DOI 10.66073/ReFocus-Conf/3010043

BACILLUS SUBTILISDA REKOMBINANT OQSIL SEKRETSIYASINI OPTIMALLASHTIRISH

Xoliqov Asqar Farhod o‘g‘li[1], **Sayliyev Mirshod**[1], **Vohidov Xushnud**[1], **Murtozoyev Azizjon**[1,2], **Sa’dullayev Shohruh To‘lqin o‘g‘li**[1], **Alimova Barno Xasanovna**[1], **Mansurova Ozoda**[1], **Sharifov Mansurbek**[3], **Maxsumxanov Axmadjan Azamxanovich**[1]

[1]*O‘zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Mikrobiologiya instituti.*
[2]*Biznes va Fan Universiteti, Toshkent*
[3]*Toshkent Davlat Texnika Universiteti*

Annotatsiya: *Bacillus subtilis*da rekombinant oqsillar sekretsiyasini oshirish usullari tahlil qilindi. Signal peptidlar, promotorlar, ribosoma bog‘lanish saytlari va xo‘jayin shtamm xususiyatlari o‘rtasidagi bog‘liqlik ko‘rib chiqildi. Adabiyotlar tahlili yuqori mahsuldorlikka erishish uchun oqsil sintezi, folding va membrana orqali tashilishini o‘zaro muvofiqlashtirish zarurligini ko‘rsatadi.
Kalit so‘zlar: *Bacillus subtilis*, oqsil sekretsiyasi, signal peptid, promotor, RBS, hujayra muhandisligi.

Аннотация: Рассмотрены подходы к улучшению секреции рекомбинантных белков в *Bacillus subtilis*. Проанализировано взаимодействие сигнального пептида, промотора, сайта связывания рибосомы и характеристик штамма-хозяина. Анализ литературы показывает необходимость согласования синтеза, сворачивания и мембранного транспорта белка для повышения продуктивности.
Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, секреция белка, сигнальный пептид, промотор, RBS, инженерия клетки.

Abstract: Approaches to improving recombinant protein secretion in *Bacillus subtilis* are reviewed. Interactions between signal peptides, promoters, ribosome binding sites and host strain properties are examined. The literature highlights the need to coordinate protein synthesis, folding and membrane translocation to improve productivity.
Keywords: *Bacillus subtilis*, protein secretion, signal peptide, promoter, RBS, host chassis engineering.

Kirish

Bacillus subtilis rekombinant ekspression hujayralari hozir ham rekombinant oqsillarni ishlab chiqarishda keng foydalanilmoqda. Jumladan, butun dunyo ferment bozorida ishlab chiqarilgan 17% rekombinant fermentlar aynan ushbu xo‘jayin hujayrasiga tegishli [1]. Rekombinant fermentlarning hujayradan tashqariga sekretsiyalanishi mahsulotni ajratib olish va tozalashni soddalashtiradi. Gram-musbat *B. subtilis* bakteriya hujayralari amilaza, proteaza va lipaza kabi ko‘plab oqsillarni tabiiy ravishda oziqa muhitiga sekretsiya qobiliyati tufayli biotexnologiyada model organizm sifatida juda keng qo‘llanilib kelinmoqda. Biroq gen ekspressiyasining kuchayishi har doim ham faol oqsil sekretsiyasi ortishiga olib kelmaydi. Oqsilning noto‘g‘ri folding bo‘lishi, tashish tizimining ortiqcha yuklanishi va proteolitik parchalanish olinadigan mahsulot miqdorini cheklaydi [2]. Ishning maqsadi sekretsiyaga ta’sir qiluvchi asosiy omillarni umumlashtirish hamda ularni birgalikda optimallashtirishning ilmiy asoslarini yoritishdir.

IQTIBOS UCHUN
Xoliqov A., Sayliyev M., Vohidov X., Murtozoyev A. va boshq. Bacillus subtilisda rekombinant oqsil sekretsiyasini optimallashtirish // Fundamental va amaliy mikrobiologiyaning bugungi holati va rivojlanish istiqbollari: yosh olimlar nigohi: Respublika ilmiy-amaliy anjumani materiallari. – Toshkent, 2026. – B. 171–174.
DOI: https://doi.org/10.66073/ReFocus-Conf/3010043

Materiallar va usullar

Ish so‘nggi yillarda chop qilingan maqolalar asosida tayyorlandi. Unda keltirilgan tadqiqotlar signal peptidlarni (SP) tanlash, transkripsiya va translyatsiyani boshqarish, xo‘jayin shtammni takomillashtirish hamda sun’iy intellektni (SI) ushbu sohada qo‘llash yo‘nalishlari bo‘yicha qiyosiy tahlillar olib borildi. Miqdoriy natijalar tegishli adabiyotlardan olindi; yangi laboratoriya tajribalari o‘tkazilmadi.

Natijalar

*B. subtilis*da oqsillarni hujayradan tashqariga tashishning asosiy yo‘li Sec tizimidir. SecA motor oqsili ATP energiyasidan foydalanib, odatda hali to‘liq folding bo‘lmagan polipeptidni SecYEG kanali orqali tashishda ishtirok etadi. Tat tizimi esa buklangan oqsillarni proton harakatlantiruvchi kuch hisobiga tashiydi. Shu sababli sekretsiya yo‘lini tanlashda maqsadli oqsilning folding bo‘lishi va kofaktor biriktirish xususiyatlari hisobga olinadi. Sec tizimi ko‘plab rekombinant fermentlar uchun dastlabki tanlov bo‘lsa, Tat tizimi ayrim maxsus substratlarni tashishda keng qo‘llaniladi [2].

Signal peptidning N-sohasidagi musbat zaryad, H-sohasidagi gidrofoblik va C-sohasidagi kesilish joyi oqsilning membranaga yo‘naltirilishi hamda funksional holga o‘tishiga ta’sir qiladi. Ba’zi bir ko‘p o‘rganilgan AmyQ, AprE, LipA va YoaW kabi signal peptidlar biotexnologiyada juda keng qo‘llaniladi, ammo ularning samaradorligi maqsadli oqsilga bog‘liq. Brockmeier va hammualliflar SPlar kutubxonasini yaratish va skrining qilishning ahamiyati muhim ekanligini tajriba orqali ko‘rsatishgan [3]. Shuning uchun, tabiiy SPni tanlash yoki uning ketma-ketligini o‘zgartirish natijasida ferment sekretsiyasini baholashda faqatgina tajribada tekshirish orqali aniqlash mumkin.

Promotor va ribosoma bog‘lanuvchi saytni (RBS) muvofiqlashtirish va uning sekretsiyaga ta’siri ham so‘nggi yillarda chuqur tadqiq qilinmoqda. Jumladan P43 va Pveg kabi konstitutiv promotorlar uzluksiz ekspressiyani ta’minlaydi. Induksiyalanuvchi tizimlar esa mahsulot sintezi boshlanadigan vaqtni boshqarish imkonini beradi. Haddan tashqari kuchli promotor hujayraning translyatsiya va sekretsiya imkoniyatlariga ortiqcha yuk tushirishi mumkin va bu xo‘jayin hujayra uchun stress hisoblanadi. Shu bilan birga, RBS ham juda muhim ahamiyatga ega bo‘lib, ribosoma va iRNKning bog‘lanishida muhim ahamiyatga ega. U oqsil sintezi (translatsiya) tezligiga ta’sir qiladi [4].

Yuqorida sanab o‘tilgan genetik elementlar, SP, RBS, promotor sinergetik optimallashtirish juda muhim. Misol uchun, Li va hammualliflar mini-sistron kassetasini qo‘llash, shaperon ekspressiyasini kuchaytirish va signal peptidlarni skrining qilishni uyg‘unlashtirib, inson FGF21 oqsilining eruvchan shakldagi sekretsiyasini taxminan 9 marta oshirgan [5]. RBS va signal peptidlarni tizimli ravishda kombinatsiyalashga asoslangan SCORES yondashuvida ferment ishlab chiqarish 7.5 martagacha ortgan [6]. Bu misollar oqsil sintezi va sekretsiyasini muvofiqlashtiruvchi genetik elementlar birikmalarini tanlash samarali bo‘lishi mumkinligini ko‘rsatadi.

Bundan tashqari, yaratilgan genetik konstruktni xo‘jayin hujayrasiga moslashtirish va kuchli sekretsiya natijasida yuzaga keladigan stressni kamaytirish juda muhim hisoblanadi. *B. subtilis* hujayralarida rekombinant oqsillarni ekspressiya qilishda yuzaga keladigan eng asosiy muammo bu hujayra tashqi proteazalardir. Ushbu proteazalar sekretsiya qilinayotgan rekombinant fermentni parchalaydi va mahsuldorlikni kamaytiradi. Hozirgi vaqtda ushbu muammoni yechish uchun proteaza genlari nokaut qilingan *B. subtilis* WB600, *B. subtilis* WB800 kabi sanoat shtammlar ishlab chiqilmoqda [7].

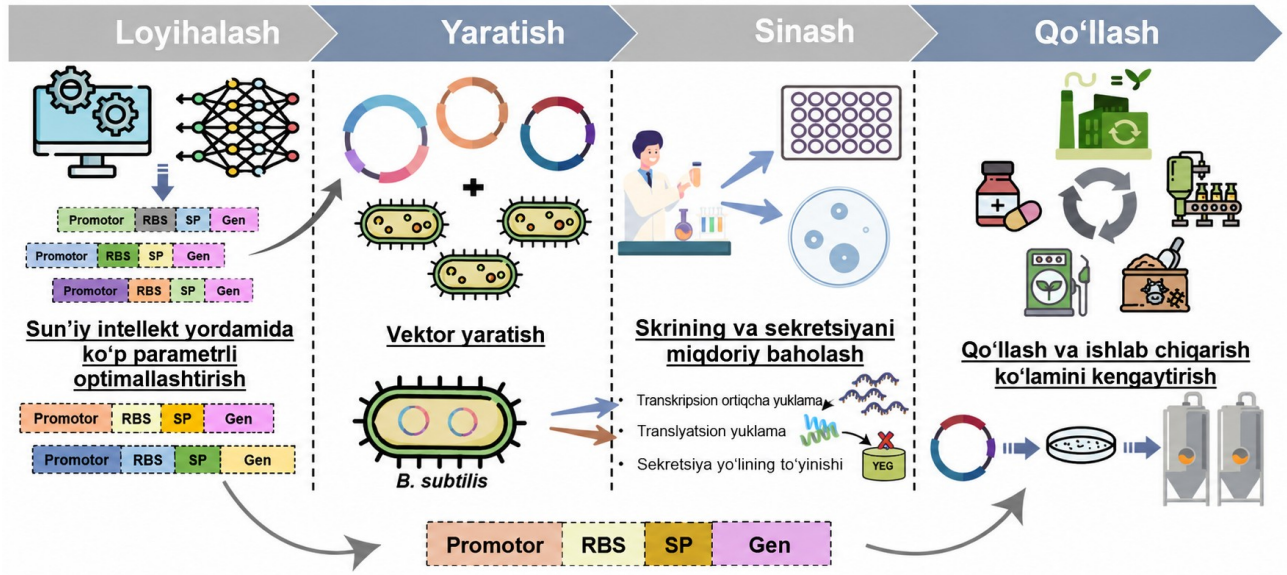
So‘nggi yillarda SI rivojlanishi gen muhandisligi sohasiga ham o‘z ta’sirini o‘tkazdi. Ko‘plab tadqiqotchilar SI qo‘llagan holda yangi sintetik promotor va SP sekvenslarini yaratishmoqda va ularni laboratoriyada sinovdan o‘tkazib yaxshi natijalar olishmoqda. Keyinchalik olingan ushbu tajriba ma’lumotlarini SI yordamida umumlashtirib, ma’lum bir shtamm uchun xos kompyuter modellari yaratiladi va bu modellar sekretsiya qilmoqchi bo‘lgan oqsil uchun istiqbolli genetik element variantlarni saralashga yordam beradi [8, 9]. Natijada juda ko‘plab mablag‘ va vaqt tejab qolinadi.

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010043

Muhokama

Ko‘plab adabiyotlar tahlili sekretsiyani o‘zaro bog‘liq bosqichlar majmui sifatida baholash zarurligini ko‘rsatadi. Dastlab maqsadli oqsilga mos sekretsiya yo‘li va SPlar tanlanadi, so‘ngra promotor-RBS-SP kombinatsiyalari tanlanadi. *B. subtilis* xo‘jayin hujayrasi sekretsiya chekloviga qarab mos vektor konstrukt kombinatsiyasi tanlanadi, bu rekombinant oqsilning to‘g‘ri folding bo‘lishi va sekretsiyasi yaxshilanishiga yordam beradi. Loyihalash, yaratish, sinash va olingan natijalardan o‘rganish sikli navbatdagi konstruksiyalarni avvalgi tajribalar asosida tanlash imkonini beradi.

Samaradorlikni baholash faqat oziqa muhitidagi rekombinant ferment faolligi bilan cheklanmasligi kerak. Oqsil miqdori, solishtirma faollik, biomassa va hujayra o‘sish tezligini ham hisobga olish zarur. Bundan tashqari, kichik hajmli tajribalarda tanlangan konstruksiyaning bioreaktordagi samaradorligi alohida tasdiqlanishi lozim. Ushbu yondashuvning asosiy cheklovlari — genetik elementlar samaradorligining maqsadli oqsil va xo‘jayin shtammga bog‘liqligi hamda hisoblash modellarining tajriba ma’lumotlari sifati va hajmiga qaramligidir. Yuqorida keltirilgan misollar 1-rasmda sxematik tarzda umumlashtirilgan.



1-rasm. *B. subtilis*da rekombinant oqsil sekretsiyasini ko‘p parametrli optimallashtirish: loyihalash, vektor yaratish, sekretsiyani baholash va ishlab chiqarish ko‘lamini kengaytirish

Xulosa

*B. subtilis*da rekombinant oqsil sekretsiyasini oshirish uchun SP, promotor, RBS va xo‘jayin shtamm xususiyatlarini birgalikda optimallashtirish zarur. Yuqori mahsuldorlik oqsil sintezi, folding va sekretsiyasi o‘rtasidagi muvozanat bilan ta’minlanadi. SI usullari tajribada tekshiriladigan variantlarni saralashni tezlashtiradi. Yakuniy tanlov esa rekombinant oqsil sekretsiyasi miqdori va xo‘jayin hujayra barqarorligi asosida amalga oshiriladi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Vološen, T. et al. A novel signal peptide toolbox for optimized heterologous expression of yeast pheromones in *Bacillus subtilis.* Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 2025, *23*, 100551, DOI:10.1016/j.jgeb.2025.100551.
2. Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. Microb Cell Fact. 2018;17:52. DOI: 10.1186/s12934-018-0901-3.
3. Brockmeier U. et al. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in gram-positive bacteria. J Mol Biol. 2006;362:393–402. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.07.034.

4. Volkenborn K. et al. The length of ribosomal binding site spacer sequence controls the production yield for intracellular and secreted proteins by *Bacillus subtilis*. Microb Cell Fact. 2020;19:154. DOI: 10.1186/s12934-020-01404-2.
5. Li D. et al. High-efficiency expression and secretion of human FGF21 in *Bacillus subtilis* by intercalation of a mini-cistron cassette and combinatorial optimization of cell regulatory components. Microb Cell Fact. 2019;18:17. DOI: 10.1186/s12934-019-1066-4.
6. Li Y. et al. A genetic toolkit for efficient production of secretory protein in *Bacillus subtilis*. Bioresour Technol. 2022;363:127885. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127885.
7. Westers H. et al. The CssRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. FEBS J. 2006;273:3816–3827. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05389.x.
8. Teufel F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. Nat Biotechnol. 2022;40:1023–1025. DOI: 10.1038/s41587-021-01156-3.
9. Grasso S. et al. Signal peptide efficiency: from high-throughput data to prediction and explanation. ACS Synth Biol. 2023;12:390–404. DOI: 10.1021/acssynbio.2c00328.