- CAGAGGTGTGGCTAGCATGAAAAACAAATTACCGCC

NheI

Reverse

5'- TTATCCGGCCCTCGAGATGCCAGCAAAAATGGTGAATTACC

XhoI

Размер PCR-продукта гена *argE* *E. coli* составляет ~1200 п.н. Полученные PCR фрагменты ДНК экстрагировали из геля (рис. 10 (А, Б)) и лигировали с вектором рЕТ24а, предварительно обработанным рестрикционными ферментами *NheI* и *XhoI*. Лигированной смесью были трансформированы клетки штамма *E. coli* XS1D2R (*argE*⁻), мутантные по гену *argE*. Отбор трансформантов вели по комплементации мутации гена *argE* *E. coli* на минимальной селективной среде М9 без аргинина в присутствии Km (50 мкг/мл). Из выросших трансформантов были выделены плазмидные ДНК.

Для выяснения структурной организации рекомбинантной плазмиды, содержащей ген *argE* *E. coli* был проведен рестрикционный анализ этой плазмиды, названной рАМАЕ. Электрофореграмма рестриков этой плазмиды представлена на рис. 10(Б). Рестрикционный анализ плазмиды рАМАЕ указал на присутствие рестриков с размерами ~1200 п.н. и ~5000 п.н., которые соответствуют гену *argE* *E. coli* и вектору рЕТ24а, соответственно.

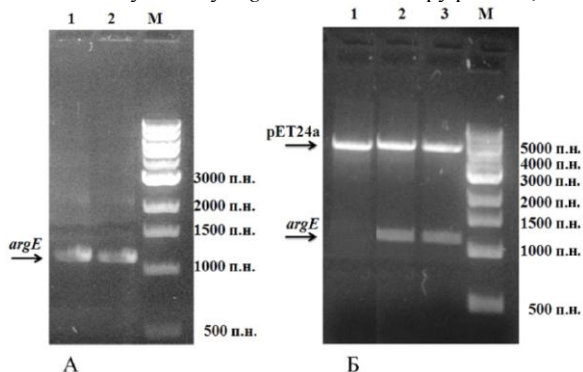


Рис. 10. (А) Электрофореграмма PCR-продукта гена *argE* *E. coli*. 1, 2 – PCR-продукт гена *argE*, М – ДНК ladder. **(Б)** Электрофореграмма рестриков рекомбинантной плазмиды рАМАЕ и вектора рЕТ24а. 1 – *NheI/XhoI* рестрикт вектора рЕТ24а; 2, 3 – *NheI/XhoI* рестрикты рекомбинантной плазмиды рАМАЕ; М – ДНК ladder.

Рестрикционная карта плазмиды рАМАЕ показана на рис. 11.

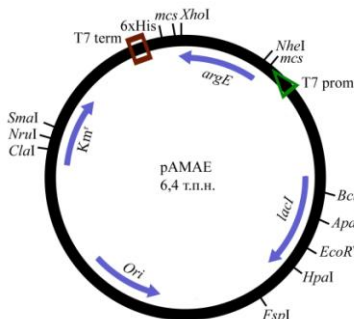


Рис. 11. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды рАМАЕ, содержащей ген *argE* *E. coli* и сильный промотор бактериофага Т7.

С целью получения штамма с высокой аминоксилазной активностью рекомбинантной плазмидой рАМАЕ трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), хромосомная ДНК которой содержит ген, кодирующий РНК-полимеразу бактериофага Т7.

Отбор трансформантов вели на полноценной среде L-агар в присутствии Km (50 мкг/мл). Отобранные трансформанты проверялись на L-аминоксилазную активность. Один из трансформантов – *E. coli* BL21(рАМАЕ), проявляющий высокую L-аминоксилазную активность, использовался в дальнейших исследованиях.

3.2.2. Подбор оптимальных условий для максимальной экспрессии гена *argE*, очистка и физико-химические характеристики рекомбинантной L-аминоксилазы

Для выявления потенциальной активности фермента L-аминоксилазы необходимо провести оптимизацию условий культивирования рекомбинантного штамма. Поскольку промотор использованного вектора является индуцибельным, то с целью максимальной экспрессии гена *argE* в среду для культивирования штамма добавляли различные концентрации IPTG (0,1 – 1 мМ). По результатам экспериментов, приведенных на рис. 12 (А), видно, что индукция в присутствии 0,2 мМ IPTG в течение 6 ч является оптимальной для синтеза фермента.

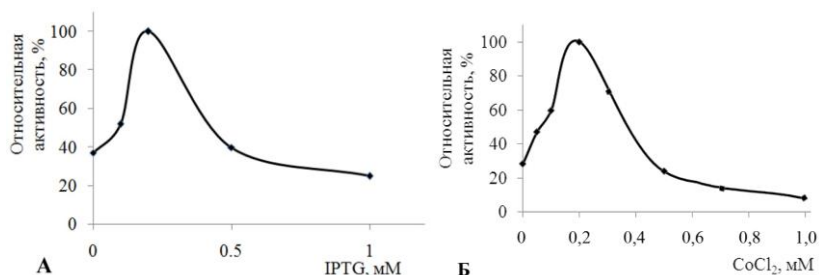


Рис. 12. (А) Зависимость активности L-аминоксилазы *E. coli* от концентрации IPTG; (Б) Зависимость активности L-аминоксилазы *E. coli* от концентрации CoCl₂.
100 % относительной активности соответствует 40 Ед/мг удельной активности фермента.

L-аминоксилазы являются металлозависимыми ферментами, и, в частности, активность этих ферментов зависит от ионов кобальта. Исходя из этого, нами изучена зависимость активности фермента от концентрации ионов Co²⁺ в реакционной среде. Было показано, что для проявления максимальной активности фермента оптимальной концентрацией является 0,2 мМ CoCl₂ (рис. 12 (Б)). Повышение концентрации ионов Co²⁺ приводило к резкому понижению активности фермента.

Полученный ферментный препарат с удельной активностью 4-5 Ед/мг использовался для последующей очистки фермента. Типичная схема очистки представлена в табл. 5.

Таблица 5.

Этапы очистки рекомбинантной аминоксилазы штамма *E. coli* АОЕ (рАМАЕ).

Этапы очистки	Количество белка, мг	Удельная активность фермента, Ед/мг	Выход, %
Грубый экстракт	663	5,0	100,0
DEAE-гойоперл	54	41,0	66,8
Гидроксиапатит	29	65,0	56,9
30-100 кДа фильтрация	19	72,5	41,5

Как показано в табл. 5, удельная активность фермента после очистки возросла более чем в 14 раз, а его выход составил 41 %.

По полученным данным L-аминоацилаза штамма *E. coli* AOE (pAMAE) имеет молекулярную массу 80 кДа и состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 43 кДа.

Нами определена изоэлектрическая точка рекомбинантной аминоксидлазы с применением изоэлектрофокусировки в 5 % полиакриламидном геле в присутствии фармалитов диапазона рI 3,0-10,0. По полученным данным фермент достигает изоэлектрической точки при рН 5,8.

Определены также зависимость активности фермента от температуры и термоустойчивость изучаемого фермента. Полученные данные представлены на рис. 13.

Из приведенных данных следует, что рекомбинантная L-аминоацилаза *E. coli* наиболее активна при температуре 45°C. Стабильность фермента сохраняется при инкубации в течение 20 мин до 45°C. Инкубирование при более высоких температурах приводит к постепенной инактивации L-аминоацилазы. Инкубация при температуре 52°C в течение 20 мин приводит к потере половины начальной активности фермента. Показано, что максимальную активность фермент проявляет при рН 7,0.

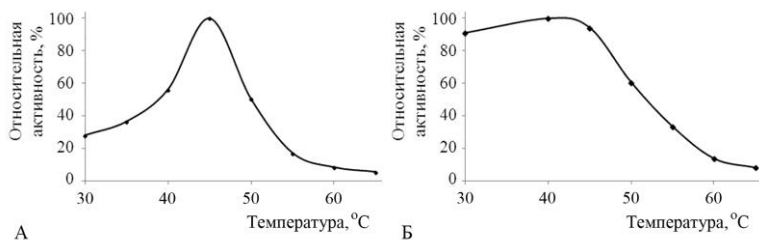


Рис. 13. Зависимость активности L-аминоацилазы от температуры реакции (А) и термообработки (Б) аминоксидлазы. 100 % относительной активности соответствует 40 Ед/мг удельной активности фермента.

Для определения субстратной специфичности рекомбинантной аминоксидлазы было протестировано 8 ацетилпроизводных аминоксидлот (табл. 6).

Таблица 6.

Субстратная специфичность рекомбинантной L-аминоацилазы *argE E. coli*.

Субстрат	Активность, %
<i>N</i> -ацетил- <i>D,L</i> -метионин	100,0±9,4
<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -аргинин	88,6±7,9
<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -орнитин	73,9±7,0
<i>N</i> -ацетил- <i>D,L</i> -аланин	36,0±2,8
<i>N</i> -ацетил- <i>D,L</i> -валин	21,4±1,7
<i>N</i> -ацетил- <i>D,L</i> -фенилаланин	9,7±1,2
<i>N</i> -ацетил- <i>D,L</i> -триптофан	1,8±0,14
<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -тирозин	0,0±0,0

Примечание: 100 % относительной активности соответствует 40 Ед/мг удельной активности фермента.

Из результатов, представленных в табл. 6, следует, что рекомбинантная L-аминоацилаза *E. coli* проявляет более высокую субстратную специфичность к *N*-ацетил-*D,L*-метионину по сравнению с основными ацетилпроизводными аминоксидлот. К нейтральным ацетиламиноксидлотам фермент проявляет умеренную активность, а к ароматическим субстратам - низкую.

Таким образом, в ходе проведенной работы создан новый рекомбинантный штамм с высокой L-аминоацилазной активностью, подобраны оптимальные условия культивирования этого штамма, обеспечивающие максимальную экспрессию гена *argE*, а также условия для проявления максимальной активности фермента. Осуществлена очистка рекомбинантной L-аминоацилазы, определены физико-химические и каталитические характеристики фермента.

3.2.3. Очистка и биохимическая характеристика рекомбинантной термостабильной L-аминоацилазы

Мезофильный штамм, продуцирующий чужеродную термостабильную аминокислотную аминотрансферазу, очень удобен с биотехнологической точки зрения. В целях изучения физико-химических и каталитических характеристик аминокислотной аминотрансферазы термофильной природы, а также иммобилизации термостабильной рекомбинантной аминокислотной аминотрансферазы мы воспользовались штаммом *E. coli* BL21 Ω (DE3)/pETama, несущим ген *ama* термофильной бактерии *G. stearothermophilus* [Dion et al., 1995].

Молекулярное клонирование гена *ama* осуществлено с использованием вектора pET3a, содержащего промотор бактериофага T7, индукция которого, как и в случае вектора pET24a, происходит в присутствии IPTG.

Для аминокислотной аминотрансферазы термофильной природы также определены: оптимальная концентрация IPTG (0,2 мМ, рис. 14 (А)), концентрация ионов Co^{2+} (0,2 мМ CoCl_2 , рис. 14 (Б)), оптимальная температура проведения реакции (65 $^{\circ}\text{C}$, рис. 15 (А)), оптимальный pH реакционной смеси (pH 8,65, рис. 15 (Б)).

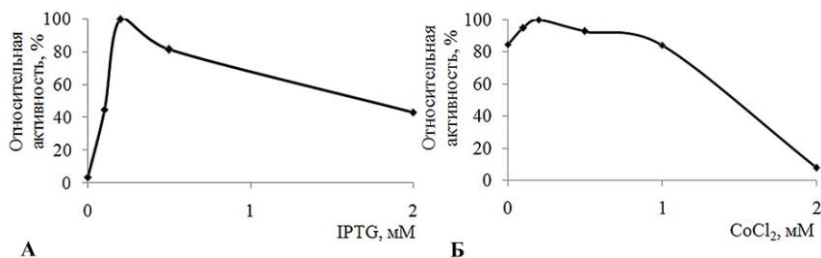


Рис. 14. Зависимость активности L-аминоацилазы термофильной природы от концентрации IPTG (А) и ионов кобальта (Б).

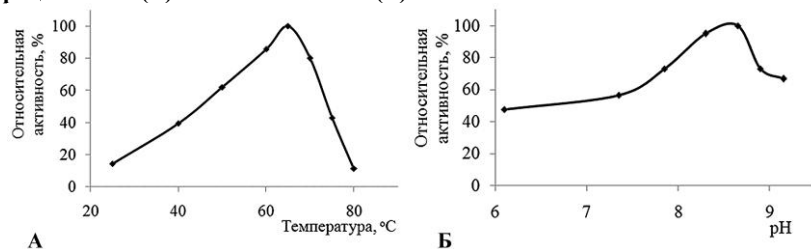


Рис. 15. Зависимость активности термостабильной рекомбинантной аминокислотной аминотрансферазы от температуры реакции (А) и значения pH (Б).

Для определения термостабильности рекомбинантной аминокислотной аминотрансферазы термофильного происхождения фермент подвергали термообработке. Из приведенных на рис. 16 данных следует, что аминокислотная аминотрансфераза стабильна при инкубации в течение 20 мин до 50 $^{\circ}\text{C}$. При дальнейшем повышении температуры фермент постепенно инактивируется, а при температуре выше 75 $^{\circ}\text{C}$ полностью теряет активность.

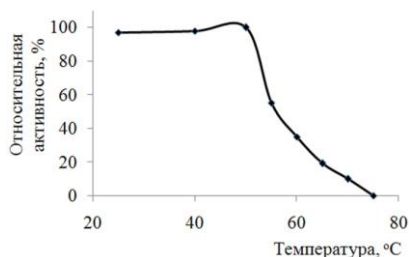


Рис. 16. Термостабильность рекомбинантной L-аминоацилазы штамма *E. coli* BL21Ω(DE3)/pETata.

С целью определения молекулярной массы и субъединичного состава рекомбинантной аминокислотоксидазы штамма *E. coli* BL21Ω(DE3)/pETata нами проведены работы по выделению и очистке фермента. Аминокислотоксидаза очищена до гомогенного состояния в результате применения трехступенчатой схемы очистки (табл. 7).

Таблица 7.

Этапы очистки рекомбинантной аминокислотоксидазы штамма *E. coli* BL21Ω(DE3)/pETata.

Этапы очистки	Количество белка, мг	Удельная активность, Ед/мг	Выход, %
ультразвуковой дезинтеграат	851,6	32,0	100,0
термообработка	185,1	46,3	31,1
DEAE TP-650M	95,5	56,2	19,7

Определение молекулярной массы нативного фермента проводили методом гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL6B. Показано, что молекулярная масса нативного фермента составляет 178 кДа (рис. 17 (А)). SDS-PAG электрофорез (денатурирующие условия) показал наличие одной полоски размером 43 кДа (рис. 17 (Б)).

Эти данные указывают, что изучаемый нами фермент является гомотетрамером, в отличие от рекомбинантной аминокислотоксидазы штамма *E. coli* AOE (pAMAE), являющейся димером. Субъединицы обеих аминокислотоксидаз имеют аналогичную молекулярную массу – 43 кДа.

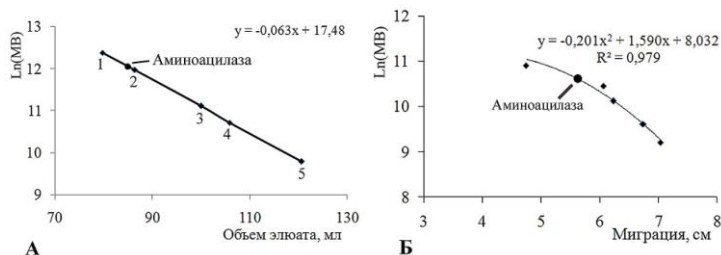


Рис. 17. Определение молекулярной массы L-аминоацилазы методом гель-фильтрации (А) и SDS-PAG электрофорезом (Б).

(А) Калибровочная кривая для определения молекулярной массы нативной L-аминоацилазы. Молекулярная масса стандартов: 1 – бычья каталаза (240 кДа); 2 – альдолаза (160 кДа); 3 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа); 4 – яичный альбумин (45 кДа); 5 – лошадиный миоглобин (17,8 кДа). (Б) Калибровочная кривая для определения молекулярной массы субъединиц фермента с использованием стандартов Page Ruler™ Plus (Thermo Scientific).

Одной из важных кинетических характеристик фермента является значение K_M субстратов. Нами определено значение K_M для некоторых субстратов аминоксилазы штамма *E. coli* BL21 Ω (DE3)/pETama. Полученные нами результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8.

Значения K_M для различных *N*-ацетилпроизводных *L*-аминокислот.

Субстрат	K_M , мМ
<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -метионин	1,43±0,64
<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -валин	1,31±0,80
<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -аланин	0,56±0,08

Однако, описанные в литературе значения K_M субстратов аминоксилаз различных штаммов значительно отличаются от K_M субстратов аминоксилазы штамма *E. coli* BL21 Ω (DE3)/pETama [Curley et al., 2003; Sherry et al., 2001].

3.2.4. Иммуобилизация термостабильной рекомбинантной *L*-аминоксилазы

Для применения аминоксилаз в биокаталитических процессах целесообразным является получение этого фермента в иммуобилизованном состоянии, преимуществами которого являются стабилизация и многократное использование катализатора, быстрая остановка процесса, легкость выделения продукта реакции и т.д.

В литературе известны данные об иммуобилизации аминоксилаз различной природы. Однако, отсутствуют данные об иммуобилизации рекомбинантной термостабильной аминоксилазы, кодируемой геном *ama* *G. stearothermophilus*. Для выполнения этой работы необходимо проведение оптимизации условий иммуобилизации.

Иммуобилизацию рекомбинантной *L*-аминоксилазы проводили на пористом силикагеле [Дюкова и др., 2011]. Для повышения активности аминоксилазы в процессе связывания фермента в среду с активированным носителем добавляли *N*-ацетил-*D,L*-метионин, $CoCl_2$ и глицерин в различных соотношениях. Известно, что субстраты фермента могут оказывать стабилизирующее воздействие на фермент в процессе иммуобилизации [Lopez et al., 2010]. Результаты экспериментов показали, что все образцы сохраняют более высокую активность по сравнению с контролем. Наибольший стабилизирующий эффект проявляет субстрат *N*-ацетил-*D,L*-метионин в концентрации 20 мМ (160% по сравнению с контролем). Следует отметить, что глицерин также оказывает положительный эффект на уровень остаточной активности фермента.

Для определения оптимальной температуры для иммуобилизованной аминоксилазы, а также сравнения данного параметра с аналогичным параметром свободного фермента проведена серия экспериментов определения активности аминоксилазы при различных температурах. Активность иммуобилизованного катализатора и свободного фермента определяли при значениях температур 25°C-80°C.

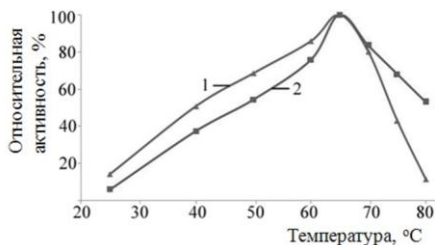


Рис. 18. Зависимость активностей свободного и иммуобилизованного препаратов *L*-аминоксилазы от температуры. 1 – свободный фермент; 2 – иммуобилизованный фермент.

Полученные экспериментальные данные, приведенные на рис. 18, свидетельствуют, что в результате иммобилизации значение оптимальной температуры реакции – 65°C, остается неизменным для обоих катализаторов.

С целью определения термостабильности иммобилизованной аминоксилазы и сравнения этого параметра с аналогичным свободного фермента реакцию смесь без субстрата (*N*-ацетил-*D,L*-метионин) подвергали температурной обработке в течение 20 мин при значениях температур 25°C-80°C. Реакцию деацилирования проводили в стандартных условиях при 52°C. Данные, представленные на рис. 19, свидетельствуют, что свободная аминоксилаза сохраняет свою активность при нагревании реакционной смеси до 50°C в указанных условиях. В результате иммобилизации значение этого параметра увеличивается до 55°C. Следует отметить, что если свободный препарат сохраняет 50 % начальной активности при инкубировании в течение 20 мин при 55°C, то иммобилизованный фермент сохраняет 50 % активности при 62°C.

Показано, что в результате иммобилизации значение K_M для *N*-ацетил-*L*-метионина увеличивается от 1,29 мМ (для свободного фермента) до 2,96 мМ. Следовательно, иммобилизация рекомбинантной умеренно термостабильной *L*-аминоксилазы на силихроме *S*-80 приводит к увеличению термостабильности фермента и уменьшению афинности к *N*-ацетил-*L*-метионину. Полученные результаты могут служить предпосылкой для применения препарата в производстве энантиомерно чистых аминокислот.

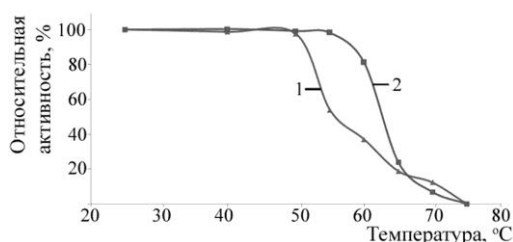


Рис. 19. Термостабильности свободной и иммобилизованной *L*-аминоксилазы.

1 – свободный фермент; 2 – иммобилизованный фермент.

Таким образом, в ходе проделанной работы нами созданы новые штаммы-продуценты *D*-гидантоиназы и *L*-аминоксилазы. Достиженные в настоящей работе результаты могут послужить основой для получения других рекомбинантных ферментных препаратов. Исходя из полученных данных, можно заключить, что рекомбинантные *D*-гидантоиназа и *L*-аминоксилазы представляют интерес с биотехнологической точки зрения и могут применяться в биотрансформационных процессах для получения оптически чистых аминокислот.

ВЫВОДЫ

1. В термофильной бактерии *G. stearotherophilus* установлено наличие высокомолекулярных плазмид: у штамма ATCC 31195 – три плазмиды размерами ~330, 210 и 180 т.п.н., у штамма ATCC 31783 – четыре плазмиды размерами ~350, 210, 170 и 140 т.п.н.
2. Впервые показана хромосомная локализация гена *hyd* термофильных штаммов *G. stearotherophilus* ATCC 31783 и ATCC 31195 сравнительным гибридизационным анализом тотальной и плазмидной ДНК после обработки *NotI*, *SfiI* и *SmaI* ферментами.
3. Виртуальное сравнение аминокислотных последовательностей гидантоиназ двух штаммов свидетельствует об их высокой идентичности – 96 %. Показана возможность

- экспрессии гена *hyd* *G. stearothermophilus* ATCC 31195 в клетках *E. coli* за счет собственных транскрипционных и трансляционных сигналов.
4. Осуществлено молекулярное клонирование белок-кодирующей последовательности гена *hyd* *G. stearothermophilus* ATCC 31783 на векторе с сильным промотором бактериофага T7. Получен рекомбинантный штамм *E. coli* BL21 AS (pHYD) – продуцент D-гидантоиназы с активностью очищенного фермента – 69 Ед/мг, превосходящий активность фермента природного штамма на два порядка.
 5. Разработаны эффективный способ растворения «телец включения» с использованием *N*-лауроил саркозината и схема очистки растворимой рекомбинантной термостабильной гидантоиназы.
 6. Изучены важнейшие физико-химические и каталитические характеристики рекомбинантной гидантоиназы, включая специфичность расщепления ряда субстратов. Установлено, что фермент характеризуется умеренной термостабильностью и D-стереоспецифичностью по отношению к D,L-5-(2-метилтиоэтил) гидантоину.
 7. Сконструирован высокоактивный штамм-продуцент аминокислоты (*E. coli* BL21 AO (pAMAE)) молекулярным клонированием на векторе с сильным промотором бактериофага T7 гомологичного гена *argE* *E. coli*, кодирующего синтез *N*-ацетилорнитиндеацетилазы. Активность очищенного рекомбинантного фермента составляет 72,5 Ед/мг.
 8. Проведена очистка и определены физико-химические и каталитические характеристики рекомбинантных аминокислотных термофильного и мезофильного происхождения, показаны различия этих характеристик для обоих ферментов.
 9. Проведена иммобилизация термостабильной рекомбинантной L-аминокислоты в оптимизированных условиях на пористом силикагеле. Показано повышение термостабильности фермента на 5°C.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Asmyan A., **Aganyants H.**, Mkhitarian A. Application of bacterial L-aminoacylase for obtaining D- and L-methionine. The new Armenian medical journal, V. 4, № 1, p. 22, 2010.
2. **Аганянц О. А.**, Мхитарян А. В., Дадаян А. С., Колоян А. О., Овсепян А. С. Разработка метода получения L- и D-валина из рацемата с использованием L-аминокислоты. Биолог. журн. Армении, Т. 64, №3, с. 91-96, 2012.
3. **Aganyants H.A.**, Mkhitarian A.V., Koloyan H.O., Hovsepyan A.S., Hambardzumyan A.A. Preparation and study of aminoacylase from thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus*. The ISTC Science Seminar. Modern state of biotechnological developments and ways of their commercialization. Yerevan, september 11-12, p. 51, 2012.
4. **Aganyants H.A.** Purification and study of L-aminoacylase characteristics of *Escherichia coli* recombinant strain. Materials of international young scientists conference "Perspectives for development of molecular and cellular biology-III", Yerevan, september 26-29, p. 19-23, 2012.
5. Mkhitarian A.V., **Aganyants H.A.**, Koloyan H.O., Hovsepyan A.S., Hambardzumyan A.A. Study of bacterial D- and L-aminoacylases. The ISTC Science Seminar. Modern state of biotechnological developments and ways of their commercialization. Yerevan, september 11-12, p. 74, 2012.
6. **Aganyants H.A.**, Hovhannisyan Ye.A., Koloyan H.O., Hovsepyan A.S., Hambardzumyan A.A. Immobilization of recombinant L-aminoacylase from *Geobacillus stearothermophilus* and characteristics of obtained preparations. Proceedings of the YSU, Chemical and Biological Sciences, № 1, p. 32-35, 2013.

7. Weigel P., Marc F., **Aganyants H.A.**, Sakanyan V.A. Characterization of Thermostable Hydantoinases Cloned from *Geobacillus stearothermophilus*. The reports of the National Academy of Sciences of Armenia. V. 113, №1, p. 92-98, 2013.

Ազանյանց Հովսեփի Ալեքսանդրի

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԾԱԳՄԱՆ ՌԵԿՈՄՄԵՆԱՏ Ը-ՀԻՂԱՆՈՒՆԱԶՆԵՐ ԵՎ L-ԱՍԻՆԱ-ԱՑԻԼԱԶՆԵՐ. ՄՍԱՅՈՒՄԸ, ՄԱՔՐՈՒՄԸ ԵՎ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ

Ամփոփագիր

Հանգուցային բառեր՝ *Geobacillus stearothermophilus*, *hyd* գեն, ռեկոմբինանտ շտամ, D-հիդանտոինազ, L-ամինաացիլազ, ջերմակայունություն, ստերեոսպեցիֆիկություն, իմոբիլիզացիա:

Ստենախոսական աշխատանքը նվիրված է հիդանտոինազը կողավորող գենի ուսումնասիրմանը, D-հիդանտոինազային և L-ամինաացիլազային բարձր ակտիվությամբ օժտված ռեկոմբինանտ շտամների կառուցմանը, այդ ֆերմենտների ֆիզիկա-քիմիական և կատալիտիկ բնութագրմանը:

G. stearothermophilus ATCC 31783 և ATCC 31195 շտամների ամինաթթվային հաջորդականությունների համեմատությունը բացահայտել է բարձր նմանություն – 96%: Նշված շտամների հիդանտոինազների առաջնային կառուցվածքները հիմնականում տարբերվում են C-ծայրային տեղամասերով: Տարբեր ծագման 28 հիդանտոինազների ամինաթթվային հաջորդականությունների համեմատական վերլուծությունը թույլ տվեց այդ հաջորդականություններում բացահայտել կոնսերվատիվ տեղամասեր: Հիդանտոինազների առաջնային կառուցվածքների BLAST վերլուծության արդյունքում բացահայտվել է, որ այդ ֆերմենտներն առանձնանում են առանձին ճյուղում և ֆիլոգենետիկորեն ազգակից են տարբեր ծագման դեհիդրոպիրիմիդինազների հետ:

G. stearothermophilus ATCC 31195 թերմոֆիլ մանրէում հայտնաբերված են ~330, 210 և 180 հ.ն.գ. չափով երեք, իսկ *G. stearothermophilus* ATCC 31783 մանրէում՝ ~350, 210, 170 և 140 հ.ն.գ. չափով չորս բարձրամոլեկուլային պլազմիդներ: Թերմոֆիլ *G. stearothermophilus* ATCC 31783 և ATCC 31195 մանրէների ամբողջական և պլազմիդային ԴՆԹ-երը *NotI*, *SfiI* և *SmaI* ռեստրիկտազներով մշակումից հետո հիբրիդիզացիոն համեմատական վերլուծությամբ ցույց է տրվել, որ *hyd* գենը տեղակայված է քրոմոսոմում:

Իրականացվել է *G. stearothermophilus* ATCC 31195 շտամի *hyd* գենի մոլեկուլային կլոնավորումը վեկտորի վրա՝ սեփական պրոմոտորով: Կառուցվել են pHYDa և pHYDb պլազմիդները կրող շտամներ: Այդ շտամներում հիդանտոինազի առկայությունը վկայում է հետերեղզ ցիտոպլազմային միջավայրում *hyd* գենի էքսպրեսիայի մասին:

Հիդանտոինազի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչի ստացման նպատակով կատարվել է *G. stearothermophilus* ATCC 31783 շտամի *hyd* գենի մոլեկուլային կլոնավորումը T7 բակտերիոֆագի ուժեղ պրոմոտոր կրող վեկտորի կիրառմամբ: Ստացված *E. coli* BL21 AS (pHYD) նոթ՝ D-հիդանտոինազի բարձրակտիվ ռեկոմբինանտ շտամ-արտադրիչում այդ ֆերմենտի ակտիվությունն էրկու կարգով գերազանցում է բնական ֆերմենտի ակտիվությանը:

Ստացված ռեկոմբինանտ հիդանտոինազը առաջացնում է այսպես կոչված «ներառման մարմնիկներ», որոնց լուծման նպատակով առաջակվել է եղանակ՝ որպես

լուծող նյութ *N*-լաուրիլ սարկոզինատի կիրառմամբ: Առաջարկվել է լուծելի ռեկոմբինանտ հիդանտոինազի մաքրման սխեմա: Մաքրված ֆերմենտի ակտիվությունը կազմում է 69 միավոր/մգ: Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը կազմում է 52 կԴա: Ռեկոմբինանտ հիդանտոինազը մաքսիմալ ակտիվություն է ցուցաբերում pH 8,5-9,0 տիրույթում և 60°C ջերմաստիճանի պայմաններում, 2 մՄ Mn^{2+} առկայությամբ: Ֆերմենտը պահպանում է ակտիվությունը 20 ռոպե մինչև 65°C ինկուբացիայի պայմաններում, ինչը վկայում է ֆերմենտի չափավոր ջերմակայունությունը:

Ռեկոմբինանտ ջերմակայուն հիդանտոինազը 5-(2-մեթիլթիոթի)հիդանտոինի նկատմամբ օժտված է խիստ D-ստերեոսպեցիֆիկությամբ: Այս ֆերմենտի սուբստրատային սպեցիֆիկության որոշումը ցույց է տվել, որ ռեկոմբինանտ D-հիդանտոինազը բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում հիդրոֆոր, այլ ոչ թե արոմատիկ ամինաթթուների 5-միատեղակալված հիդանտոինների նկատմամբ: Հիդանտոինազի որոշ սուբստրատների համար *K_m*-ի որոշումը ցույց է տվել D,L-5-բենզիլ հիդանտոինի նկատմամբ առավելագույն խնամակցությունը (0,99 մՄ):

Իրականացվել է *argE* գենի մոլեկուլային կոնսվոլյուցիոն T7 բակտերիոֆագի ուժեղ պրոմոտոր կրող pET24a վեկտորի կիրառմամբ: Կառուցվել է L-ամինաացիլազի բարձր ակտիվությամբ օժտված *E. coli* BL21(pAMAE) ռեկոմբինանտ շտամ: *argE* գենի մաքսիմալ էքսպրեսիան նկատվել է միջավայրում 0,2 մՄ IPTG ավելացման դեպքում: Այս ֆերմենտն իր պոտենցիալ ակտիվությունը ցուցաբերում է pH 7,0, 45°C ջերմաստիճանի և 0,2 մՄ $CoCl_2$ -ի առկայության պայմաններում: Մեզոֆիլ բնույթի ռեկոմբինանտ L-ամինաացիլազն ի համեմատ հիմնային ամինաթթուների ացետիլ-ածանցյալների առավել բարձր սուբստրատային սպեցիֆիկություն է ցուցաբերում *N*-ացետիլ-DL-մեթիոնինի նկատմամբ: Չեզոք ամինաթթուների ացետիլ-ածանցյալների նկատմամբ ֆերմենտը ցուցաբերում է չափավոր, իսկ արոմատիկների նկատմամբ՝ ցածր ակտիվություն:

Կատարվել է թերմոֆիլ ծագման ռեկոմբինանտ ամինաացիլազի մաքրումը և որոշվել են ֆիզիկա-քիմիական, ինչպես նաև կատալիտիկ բնութագրերը: Ուսումնասիրվել է ֆերմենտի ջերմակայունությունը: Թերմոֆիլ ծագումով ամինաացիլազը 20 ռոպե տաքացնելիս կայուն է մինչև 50°C ջերմաստիճանը, որից հետո սկսում է աստիճանաբար ինակտիվանալ՝ վկայելով ֆերմենտի չափավոր ջերմակայունության մասին: Յուրյց են տրվել թերմոֆիլ և մեզոֆիլ ծագման ֆերմենտների բնութագրերի տարբերությունները:

Կատարվել է ջերմակայուն ռեկոմբինանտ L-ամինաացիլազի իմոբիլիզացիան օպտիմալացված պայմաններում ծակոտկեն սիլիկազելի վրա: Յուրյց է տրվել ֆերմենտի 5°C –ով ջերմակայունության բարձրացումը:

Այսպիսով, կատարված աշխատանքի ընթացքում մեր կողմից ստեղծվել են D-հիդանտոինազի և L-ամինաացիլազի նոր շտամ-արտադրիչներ: Ներկայացված աշխատանքում ստացված արդյունքները կարող են հիմք ծառայել այլ ռեկոմբինանտ ֆերմենտային պատրաստուկների ստացման համար: Ելնելով ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ ռեկոմբինանտ D-հիդանտոինազը և L-ամինաացիլազը կենսատեխնոլոգիական տեսանկյունից հետաքրքրություն են ներկայացնում և կարող են կիրառվել կենսատրանսֆորմացիոն պրոցեսներում օպտիկապես մաքուր ամինաթթուների ստացման համար:

RECOMBINANT D-HYDANTOINASES AND L-AMINOACYLASES OF BACTERIAL ORIGIN: OBTAINING, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Summary

Key words: *Geobacillus stearothermophilus*, *hyd* gene, recombinant strain, D-hydantoinase, L-aminoacylase, thermostability, stereospecificity, immobilization.

The thesis is devoted to the study of the gene encoding hydantoinase, construction of recombinant strains with high hydantoinase and L-aminoacylase activity, and the physico-chemical and catalytic characterization of these enzymes.

Comparison of amino acid sequences of hydantoinases of strains *G. stearothermophilus* ATCC 31783 and ATCC 31195 showed high identity – 96%. The primary structure of these strains differ mainly in the C-terminal end. The comparative analysis of the amino acid sequences of 28 known hydantoinases of different origin allowed us to establish conservative regions in these sequences. According to the results of BLAST analysis of the primary structures of hydantoinases it was revealed that these enzymes form a separate branch and are phylogenetically related to dihydropyrimidinases of different origin.

In the thermophilic bacterium *G. stearothermophilus* ATCC31195 three plasmids were revealed with macromolecular sizes ~ 330, 210 and 180 kb, and in strain *G. stearothermophilus* ATCC 31783 – four plasmids were revealed with macromolecular sizes ~ 350, 210, 170 and 140 kb. Chromosomal localization of the *hyd* gene of thermophilic strains *G. stearothermophilus* ATCC 31783 and ATCC 31195 was shown by comparative hybridization analysis of total and plasmid DNA after treatment with *NotI*, *SfiI* and *SmaI* restriction enzymes.

Molecular cloning of *hyd* gene of *G. stearothermophilus* ATCC 31195 was carried out on the vector under the control of its own promoter. Recombinant strains carrying plasmids pHYDa and pHYDb, were designted. The existence of hydantoinase activity in these strains indicates the *hyd* gene expression in a heterologous cytoplasmic surrounding.

In order to obtain the high-activ hydantoinase strain-producer the molecular cloning of the *hyd* gene of strain *G. stearothermophilus* ATCC 31783 was carried out using a vector with a strong promoter of bacteriophage T7. A new recombinant strain of *E. coli* BL21 AS (pHYD) – producer of D-hydantoinase was designed. The specific activity of recombinant hydantoinase is hundred times as high as the activity of wild-type strain.

The obtained recombinant hydantoinase forms so-called "inclusion bodies". In order to dissolve the "inclusion bodies", it was proposed to use *N*-lauroyl sarcosinate as a solute. A scheme for purification of soluble recombinant hydantoinase was proposed. Specific activity of the purified enzyme was 69 U/mg. The molecular weight of the enzyme is 52 kDa. Recombinant hydantoinase shows maximum activity at the values of pH 8.5-9.0, temperature of 60°C and in presence of 2 mM Mn^{2+} . It is shown that enzyme retains activity when incubated for 20 min at 65°C, showing the moderate thermal stability of the enzyme.

Our data indicate that recombinant thermostable hydantoinase has strict D-stereospecificity with respect to 5-(2-methylthioethyl) hydantoin. Determination of the substrate specificity of this enzyme proved that the recombinant D-hydantoinase exhibits high activity with

5-monosubstituted hydantoins of hydrophobic but not aromatic amino acids. Determination of the K_M values for some substrates of hydantoinase showed the highest affinity for the DL-5-benzyl hydantoin (0.99 mM).

Molecular cloning of *argE* gene of *E. coli* was performed using the vector pET24a with a strong promoter of bacteriophage T7. A recombinant strain of *E. coli* BL21 (pAMAE) was designed to show a high L-aminoacylase activity. Maximum *argE* gene expression was observed in adding 0.2 mM IPTG to the growth media. It is shown that potential activity of this enzyme is exhibited at values of pH 7.0, temperature of 45°C and in presence of 0.2 mM CoCl_2 . Recombinant L-aminoacylase of mesophilic nature exhibits a higher substrate specificity for *N*-acetyl-DL-methionine with comparison to acetyl derivatives of basic amino acids – L-arginine and L-ornithine. The enzyme shows moderate activity with acetyl derivatives of neutral amino acids and poor activity with aromatic amino acids.

The purification and identification of physico-chemical and catalytic characteristics of recombinant aminoacylase of thermophilic origin was performed. The thermostability of the enzyme was studied. At heating during 20 min recombinant aminoacylase of *G. stearothermophilus* is stable up to 50°C, after which the gradual loss of activity was observed, indicating the moderate thermostability of the enzyme. The differences of characteristics for aminoacylase of mesophilic and thermophilic origin are presented.

The immobilization of thermostable recombinant L-aminoacylase in optimized conditions on the porous silica was performed. The increase of the enzyme thermostability by 5°C in the result of immobilization was shown.

Thus, during the work done the new strain-producers of D-hydantoinase and L-aminoacylase were designed. The obtained results can be used as the base for obtaining other recombinant enzyme preparations. On the base of obtained results one can conclude, that recombinant D-hydantoinase and L-aminoacylase represent interest from the biotechnological viewpoint and can be applied in the biotransformation process for preparing optically pure amino acids.