

**ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼ ՍԱՐԱՆ**

ՔԼԲՈՒԼՅԱՆ ՍՅՈՒՉԱՆՆԱ ՍՈՒՐԵՆԻ

**Որոշ բակտերիաների ԱԵՖ-ազայ ին ակտիվորէ յն ան
բնորթագրորւմը գլ իցերորլ ի և գլ յ ուկոզի
օքսիացման պայ մաններորւմ**

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒ ԹՅՈՒՆ

**Գ.00.04 կենսաքիմիամասնագիտորէ յամբ կենսաբանական
գիտորէ յ ուկոզի թեկնածորլ ի գիտական աստիճանի
հայ ցման համար**

**Գիտական ղեկավար՝
ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ, կենս. գիտ դոկտոր,
պրոֆեսոր՝ Ա.Յ. Թռչ ուկոզ ան**

ԵՐԵՎԱՆ 2019

Աշխատանքում օգտագործված հապավումներ

ԱԵՖ – ադենոզին-5'-ենոֆոսֆորական թթու

ԱԵՖ-ազ - ադենոզին-5'-ենոֆատազ

ԱԿՖ - ադենոզին-5'-երկֆոսֆորական թթու

ԳՅՖ – գլիցերոլ -3-ֆոսֆատ

ԳԴՅԱ - գլիցերոլ -3-դիհիդրոօքսիացետոն

ԴՅԱ - դիհիդրոօքսիացետոն

ԴՑԿԴ – *N,N'*-դիցիկլոհեքսիլ կարբոդիիմիդ

ՄՋԼ – մրջնաթթու ջրածինլիազ

ՄԴՅ - մրջնաթթու դեհիդրոգենազ

ՆԱԴ – նիկոտինամիդադենիներկնուկլեոտիդ

ՅԻԴ - հիդրոգենազ

ՕԽ – օպտիկական խտություն

ՕՎՊ – օքսիդալերականոդական պրտենցիալ

E. coli – *Escherichia coli*

G. toebii – *Geobacillus toebii*

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ	5
ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱՎՆԱՐԿ	
<i>ESCHERICHIA COLI</i> -ի ՊՐՈՏՈՆԱՅԻՆ $F_{\phi}F_1$ -ԱԵՖ-ՍԻՆԹԱԶԸ և ՆՐԱ ԴԵՐԸ ԽՈՐՈՄԱՆ	ՏԱՐԲԵՐ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ.....	10
1.1. ԱԵՖ-ՍԻՆԹԱԶՆԵՐԸ և <i>ESCHERICHIA COLI</i> -ի ՊՐՈՏՈՆԱՅԻՆ $F_{\phi}F_1$ -ԱԵՖ- ՍԻՆԹԱԶԸ.....	10
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> -ի $F_{\phi}F_1$ -ԱԵՖ- սիներազը	12
1.1.2. $F_{\phi}F_1$ համալիրի աջ խառանքի մեխանիզմը և ռոտացիոն կառավարումը.....	16
1.1.3. ԱԵՖ-ազի արգելակիչները	23
1.2. ԽՈՐՈՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՅԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐՈՒՄ. ԳԼՅՈՒ- ԿՈՉԻ և ԳԼԻՑԵՐՈՒԼԻ ԽՈՐՈՒՄԸ ԱՂԻՔԱՅԻՆ ՑՈՒՊԻԿՈՒՄ	26
1.2.1. Խմորման ընդհանուր բնութագիրը. մրջնաթթվային կամ խառը խմորում.....	26
1.2.2. <i>E. coli</i> -ի ՄՁԼ համալիրը և հիդրոգենազները	31
1.2.3. <i>E. coli</i> -ի Հիդ-1-ը և Հիդ-2- ը	36
1.2.4. Գլիցերոլի խմորումը աղիքային ցուպիկում.....	38
1.2.5. Գլիցերոլի տեղափոխումը	41
1.3. ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆ ԳԵՐՅԱՄԱԼԻՐՆԵՐԻ ՁԱՎՈՐՈՒՄԸ.....	43
1.4. <i>GEOBACILLUS</i> ՑԵՂԻ ՆԿԱՐԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆԸ	47

ԳԼՈՒԽ	2.	ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐՆ ՈՒ ՆՅՈՒԹԵՐԸ.....	50
-------	----	---	----

2.	1.	Բակտերիաներ և նյութեր.....	50
2.2.		Բակտերիաների աճեցումը, պահպանումը և նախապատրաստումը փորձին	52
2.3.		<i>E. coli</i> –ի «ուղիղ» և «շրջված» թաղանթային բշտիկների ստացումը	53
2.4.		ԱԵՖ-ազային ակտիվություն ունեցող	54
2.5.		Սպիտակուցի քանակի ունեցող	56
2.6.		Բջջաթաղանթներով իոնների տեղափոխման ուսումնասիրումը իոնների ակտիվության ունեցող մանրէների աճի և մեթոդով	57
2.7.		Օքսիդազային ակտիվության ունեցող	58
2.8.		Բակտերիաների աճման տեսակարար արագության ունեցող	59
2.9.		Արդյունքների մշակումը	59

ԳԼՈՒԽ	3.	ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐՆ ՈՒ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ
-------	----	---

3.1.	<i>E. coli</i> –ի տարբեր հիդրոգենազների և F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվության կապը գլիցերոլի խմորման պայմաններում.....	60
3.2.	<i>E. coli</i> –ի թաղանթակապ հիդրոգենազների ազդեցությունը F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի վրա գլիցերոլի և ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման դեպքում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում.....	68
3.2.1.	<i>E. coli</i> –ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների	

դեպքում.....	69
3.2.2. <i>E.coli</i> -ի F ₀ F ₁ -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում.....	77
3.2.3. <i>E.coli</i> -ի F ₀ F ₁ -ԱԵՖ-ազային ակտիվության կախվածությունը գլյուկոզի կոնցենտրացիայից և Յիդ-4-ի դերը.....	83
3.3. Թաղանթակապ գործընթացները <i>G. Toebii</i> -ում՝ որպես ռեդօքս սթրեսի հաղթահարման պատասխան.....	90
3.3.1. <i>G. toebii</i> ArzA-8-ի աճն ու ՕՎՊ-ի կիսնետիկան. գլյուկոզի ազդեցությունը.....	90
3.3.2. Ռեդօքս ռեագենտների ազդեցությունը <i>G. toebii</i> ArzA-8-ի աճի և ՕՎՊ-ի կիսնետիկայի վրա.....	94
3.3.3. <i>G. toebii</i> ArzA-8-ի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և պրոտոնի տեղափոխումը.....	97
Ամփոփում.....	102
Եզրակացություններ.....	107
Գրականության ցանկ.....	109

ՆԵՐԱՃՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը: Բոլոր կենդանի օրգանիզմների, այդ թվում և բակտերիաների նյութափոխանակությունը կախված է արտաքին միջավայրի պայմաններից, էներգիայի աղբյուրներից և այլ գործոններից: Աղիքային ցուպիկ (*Escherichia coli*, *E.coli*) բակտերիաներն իրականացնում են ածխաջրերի, օրինակ, գլյուկոզի խմորում, որի արդյունքում առաջանում են տարբեր օրգանական

թթուներ (սաթաթթու, քացախաթթու, մրջնաթթու, կաթնաթթու և այլն), սպիրտ (էթանոլ) և գազեր (ածխաթթու գազ (CO_2), ջրածին (H_2)): Այդ էպատճառը, որ այս բակտերիաներն արտադրական նպատակներով լայնորեն կիրառվում են կենսաէթանոլի, կենսաջրածնի ստացման համար: Միևնույն ժամանակ արդիական է նաև այդ նպատակով ածխածնի մառչելի և հեշտ հասանելի աղբյուրներ գտնելու հարցը: Ոչ վաղ անցյալում քացահայտվել է, որ աղիքային ցուպիկը՝ *E. coli*-ն իրականացնում է եռատոմանի սպիրտ գլիցերոլի խմորում, ինչի արդյունքում նույնպես առաջանում են տարբեր օրգանական թթուներ, գազեր, սպիրտ (Dharmadi et al., 2006; Gonzalez et al., 2008; Trchounian and Trchounian, 2009): Գլիցերոլը կենսաավառելիքի ստացման ամենատարածված թափոնն է, ինչն էլ դարձնում է այն բավականին մառչելի, հետևաբար դրա խմորման կիրառումը կենսաջրածնի և կենսաէթանոլի ստացման համար շատ խոստումնալից է (Chaudhary, 2012):

Աղիքային ցուպիկում խմորման ընթացքում առաջացած մրջնաթթուն՝ թաղանթակապ մրջնաթթու ջրածինլիազ (ՄՋԼ) ֆերմենտային համալիրի միջոցով օքսիդանում է մինչև CO_2 -ի և H_2 -ի: Վերջինս էլ էկոլոգիապես մաքուր, վերականգնվող, մոտ 140 կՋ/գ էներգիա ունեցող վառելիք է, որի այրումից անջատվում է ջուր (Momirlan and Veziroglu, 2005; Hallenbeck and Ghosh, 2009; Chu and Majumdar, 2012): H_2 -ն արտադրում են տարբեր բակտերիաներ՝ շաքարների կամ օրգանական թթուների մթնային կամ ֆոտոխմորման արդյունքում (Kim et al., 2014; Gabrielyan et al., 2015; Hallenbeck and Liu, 2016): Այս գործընթացին մասնակցում են հատուկ ֆերմենտներ՝ հիդրոգենազներ (Հիդ), որոնցից երկուսը՝ Հիդ-3-ը և Հիդ-4-ը, մրջնաթթու դեհիդրոգենազ H -ի (ՄԴՀ- H) հետ միասին կազմում են, համապատասխանաբար, ՄՋԼ-1 և ՄՋԼ-2 ուղիները (Trchounian et al., 2012):

Ցույց է տրվել, որ Հիդ-ների և ՄՋԼ-ի ակտիվության, նրանց էներգիային պահանջների համար անհրաժեշտ է կենսական նշանակություն ունեցող ֆերմենտի՝ պրոտոնային F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի գործունեությունը, ինչն էլ թաղանթով պրոտոնի տեղափոխման հիմնական մեխանիզմն է (Bagramyan and Trchounian, 2003): Մեր լաբորատորիայում արված հետազոտությունները ցույց են տվել,

որ գլյուկոզի կամ գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH-ի չեզոք և թույլ հիմնային արժեքների դեպքում H_2 -ի արտադրությունը և H^+ -ի արտահոսքը զգայուն են F_0F_1 -ի արգելակիչ N,N' -դիցիկլոհեքսիլ կարբոդիմիդի (ԴՑԿԴ) նկատմամբ (Bibulyan et al., 2011; Trchounian et al., 2012; Trchounian and Sawers, 2014): Նաև ցույց է տրվել, որ ակտիվ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազ չունեցող *atp* մուտանտներում չի դիտվել H_2 -ի արտադրություն (Mnatsakanyan et al., 2004): Մյուս կողմից էլ ցույց է տրվել, որ թաղանթային բշտիկների F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը զգալիորեն խթանվում է մրջնաթվի ներկայությամբ, երբ բակտերիաներն աճեցվել են գլյուկոզի խմորման պայմաններում (Bagramyan et al., 2003): Ի՞նչ կերպ կարելի է բացատրել F_0F_1 -ի նման անհրաժեշտությունը: Հավանաբար, խմորման ընթացքում ԱԵՖ-ազը զուգակցում է ԱԵՖ-ի հիդրոլիզը թաղանթով H^+ -ների տեղափոխման հետ, ինչի արդյունքում էլ ԱԵՖ-ի էներգիան փոխակերպվում է ՄՋԼ-ի և Հիդ-ների գործելու համար անհրաժեշտ $\Delta\mu$ -ի (պոտոնաշարժ ուժ): Սակայն պետք է փաստել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում վերոհիշյալ ֆերմենտների փոխամազործակցության և փոխազդեցության մեխանիզմների մասին տվյալները սահմանափակ են: Այս տեսանկյունից հետաքրքիր է ուսումնասիրել F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և տարբեր Հիդ-ների ակտիվության փոխապվածությունը գլիցերոլի, ինչպես նաև գլյուկոզի և գլիցերոլի խառնուրդի խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում:

Բակտերիաներն օժտված են օքսիդալերականզնողական (ռեդօքս) հատկություններով, որոնք կարևոր են նրանց նյութափոխանակության և միջավայրի տարբեր պայմաններին, օրինակ, բարձր ջերմաստիճանին հարմարվելու համար (Wang et al., 2015): Բակտերիաների աճի ընթացքում դիտվում է միջավայրի օքսիդալերականզնողական արտենցիալի (ՕՎՊ) անկում, ինչը ռեդօքս համարժեքների՝ դեպի միջավայր արտանետման արդյունք է: Ցույց է տրվել նաև, որ ՕՎՊ-ն կարող է որոշիչ լինել կենսատարալվացման գործընթացներում տարբեր ջերմասեր բակտերիաների կենսազանգվածի ստացման և ֆերմենտային ու ակտիվ տեղափոխության վերահսկման համար (Ghazaryan et al., 2015): Մեզոֆիլ

E.coli, *E.hirae* և այլ բակտերիաներում շաքարի (գլյուկոզ) և գլիցերոլի խմորման պայմաններում որոշվել է ՕԿՊ-ի արժեքը (Poladyan et al., 2013): Հավանական է, որ բակտերիաների պրոտոնաշարժ ուժի ($\Delta\mu_{H^+}$) և ՕԿՊ-ի անկման միջև կա որոշակի փոխհարաբերություն: Ելնելով վերջինից՝ առաջարկվել է, որ խմորման պայմաններում բակտերիաների ռեդօքս զգայնության մեջ, $\Delta\mu_{H^+}$ -ի պահպանման հիմնական պատասխանատուն՝ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազն, ունի մեծ դեր (Hakobyan et al., 2012): Սակայն պետք է փաստել, որ քիչ ուշադրություն է դարձված ջերմասեր բակտերիաների, մասնավորապես գերթացիլների, ռեդօքս կարգավորման խնդիրներին, ԱԵՖ-ազային ռեակցիաներին:

Հետազոտության նպատակն ու խնդիրները: Այս աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել *E. coli*-ի վայրի տիպի և տարբեր Հիդ-ային մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և պարզաբանել տարբեր Հիդ-ների ազդեցությունն այդ ակտիվության վրա՝ գլիցերոլի, գլյուկոզի և գլիցերոլի խառնուրդի, գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում: Ինչպես նաև ուսումնասիրել ջերմասեր *Geobacillus toebii*-ի (*G. toebii*) ArzA-8 տեսակի թաղանթային էներգիական գործընթացները և համեմատել մեզոֆիլ *E.coli*-ի հետ:

Ուսումնասիրությունների համար սահմանվել են հետևյալ խնդիրները.

1. Ուսումնասիրել *E. coli*-ի BW25113 վայրի տիպի և տարբեր Հիդ-ներում խախտումներ կրող մուտանտների թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլիցերոլի խմորման պայմաններում:
2. Բացահայտել *E. coli*-ի վայրի տիպի և տարբեր Հիդ-ներում խախտումներ կրող մուտանտների թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվության փոփոխությունները ածխածնի խառնադրյունների (գլյուկոզի և գլիցերոլի) խմորման պայմաններում և համեմատել միայն գլիցերոլի խմորման պայմանների հետ:
3. Որոշել գլիցերոլի խմորման պայմաններում այս բակտերիաների թաղանթով H^+/K^+ -ական փոխանակության փոփոխությունները:
4. Ուսումնասիրել գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը *E. coli*-ի վայրի տիպի և Հիդ-ային մուտանտի ԱԵՖ-ազի ակտիվության վրա:

5. Ուսումնասիրել ջերմասեր *Geobacillus toebii*-ի (*G. toebii*) ArzA-8 տեսակի աճը, օքսիդալերական գնոդական պոտենցիալի (ՕՎՊ) կինետիկան, pH-ի փոփոխությունները և ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ ռեդօքս սթրեսի պայմաններում:

Աշխատանքի գիտական նորություն և գիտագործնական նշանակությունը: Ներկայացված աշխատանքում ցույց է տրվել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում միջավայրի pH-ն ազդում է *E. coli* բակտերիաների F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության վրա, ընդ որում ամենաբարձր ակտիվություն դիտվել է pH 7.5-ում: F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար անհրաժեշտ են Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը: Բացահայտվել է, որ ածխածնի խառն աղբյուրների (գլյուկոզ և գլիցերոլ) խմորման պայմաններում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազը մասնակցում է թաղանթով H_2 -ի ցիկլի ձևավորմանը և գործում է որպես ներքջային pH-ի կարգավորիչ:

Ցույց է տրվել նաև, որ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և երկրորդային տեղափոխիչ համակարգերից TrkA-ի գործառական կապը կախված է գլյուկոզի կոնցենտրացիայից և արտաքին pH-ից: Այս արդյունքները ցույց են տալիս TrkA-ի հետ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի փոխազդեցության բնույթը և դրա կարևորությունը խմորման պայմաններում:

Ստացված արդյունքները նոր են հետազոտված բակտերիաների համար և հնարավորություն են տալիս պարզաբանել տարբեր Յիդ-ների և պրոտոնային ԱԵՖ-ազի գործառական կապը ածխածնի տարբեր աղբյուրների խմորման պայմաններում, ինչպես նաև ԱԵՖ-ազի դերը բջջային նյութափոխանակության կարգավորման հարցում:

Աշխատանքում առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ կարգավորելով ՕՎՊ-ն՝ կարելի է մեծացնել ջերմասեր բակտերիաների կենսատեխնոլոգիական կիրառելիությունը, ինչպես կենսազանգվածի, այնպես էլ տարբեր արժեքավոր նյութերի ստացման նպատակով:

E. coli բակտերիայի տարբեր շտամներ ունեն մեծ կենսատեխնոլոգիական ներուժ և լայնորեն կիրառվում են կենսաավառելիքի ստացման նպատակով: Յետևաբար տարբեր ֆերմենտների, ինչպես նաև դրանց ձևավորած գերհամալիրներում փոխազդեցության մեխանիզմների, գործառնության կապի և

կարգավորման հետ կապված այս տվյալները կարելի է կիրառել ինչպես հիմնարար գիտական հետազոտություններում, այնպես էլ կենսատեխնոլոգիական նպատակներով:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները:

1. Թույլ հիմնային pH-ում ($\text{pH } 7.5$) գլիցերոլի խմորման դեպքում *E. coli*-ի Յիդ-1 և Յիդ-2 ֆերմենտներն ուղղակիորեն փոխազդում են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի հետկամ մասնակցում թաղանթով պրոտոնի տեղափոխմանը:
2. Գլիցերոլի խմորման ընթացքում *E. coli*-ի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ուղղակիորեն կախված է միջավայրի pH-ից: ԱԵՖ-ազի և Յիդ-ների գործառական կապի բնույթը՝ կախված խմորման սուբստրատից, տարբեր է:
3. *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվությունը և դրա փոխգործակցությունը Յիդ-ների, մասնավորապես, Յիդ-4-ի հետ կախված է գլյուկոզի կոնցենտրացիայից և միջավայրի pH-ից:
4. *G. toebii*) ArzA-8 տեսակի աճն ու F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը կախված են ածխածնի աղբյուրի առկայությունից և միջավայրի օքսիդաերական գնդակալի վիճակից:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

ESCHERICHIA COLI-Ի ՊՐՈՏՈՆԱՅԻՆ F₀F₁-ԱԵՖ-ՍԻՆԹԱԶԸ ԵՎ՝ ՆՐԱ ԴԵՐԸ ԽԱՌՐՄԱՆ ՏԱՐԲԵՐ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

1.1. ԱԵՖ-սինթազները և Escherichia coli-ի պրոտոնային F₀F₁- ԱԵՖ-սինթազը

ԱԵՖ-ազները թաղանթակապ անցքուղիներ են (իրականում տեղափոխիչներ, քանի որ իսկական իոնական անցքուղիներ չեն), որոնք գոլգորդում են թաղանթով իոնի տեղափոխությունը որևէ նուկլեոտիդի, օրինակ ԱԵՖ-ի, սինթեզի կամ հիդրոլիզի հետ: Թաղանթակապ ԱԵՖ-ազների տարբեր տեսակները՝ բջջի յուրահատուկ պահանջները բավարարելու համար ժամանակի ընթացքում փոփոխվում են: Ըստ գործառնության ին տարբերությունների՝ ԱԵՖ-ազները դասակարգվում են F-, V-, A-, P-, և E-, տեսակների, որոնք բոլորն էլ կատալիզում են ԱԵՖ-ի սինթեզի և/կամ հիդրոլիզի ռեակցիաները (Cross and Müller, 2004; Hong and Pedersen, 2008): ԱԵՖ-ի սինթեզի շարժիչ ուժը պրոտոնային գրադիենտն է, իսկ ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի ընթացքում իոնային գրադիենտի ձևավորման շարժիչ ուժը՝ ֆոսֆոերկեսթերային կապի ճեղքման էներգիան:

F-տեսակի ԱԵՖ-ազների անվան «F»-ը ծագում է ֆոսֆորիլացնող «գործոն» (լատիներեն՝ ֆակտոր, Factor) բառի սկզբնատառից: Այս ֆերմենտներն առկա են բակտերիաներում, միտոքոնդրիումներում և քլորոպլաստներում:

A-ԱԵՖ-ազները հայտնաբերվել են արքեններում, որոնք գործառնության ժամանակ են F-ԱԵՖ-ազներին, իսկ կառուցվածքով՝ V-ԱԵՖ-ազներին: V-տեսակի H⁺-ԱԵՖ-ազներն ի սկզբանե հայտնաբերվել են էուկարիոտ բջիջների վակուլներում, որոնց հիմնական գործառնությունը ԱԵՖ-կախյալ պրոտոնի կամ նատրիումի տեղափոխումն է՝ ներվակուլային միջավայրի թթվեցմամբ (McGuire et al., 2016):

P-տեսակի ԱԵՖ-ազները, որոնց երբեմն կոչում են նաև E1- E2 ԱԵՖ-ազներ, թաղանթի միջով տեղափոխում են տարբեր իոններ և հայտնաբերված են բակտերիաներում և շատ էուկարիոտ բջիջների օրգանոիդներում:

E-տեսակի ԱԵՖ-ազները ֆերմենտների ընտանիք են, որոնք հիդրոլիզում են արտաքին ԱԵՖ-ը (Extracellular բառի սկզբնատառից) (Zhong and Guidotti, 1999):

F-, V- և A- ԱԵՖազները բազմաենթամիավորային համալիրներ են՝ նման կառուցվածքային և կառավարչային մեխանիզմներով. իոնի տեղափոխման համար օգտագործում են ռոտացիոն շարժիչներ (Cross and Müller, 2004): P-ԱԵՖազները վերը նշվածներից լիովին տարբերվում են իրենց ենթամիավորային կազմով և իոնի տեղափոխման մեխանիզմով:

F₀F₁-ԱԵՖ-սինթազներ

Ըստ Կենսաքիմիայի և Մոլեկուլային Կենսաբանության միջազգային միության նոմենկլատուրային հանձնաժողովի (IUBMB) այս ֆերմենտը կոչվում է «ԱԵՖ ֆոսֆոհիդրոլազ՝ H⁺-տեղափոխիչ»։ Ներկայումս լայնորեն կիրառվում է ֆերմենտի գործառնության թնույթն առավել ընդգծող՝ «ԱԵՖ-սինթազ» անվանումը։ Ծառ կիրառվում են նաև «H⁺-ԱԵՖ-ազ» կամ «F₀F₁-H⁺-ԱԵՖ-ազ» անվանումները։ Գրականության մեջ հանդիպում են նաև այս անվանումները՝ F₁-ԱԵՖ-ազ, F₀F₁-ԱԵՖ-ազ, F-ԱԵՖ-ազ, H⁺-տեղափոխող ԱԵՖ-ազ, միտոքոնդրիումային ԱԵՖ-ազ, քլորոպլաստային ԱԵՖ-ազ, բակտերիական Ca²⁺/Mg²⁺ ԱԵՖ-ազ, ԱԵՖ-սինթազ համալիր, 5-րդ համալիր (Guo et al., 2017):

Կենդանի օրգանիզմների մեծ մասում ԱԵՖ-սինթազի հիմնական գործառնությունը ԱԵՖ-ի սինթեզն է, որից էլ ծագում է ֆերմենտի անվանումը։ Որոշ դեպքերում դարձելի ռեակցիան, երբ ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի հաշվին թաղանթով պրոտոն է տեղափոխվում, ավելի է կարևորվում (Junge and Nelson, 2015): Վերջինիս օրինակը անաերոբ բակտերիաներում խմորման հաշվին ԱԵՖ-ի սինթեզն է. ԱԵՖ-սինթազը սինթեզված ԱԵՖ-ն օգտագործում է պրոտոնաշարժ ուժի ստեղծման համար, որն էլ անհրաժեշտ է իոնի տեղափոխման և մտրակի շարժունակության համար։ Ծառ բակտերիաներ ապրում են իրականացնելով ինչպես խմորում, այնպես էլ շնչառություն կամ ֆոտոսինթեզ (Fenouk and Junge, 2009): Այս օրգանիզմներում ԱԵՖ-

սինթազը գործում է և՛ ԱԵՖ-ի սինթեզի և՛ հիդրոլիզի ուղղությամբ (Lu et al., 2014):

Կարևոր է ԱԵՖ-սինթազի՝ որպես պրոտոնային պոմպի, ակտիվությամբ կարգավորումը այնպիսի պայմաններում, երբ պրոտոնոշարժ ուժի գեներացվում և անհրաժեշտ է խուսափել ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի շռայլումից: Այդպիսի դեպքերում ԱԵՖ-ի հիդրոլիզը դառնում է խնդիր, քանի որ շատ արագ կարող է սպառվել ներքջային ԱԵՖ-ի քանակը: Այս իրավիճակը կանխելու համար բոլոր ԱԵՖ-սինթազների կարգավորող մեխանիզմները ընկճում են ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի արգելակման աստիճանը կախված է օրգանիզմի տեսակից: Բույսերի քլորոպլաստներում, որտեղ անհրաժեշտ է պահպանել ԱԵՖ-ի ընդհանուր քանակը ողջ գիշերվա ընթացքում, ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի արգելակումը շատ ուժեղ է և ֆերմենտն ունենում է միայն ԱԵՖ-սինթազային ակտիվություն: Ի տարբերություն բույսերի, անտերոբ բակտերիաներում, որտեղ ԱԵՖ-սինթազը պրոտոնաշարժ ուժի միակ գեներատորն է, այս արգելակումը շատ թույլ է, իսկ միտոքոնդրիումային ԱԵՖ-սինթազում միջանկյալ վիճակ է:

1.1.1. *Escherichia coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազը

F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազներ հայտնաբերվել են բակտերիաների պլազմային, միտոքոնդրիումների ներքին և քլորոպլաստների տիլակոիդային թաղանթներում, որտեղ ֆերմենտը պրոտոնաշարժ ուժի ազատ էներգիան փոխակերպում է ԱԵՖ-ի քիմիական էներգիայի (Boyer, 1997; Okuno et al., 2011): Աղիքային ցուպիկի պրոտոնային ԱԵՖ-սինթազը մեծ ֆերմենտային համալիր է՝ կազմված երկու հիմնական մասերից՝ կամ «գործոններից»՝ ջրալուծ F_1 մասից, որն էլ իր հերթին կազմված է երեք β և մեկական γ , δ և ϵ ենթամիավորներից, և թաղանթակա F_0 հատվածից՝ կազմված մեկ a , երկու b և տասներկու c ենթամիավորներից (նկ. 1): *E. coli*-ում այս բազմաենթամիավորային համալիրի ընդհանուր մոլեկուլային զանգվածը 520 կԴա է: F_0 -ն 100-150 կԴա մոլեկուլային զանգված (աղ. 1) (Թռչունյան, 2001, Nakamoto et al., 2008) ունեցող պրոտեոլիպիդ է: F_1 -ը ծայրամասային գլոբուլային սպիտակուց է և ունի 350-380 կԴա մոլեկուլային զանգված, որի

Ենթամիավորներն տարբերվում են թաղանթում զբաղեցրած դիրքով, մոլեկուլային զանգվածով, արգելակիչների և միմյանց հետ փոխազդեցությամբ:

Աղյուսակ 1.

Escherichia coli-ի պրոտոնային ԱԵՖ-սինթազի ենթամիավորները
(Nakanishi-Matsui et al., 2016; Sobti et al., 2016; Guo et al., 2019)

Գործոն	Ենթամիավոր	Մոլեկուլային զանգված, կԴա	Ամինաթթվային մնացորդների թիվը	ԱԵՖ-սինթազում ենթամիավորների թիվը	Փոխազդեցությունը ԴՑԿԴ-ի հետ
F₀	a	30	271	1	-
	b	17	156	2	-
	c	8,4	79	6-15	+
F₁	α	55	513	3	-
	β	50	459	3	+
	γ	31,5	287	1	-
	δ	19,5	177	1	-
	ε	15	138	1	-

F₁-ի միավորի β ենթամիավորում կան նուկլեոտիդ կապող երեք կատալիտիկ մասեր և մեկ պրոտոնային անցք ունի՝ կազմված F₀-ի a և c ենթամիավորներից: Ցույց է տրվել, որ ֆերմենտի կատալիտիկ կենտրոններով պրոտոնի տեղափոխումը և՛ ԱԵՖ-ի սինթեզի և՛ հիդրոլիզի ժամանակ բերում է կոնֆորմացիոն ձևափոխությունների և ֆերմենտն աշխատում է՝ որպես ռոտացիոն մոլեկուլային շարժիչ (Junge and Nelson, 2015): Էլեկտրոնային մանրադիտարկամամբ ստացված տվյալները ցույց էին տվել, որ *E. coli*-ի F₀F₁-ԱԵՖ-ազում F₁ մասը կապվում է F₀-ին՝ այսպես կոչված ծայրամասային և կենտրոնական առանցքների միջոցով: Ստացված տվյալները համապատասխանում էին նաև քլորոպլաստների (Hisabori et al., 2013) և միտոքոնդրիումների F₀F₁-ԱԵՖ-ազների մանրադիտակային պատկերներին, որն էլ թույլ տվեց խոսել F₀F₁ և V₀V₁ տիպի պրոտոնային ԱԵՖ-ազների ընդհանուր բնույթի մասին (Yasuda et al., 2001):

Աբրահամսը և մյուսները՝ միտոքոնդրիոմային F_1 միավորի $\alpha\beta\gamma$ ենթահամալիրի կառուցվածքի հետազոտության միջոցով ցույց են տվել, որ γ ենթամիավորը կենտրոնական առանցքի կարևոր բաղադրիչն է (1994), որում γ -ն անցնում է $\alpha\beta\gamma$ -ի կազմած վեցանիստի խոռոչի միջով՝ երկարելով առանցքի ստորին մասում: Ցույց է տրվել, որ ε ենթամիավորը կազմում է կենտրոնական առանցքը (Sielaff et al., 2018): Այսպով իպեպտիդը կազմված է երկու դոմեններից, ունի 15 կԴամոլ եկուլային զանգված և պոմպի ներքին արգելակիչն է (Spetzler et al., 2009): C-ծայրային դոմենի α -պարույրների զույգը հարում է F_1 -ի ներքևի մասին և փոխազդում է վերջինիս α կամ β ենթամիավորների հետ՝ կախված կատալիտիկ կենտրոնում նուկլեոտիդի կապումից: N-ծայրային դոմենը 10-պատիկ պարուրված β ենթամիավորն է, որը մի կողմից կապվում է γ ենթամիավորին, մյուս կողմից՝ c ենթամիավորի օղակին (Cingolani and Duncan, 2011; Bilyard et al., 2013): Ծայրամասային առանցքը կազմված է δ և b ենթամիավորներից: Միջուկամագնիսական ռեզոնանսի (ՄՄՌ) միջոցով ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ δ ենթամիավորը բավականին մեծ α -պարուրած և սպիտակուց է, որն հարում է F_1 միավորի վերին մասին՝ փոխազդելով α ենթամիավորի հետ (Junge et al., 2009): Էլեկտրոնային մանրադիտարկմամբ ստացված նկարներից ցույց է տրվել, որ երեք α ենթամիավորների N-ծայրային հատվածները առաջացնում են «գլխարկ», որն երևում է $E.coli$ -ի F_0F_1 -ի վերին մասում (Capaldi and Aggeler, 2002): Հետազոտությունները ցույց տվեցին նաև, որ b ենթամիավորի C-ծայրային մասը փոխազդում է α և δ ենթամիավորների հետ, որի արդյունքում էլ ծածկվում է F_1 միավորի վերին մասը: Երկու b ենթամիավորները՝ որպես α -պարույրների զույգ, անցնում են F_0F_1 -ի ողջ երկայնքով և փոխազդում լիպիդային երկշերտում (Dimroth et al., 2006):

Երկու առանցքները, կենտրոնական ռոտորը և ծայրամասային ստատորը

F_1 միավորը երեք α - β զույգերից կազմված եռաչափ ֆերմենտ է: Գործունեության ընթացքում երեք կատալիտիկ հատվածները հերթականությամբ պետք է կապվեն մեկ պրոտոնային անցքով ուն: Կոքսը և աշխատակիցները (Cox et al., 1986), հետագայում Բոյերը (Boyer,

1997), նշված կապման բացատրման համար առաջարկեցին այս տեսակետը. ԱԵՖ-ի սինթեզի ընթացքում ֆերմենտի կենտրոնական բաղադրիչը պրոտոնային գրադիենտի հաշվին պտտվում է կատալիտիկ հատվածների միջև մեկ ուղղությամբ: ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի ընթացքում կենտրոնական բաղադրիչը երեք կատալիտիկ հատվածներում պտտվում է հակառակ ուղղությամբ: Էլեկտրոնային մանրադիտարկմամբ հաջողվեց ցույց տալ, որ F_1 միավորի կենտրոնական բաղադրիչը γ ենթամիավորն է: Յետագայում նաև ցույց տրվեց, որ γ -ն ֆիքսված չէ $\alpha\beta\beta$ -ից կազմված վեցանիստում, այլ կարող է փոխազդել երեք $\alpha\beta$ գույգից յուրաքանչյուրի հետ (Morales-Ríos et al., 2015): Ներկայումս հայտնի է, որ ε ենթամիավորը պտտվում է γ -ի հետ միասին (Cingolani and Duncan, 2011): Այժմ առաջարկված է մի մոդել, որում γ - ε կենտրոնական առանցքը, փոխազդելով c ենթամիավորներից կազմված օղակի հետ կազմում է ռոտոր, որը պտտվում է $\alpha\beta\beta\delta b2a$ համալիրին համապատասխան: Այս մոդելում երկրորդ առանցքը՝ $\delta b2$ -ը, գործում է որպես ստատոր (Nakanishi-Matsui et al., 2016): c ենթամիավորի պտույտը a ենթամիավորի հարևանությամբ բերում է պրոտոնի տեղափոխմանը: ԱԵՖ-ով պայմանավորված պրոտոնի տեղափոխումը չի արգելակվում γ -ի և ε -ի կամ ε -ի և c ենթամիավորի կապումից, մինչդեռ γ -ի կամ ε -ի կապումը α կամ β ենթամիավորներից մեկին բերում է արգելակման (Capaldi and Aggeler, 2002): ԱԵՖ սինթազի գործունեության վրա չի ազդում նաև δ -ի կամ b -ի կապումը α -ի հետ (Stewart et al., 2013): Լուսածորող մանրադիտակի միջոցով ε -ի պտույտի ուղղակի դիտարկումն էլ ցույց տվեց γ և ε ենթամիավորների համատեղ պտույտը: Յետագոտություները ցույց են տվել, որ δ ենթամիավորի ծայրային 105 ամինթթվային մնացորդները ձևավորում են 7 α -պարուրած և հատվածներից կազմված մի փաթույթ (Cingolani and Duncan, 2011): Ինչպես արդեն նշվել էր, *E.coli*-ի F_0 գործոնը երեք ենթամիավորներից կազմված պրոտեոլիպիդ է, որի ենթամիավորները տարբերվում են մոլեկուլային զանգվածով, թաղանթում զբաղեցրած տարածական դիրքով և այլ հատկանիշներով: ՄՄՌ-ի միջոցով որոշվել է c ենթամիավորի կառուցվածքը և ցույց է տրվել, որ այն 8.4 կԴա մոլեկուլային զանգված ունեցող սպիտակուց է, որն ունի

կարճ բնեռային օղակի միջոցով միմյանց կապված 2 α -պարուրած և հատվածներ (Pogoryelov et al., 2012; Preiss et al., 2014):

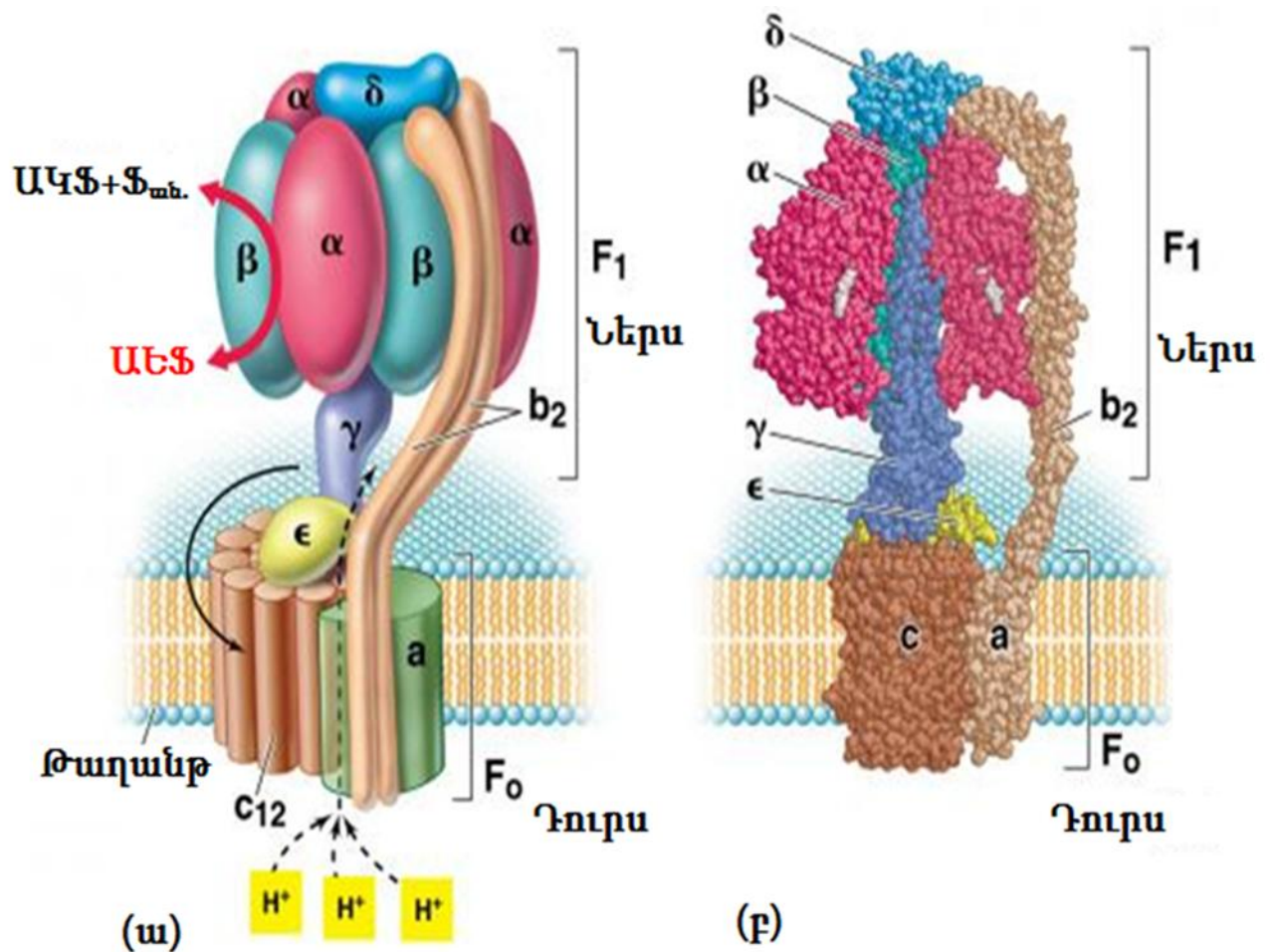
Ըստ մոլեկուլային մոդելավորման և ցիստեինային մնացորդների փոխազդեցության փոփոխությունների ուսումնասիրությունների՝ *E. coli*-ի F_0 ենթամիավորի բոլոր c ենթամիավորները ձևավորում են օղակաձև կառուցվածք, որում ծայրային կարբօքսիլ պարույրներն ուղղված են դեպի օղակի ներս, իսկ ծայրային ամինո պարույրներն ընկած են ներքին կողմում (Oberfeld et al., 2006): c ենթամիավորներից կազմված օղակին հաջորդում է a ենթամիավորը, որն 30 կԴա մոլեկուլային զանգվածով հիդրոֆոբ սպիտակուց է, որում հայտնաբերվել են 5-7 α -պարուրած և հատվածներ (Fillingame et al., 2003): Ըստ որոշ մոդելների՝ a ենթամիավորը F_0F_1 համալիրի ստատորի բաղկացուցիչ մասն է և պետք է, որ կապված լինի $\alpha 3\beta 3$ վեցանիստի հետ:

Հարկ է նշել, որ F_0 -ի երկու ամինաթթվային մնացորդներ չափազանց կարևոր են ենթահամալիրով պրոտոնի տեղափոխման համար: Դրանցից առաջինը c ենթամիավորի ներթափանցային երկրորդ α -պարույրի մեջտեղի հատվածի գլուտամինն է, իսկ որոշ օրգանիզմներում ասպարազին ամինաթթուն է: Երկրորդը a ենթամիավորի ներթափանցային պարույրի վերջին արգինին ամինաթթվային մնացորդն է: Ցույց է տրվել, որ այս ամինաթթուների բոլոր մուտացիաները հանգեցնում են ֆերմենտի ակտիվության լիակատար արգելակմանը (Araki et al., 2013):

Ընդհանրացնելով վերը նշվածը և ընդունելով ԱԵՖ-սինթազի աշխատանքում ռոտացիոն կամ պտտողական կառավարիչի երևույթը՝ համալիրը կարելի է դիտարկել որպես ստատորային և ռոտորային բաժիններից կազմված պտտվող շարժիչ (Capaldi and Aggeler, 2002; Sobti et al., 2016): Ստատորը կազմված է $\alpha 3\beta 3$ վեցանիստից և F_0 -ի a ենթամիավորից, որոնք կապված են $\delta b 2$ համալիրով, իսկ ռոտորը կամ պտտվող հատվածը կազմված է γ - ϵ դիմերից և c ենթամիավորներից կազմված օղակից, որն էլ իրականացնում է պրոտոնների տեղափոխությունը ԱԵՖ-ի սինթեզի կամ հիդրոլիզի ընթացքում:

1.1.2. F_0F_1 համալիրի աշխատանքի մեխանիզմը և ռոտացիոն կառավարիչը

Համաձայն քեմիոսմոսային տեսության՝ F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազի F_0 միավորով պրոտոնների հոսքը շարժման մեջ է դնում F_1 -ի երեք կատալիտիկ հատվածներում ԱԵՖ-ի սինթեզը (Mitchell, 2011), սակայն հարկ է նշել, որ այս տեսությունը լիովին չի բացատրում ԱԵՖ-ի սինթեզի մեխանիզմը: Տարբեր փորձարարական տվյալներով ցույց է տրվել ԱԵՖ-սինթազի աշխատանքի ռոտացիոն կատալիզային մեխանիզմը, ըստ որի պրոտոնային գրադիենտի զուգորդումը F_1 -ի ակտիվ կենտրոնում ֆոսֆորական թթվի մնացորդի և ԱԿՖ-ի կապման և արդյունքում՝ ԱԵՖ-ի անջատման հետ, իրագործվում է γ ենթամիավորի սեփական առանցքի շուրջ պտտման կամ ռոտացիայի միջոցով, ինչի համար էլ օգտագործվում է $\Delta\mu_{H^+}$ -ը (Nakamoto et al., 2008; Okuno et al., 2011):



Նկ. 1. *Escherichia coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազի գծապատկերը (սխեմատիկ (ա), ռենտգենային (բ)), ենթամիավորների կազմակերպումը: H^+ իոնները մուտք են գործում պերիպլազմային տարածությունից և

պրոտոնացնում Ե ենթամիավորը, որը շարժվում է ժամսլաքի հակառակ ուղղությամբ և հանդիպելով դեպի ցիտոպլազմ ուղղված կիսասնցք ուղուն՝ անջատում H^+ իոնները (Nakamoto et al., 2008; Okuno et al., 2011) (www.atpsyntase.info):

Ըստ ամերիկացի կենսաէներգետիկոս Պոլ Բոյերի աղիքային ցուպիկի β ենթամիավորների նուկլեոտիդ կապող երեք կատալիտիկ կենտրոններն էլ մասնակցում են կատալիզին՝ միմյանց հետ կոոպերատիվ ձևով փոխազդելով (Boyer, 1997): Մեկ ակտիվ կենտրոնում ԱԿՖ-ի կապումը նպաստում է մյուս կենտրոնից սինթեզված ԱԵՖ-ի անջատմանը: Ցուլի մկանների միտոքոնդրիումի F_1 միավորի բյուրեղային կառուցվածքի ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ β ենթամիավորների միայն երեք կենտրոններն են իրականացնում կատալիտիկ գործառույթ, մինչդեռ α ենթամիավորների նուկլեոտիդային կենտրոնները ունեն կառուցվածքային (կապում են α և β ենթամիավորները): F_1 միավորի առանհատկություններից է նաև այն, որ երեք կատալիտիկ կենտրոնները օժտված են նուկլեոտիդների նկատմամբ տարբեր խնամակցությամբ: Կենտրոններից մեկը՝ «T-կենտրոն»-ը (անգլերեն Tight՝ ամուր բառի սկզնատառից) ունի չափազանց բարձր խնամակցություն ԱԵՖ-ի կամ ԱԿՖ+ P_i -ի նկատմամբ, երբ կապման հաստատունը դրանց համար տատանվում է 10^{-12} -- 10^{-8} Մ սահմաններում: Մյուս երկու «L» և «O» կենտրոնները (անգլերեն Loose՝ ազատ և Open՝ բաց բառերի սկզբնատառերից) կապում են նուկլեոտիդներ միայն դրանց բարձր կոնցենտրացիայի դեպքում (10^{-6} -- 10^{-3} Մ) և ամենայն հավանականությամբ օժտված են ԱԵՖ-ի և ԱԿՖ-ի նկատմամբ տարբեր ընտրողականությամբ (Abrahams et al., 1996; Nakamoto et al., 2008): Նշված կատալիտիկ կենտրոնները տարբերվում են կոնֆորմացիոն վիճակներով: ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի ընթացքում տեղամասերի կոնֆորմացիոն անցումներն հաջորդում են հետևյալ կերպ՝ $O \rightarrow T \rightarrow L$:

Նոբելյան մրցանակակիր (1997 թվ.), անգլիացի Ջոն Ուոլկերի կողմից ցույց տրվեց, որ γ ենթամիավորի կոնֆորմացիոն փոփոխությունները բերում են $\alpha\beta\beta$ համալիրի կոնֆորմացիոն

փոփոխությունների (Stewart et al., 2013): Ռենտգեն վերլուծության, ձևափոխվող նյութերի, տարբեր հակամարմինների, ուղղորդված մուտագենեզի և այլ փորձարարական մեթոդների միջոցով ցույց է տրվել և ապացուցվել է չենթամիավորի պտույտը (Watanabe et al., 2014):

Աղիքային ցուպիկի F_1 ենթահամալիրի ռենտգենաբյուրեղային ուսումնասիրության տվյալները բացահայտել են, որ չենթամիավորի 236-246-րդ և 269-286-րդ դիրքերում գտնվող ամինաթթվային մնացորդների կոնֆորմացիոն փոփոխությունները, հատկապես 242-րդ դիրքի արգինինի և 269-րդի գլուտամինի մասնակցությամբ հաջորդաբար փոխանցվում են β ենթամիավորներին (Nakanishi-Matsui et al., 2016):

F_0F_1 -ի կողմից ԱԵՖ-ի սինթեզի ընթացքում չենթամիավորը պտտվում է 120° -ի քայլով՝ ժամսաքին հակառակ, իսկ հիդրոլիզի ժամանակ դիտվում է գործընթացների հակառակ հաջորդականությունը և γ -ի պտույտ ժամսլաքի ուղղությամբ (Noji et al., 2017):

Ստացված տվյալները փաստում էին F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազում ռոտացիոն կատալիզը, որը երկրորդ պտտվող շարժիչն է կենդանի բջիջներում՝ բակտերիաների մորակների հետ: Սակայն այս համալիրում ենթամիավորների փոխադեցության, կառուցվածքային փոփոխությունների, վարքի մասին պատկերացումները հեռու են միանշանակ լինելուց:

Յուրահատուկ են նաև պրոտոնային ԱԵՖ-սինթազի աշխատանքի կարգավորման մեխանիզմները: Բազմաթիվ փորձարարական տվյալներ ցույց են տվել, որ տարբեր ֆիզիոլոգիական պայմաններում այս ֆերմենտի ակտիվության վրա ազդում են տարբեր կարգավորիչ ուժեր, օրինակ, օքսիդալերական գնդակական պրոտենցիալը, արտաքին միջավայրի pH-ը, *in vivo* պայմաններում՝ ԱԿՖ-ն ու պրոտոնաշարժ ուժը, միտոքոնդրիումային ԱԵՖ-սինթազի դեպքում էլ IF_1 կարգավորիչ սպիտակուցը (Groth et al., 2002; Feniouk and Junge, 2009):

Bacillus PS3 բակտերիայի $\alpha 3\beta 3\gamma$ համալիրի եզակի մոլեկուլի մակարդակում արված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ԱԿՖ-արգելակումը պայմանավորված է չենթամիավորի պտույտի երկար կանգ առնելով (Hirono-Hara et al., 2001; Sakaki et al., 2005): Այս կանգը տեղի է

ունենում, երբ 80° անկայն տակ γ -ն արգելակվում է ֆերմենտի՝ այսպես կոչված «ԱԵՖ-սպասող» կարգավիճակում: Մեկ տասներորդական վայրկյան անց տեղի է ունենում ինքնաբուխ վերակտիվացում, սակայն արտաքին ուժերի միջոցով այս դիրքի ֆիքսման դեպքում արգելակումն ամբողջությամբ վերականգնվում է: Ենթադրվում է, որ ինքնաբուխ ակտիվացումը պայմանավորված է γ -ի ստոքաստիկ պտտողական տատանումներով: Այս կարծիքը հաստատվում է, երբ γ -ի ստիպողական պտույտը $>40^{\circ}$ -ով նվազեցնում է ԱԿՖ-արգելակումը (Hirono-Hara et al., 2005): Տարբեր օրգանիզմների F_0F_1 համալիրների փորձարարական ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ամուր կապված ԱԿՖ-ի արգելակումը կարող է «դուրս մղվել» $\Delta\mu_{H^+}$ -ով (Koumandou and Kossida, 2014; Nakanishi-Matsui et al., 2016): Այս երևույթն ընկած է այսպես կոչված « $\Delta\mu_{H^+}$ -ակտիվացման» կամ թաղանթի՝ կարճաժամկետ էլեկտրականացումից հետո ԱԵՖ-ազային ակտիվության բարձրացման հիմքում: ԱԿՖ-արգելակումը բոլոր ԱԵՖ-սինթազներին բնորոշ առանձնահատկությունն է, սակայն շատ են այս արգելակման վրա ազդող գործոնները, օրինակ՝ անօրգանական ֆոսֆորը (S_{an}):

Ուսումնասիրվել է նաև ներբջջային pH-ի ազդեցությունը պրոտոնային ԱԵՖ-ազի ակտիվության վրա *Enterococcus hirae* բակտերիայում (Minamino et al., 2003): Ցույց է տրվել, որ միջավայրի pH-ի նվազման դեպքում (pH 8,0-ից 5,3), երբ ներբջջային pH-ը նվազում է իր հաստատուն արժեքից՝ թաղանթակապ ԱԵՖ-ազի մակարդակը քառապատկվում է: Չնայած, որ բակտերիաներն ընդունակ են հաստատուն պահել ներբջջային pH-ը՝ չեզոք կամ թույլ հիմնային սահմաններում, բայց և այնպես արտաքին թթվային պայմաններում բակտերիաների աճման դեպքում դիտվում է ներբջջային pH-ի նվազում (Zakharyan and Trchounian, 2001): Ցույց է տրվել, որ ներբջջային pH-ի որևէ փոփոխություն չի ազդում ֆերմենտը գաղտնագրող օպերոնի ակտիվության վրա և ԱԵՖ-ազի քանակի ավելացումը պայմանավորված չէ այդ օպերոնի տրանսկրիպտային ակտիվության խթանմամբ (Arikado et al., 1999): ԱԵՖ-ազի ենթամիավորների սինթեզը pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում տեղի է ունենում նույն քանակությամբ, բայց տարբեր pH-ներում սինթեզված

ենթամիավորների վերականգնումը թաղանթում տարբեր մակարդակով է ընթանում, ինչի մասին են վկայում ցիտոպլազմում չմիավորված α և β ենթամիավորները: Փաստորեն, ներբջջային pH-ի ազդեցություները β -համալորման վրա ակնառու է հատկապես՝ սինթեզված ենթամիավորներից β -համալորման փուլում (Arikado et al., 1999): Պրոտոնային ԱԵՖ-ազի ակտիվության կախվածություները ներբջջային pH-ից որոշիչ դեր ունի հենց ներբջջային pH-ի կարգավորման գործում (Booth, 2007):

Պրոտոնային ԱԵՖ-ազի ակտիվության վրա ազդող գործոններից է նաև օքսիդադերակնգնողական կամ ռեդոքս պոտենցիալը: Տարբեր օքսիդադերակնգնողական պայմաններում ուսումնասիրվել է բլորոպլաստային F_1 -ԱԵՖ-ազի γ ենթամիավորի պտույտը (Nakanishi-Matsui et al., 2016): Այս ԱԵՖ-ազն ունի կառուցվածքային շատ ընդհանրություններ այլ օրգանիզմներից անջատված համանման β -համալորման հետ: Բարձրակարգ բույսերի բլորոպլաստներից անջատված պրոտոնային ԱԵՖ-սինթազի (CF_0CF_1) ակտիվություները կարող է կարգավորվել γ -ի դիսուլֆիդային կապերի վերականգնման միջոցով (Datiles et al., 2008): CF_0CF_1 ռեդոքս կարգավորման ուսումնասիրման նպատակով բլորոպլաստային γ ենթամիավորի ռեդոքս զգայուն փոխարկիչային հատվածը ներմուծվել է *Bacillus* PS3 բակտերիայի γ -ի կազմ և ցույց է տրվել, որ կարգավորիչ տեղամասի պտույտը $\alpha 3\beta 3$ վեցանիստում կապված է հենց կարգավորիչ տեղամասի ռեդոքս վիճակից: Օքսիդադերակնգնողական պոտենցիալի բարձր արժեքի դեպքում, կարգավորիչ տեղամասը գտնվելով օքսիդացված վիճակում, նվազեցնում է γ -ի պտույտների թիվը՝ բերելով ԱԵՖ-ազային ակտիվության նվազմանը, իսկ վերականգնված վիճակում դիտվում է ակտիվության մոտերեք անգամ աճ (Hisabori et al., 2003):

1972 թվականին Նելսոնը և մյուսները ցույց են տվել, որ ϵ -ն արգելակում է բլորոպլաստային F_1 -ում ԱԵՖ-ի հիդրոլիզը (Junge and Nelson, 2015): Հետագայում նման արգելակիչ ազդեցություներ հայտնաբերվել և ուսումնասիրվել է նաև *E.coli*-ի F_1 ենթահամալիրում: Ցույց է տրվել, որ բակտերիական ϵ ենթամիավորի արգելակիչ ազդեցություները պայմանավորված է C ծայրային դոմենով (Nakanishi-Matsui et al., 2016): *E.coli*-ի F_0F_1 -ի C ծայրային դոմենի

հեռացումը 1,5 անգամ մեծացնում է ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի արագությունը, իսկ ԱԵՖ-ի կոնցենտրացիայի 50 մկՄ-ից մինչև 5 մՄ միջակայքում դիտվում է հաստատուն արգելակող ազդեցություն (Hong and Pedersen, 2008): Հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ϵ -ի արգելակիչ ազդեցության բնույթը խիստ տարբեր է բազմաթիվ տեսակներում: Օրինակ, ջերմահիմնայնաեր *Bacillus* TA2.A1 բակտերիայի F_0F_1 -ում այս արգելակումը կախված է ԱԵՖ-ի կոնցենտրացիայից. 50 մկՄ-ից մինչև 2 մՄ ԱԵՖ-ի դեպքում արգելակումը նվազում է՝ համապատասխանաբար 7 և 3 անգամ (Keis et al., 2006): ϵ -ի արգելակիչ ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմները պարզաբանելու համար՝ Ուիլսը և Ռոջերսը ուսումնասիրել են են *E.coli*-ի F_0F_1 -ի չհամալիրը և ցույց տվել, որ ϵ -ի C ծայրային դոմենի α -պարունյրները չեն մազակալի տեսքով չեն, այլ ձգված են γ -երկայնքով դեպի $\alpha 3\beta 3$ վեցանիստը: Հետագայում ցույց է տրվել նաև, որ *Bacillus* PS3 բակտերիայի F_0F_1 -ի ϵ -ի C ծայրային դոմենի ձգվածությունը կարող է հասնել մինչև γ -ի N ծայրային դոմենին (Pogoryelov et al., 2012, Krah et al., 2018): Բացահայտվել է, որ ԱԵՖ-ի բացակայության պայմաններում գերակայում է ϵ -ի C ծայրային դոմենի ձգված կարգավիճակը, իսկ ԱԵՖ-ի ներկայությամբ՝ պարունված կարգավիճակը: *Bacillus* PS3 բակտերիայում նշված կոնֆորմացիոն կարգավիճակների գործառական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ϵ -ի ձգված կարգավիճակն արգելակում է F_0F_1 -ի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը, բայց գրեթե չի ազդում ԱԵՖ-ի սինթեզի վրա: Համանման տվյալներ ստացվել էին նաև *E.coli*-ի F_0F_1 -ի համար (Sielaff et al., 2018):

Ներկայումս՝ ԱԵՖ-սինթազի աշխատանքի մեխանիզմի պարզաբանման քեմիոսոմոսային տեսությունից զատ առաջարկվում են նաև այլ վարկածներ: Ըստ անգլիացի կենսաֆիզիկոս Ռ. Վիլյամսի նյութերի օքսիդացման և ԱԵՖ-ի սինթեզի գործընթացները զուգորդվում են ոչ թե թաղանթի լայնքով $\Delta\mu_{H^+}$ -ի առաջացման շնորհիվ, այլ թաղանթի ներսում էլեկտրոնների տեղափոխման շղթայից դեպի $F_0F_1 H^+$ իոնների տեղափոխման հաշվին. նա առաջարկում է **տեղային էներգիային զուգորդման վարկածը** (Williams, 1978): H^+ -ների տեղափոխման արագությունը թաղանթի լիպիդային

երկշերտով՝ գերազանցում է ջրային փուլով անցման արագությանը: Աղիքային ցուպիկի թաղանթում հայտնաբերվել են H^+ տեղափոխող սպիտակուլներ, որոնք կարող են հանդես գալ որպես էլեկտրոնների տեղափոխման շղթայի և F_0F_1 -ի կապ (Թռչունյան, 2001): Սակայն ջրային փուլում 2,5 մվրկ-ում պրոտոնների անցած 10 մկմ հեռավորությունը՝ մոտավորապես հազար անգամ գերազանցում է միտոքոնդրիումների ներքին թաղանթներում F_0F_1 -ի և էլեկտրոնների տեղափոխման շղթայի միջև հեռավորությանը, հետևաբար պրոտոնների տեղափոխման արագացման այս հատուկ ուղու անհրաժեշտությունն այնքան էլ ընդունելի չէ:

Ըստ ռուս կենսաէներգետիկոս Վլադիմիր Սկուլաչեվի, ԱԵՖ-սինթազի շուրջը՝ մինչև 4 նմ հեռավորությամբ թաղանթով H^+ իոնների տեղափոխման հաշվին ստեղծվում է էլեկտրական դաշտ, որն էլ խթանում է ջրային փուլից պրոտոնների անցումը դեպի F_0F_1 և վերջինիս աշխատանքը (Skulachev et al., 2013): Ստեղծված դաշտի դերը կարող է լինել էական, երբ պրոտոնային պոտենցիալը փոքր է ԱԵՖ-ի սինթազի համար անհրաժեշտ արժեքից:

Վերը նշված վարկածներից բացի առաջարկվել են նաև էներգետիկ գույքորդման այլ վարկածներ և տեսություններ ևս, սակայն դժվար է միանշանակ ընդունել կամ ժխտել դրանցից որևէ մեկը:

1.1.3. ԱԵՖ-ազի արգելակիչները

Գոյություն ունեն F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազի տարբեր արգելակիչներ, այդ թվում և՛ օրգանական և՛ անօրգանական ծագման, որոնցից մեծ մասը թունավոր են: Արգելակիչների խումբը բաժանվում է երկու ենթախմբի՝ արգելակիչներ, որոնք մենահատուկ են F_0 ենթամիավորի համար, և արգելակիչներ F_1 ենթամիավորի համար:

F_0 ենթամիավորի արգելակիչներ. Օլիգոմիցինը, կապվելով ֆերմենտի F_0 -ի a ենթամիավորի և c օղակի հետ, արգելակում է F_0 -ով պրոտոնի ռոտացիոն տեղափոխումը F_0 -ում (օլիգոմիցին բառից գալիս է F_0 -ի «o» տառը): Տարօրինակ է, բայց օլիգոմիցին զգայուն սպիտակուլ չէ (O2U) տեղակայված է ֆերմենտի F_0 հատվածից բավականին հեռու: Այս ենթամիավորն անհրաժեշտ է F_1 -ը F_0 -ին

միացնելու համար, որի պատճառով էլ F_1 -ը նույնպես զգայուն է օլիգոմիցինի նկատմամբ, սակայն հարկ է նշել, որ արգելակչի միայն բարձր կոնցենտրացիներն են ազդում F_1 -ի վրա (Nicholls and Ferguson, 2013): Օլիգոմիցինը մենահատուկ է միտոքոնդրիումային ԱԵՖ-սինթազի համար և չնչին կոնցենտրացիաները բավական են F_0 -ով պրոտոնի տեղափոխումը արգելակելու համար: Քլորոպլաստային և բակտերիական ԱԵՖ-սինթազները, այդ թվում և *E.coli*-ինը, ունեն ցածր զգայնություն օլիգոմիցինի նկատմամբ: Սակայն որոշ բակտերիաների ԱԵՖ-սինթազները, որոնք նման են միտոքոնդրիումային ԱԵՖ-սինթազին, օրինակ ծիրանագույն բակտերիա *Rhodobacter capsulatus*-ինը՝ նույնպես զգայուն են օլիգոմիցինի նկատմամբ: Օլիգոմիցինի կապման հստակ հատվածը F_0 -ում հայտնի չէ: Պետք է նշել, որ միտոքոնդրիումային F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազի O2U-ն համարժեք է *E.coli*-ի ծենթամիավորին, իսկ ε -ը՝ ոչ:

ԴՅԿԴ-ն (N,N'-դիցկլոհեքսիլ կարբոդիիմիդ կամ 1,3-դիցկլոհեքսիլ կարբոդիիմիդ), որն ամենից վաղ հայտնաբերված արգելակիչն է, օրգանական ծագման փոքր մոլեկուլ է, որը կարող է կովալենտ կերպով ձևափոխել պրոտոնացված կարբօսիլ խմբերը: pH-ը մոտավորապես 8 արժեքի դեպքում, ԴՅԿԴ-ն գրեթե բացառապես բոլոր դեպքերում փոխազդում է ծենթամիավորի թթվային ամինաթթվային մնացորդների հետ (այդ պատճառով հաճախ ծենթամիավորը կոչվում է «ԴՅԿԴ-կապող սպիտակուց»), որի պատճառով ռեակցիայի pK-ն բարձրանում է և pH-ի այդքան բարձր արժեքի դեպքում տեղի է ունենում պրոտոնացում: Մեկ ծենթամիավորի կարբօքսիլ խմբերի ձևափոխումն էլ բավարար է ամբողջ օղակի ապակտիվացման համար (Toei and Noji, 2013): ԴՅԿԴ-ի՝ ծենթամիավորի հետ կովալենտ կապման պատճառով, այս արգելակումը անդարձելի է: Մինչև հիմա հայտնի բոլոր ԱԵՖ-սինթազների ծենթամիավորներում կան խտացված ամինաթթվային մնացորդների կարբօքսիլ խմբեր, այդ պատճառով ԴՅԿԴ-ն համարվում է համապիտանի արգելակիչ, որն ազդում է ինչպես բակտերիական, այնպես էլ միտոքոնդրիումային և քլորոպլաստային ԱԵՖ-սինթազների վրա: Որոշ դեպքերում V և A տիպի պրոտոն տեղափոխող ԱԵՖ-ազները, նատրիումական ԱԵՖ-սինթազը ևս զգայուն են ԴՅԿԴ-ի նկատմամբ:

ԴՅԿԴ-ն որոշակի պայմաններում ($pH < 7$) ձևափոխում է նաև F_1 ենթամիավորի որոշ կարբոքսիլ խմբեր և ապակտիվացնում այն, այդ պատճառով էլ այս միացությունը համարվում է երկու ենթամիավորների արգելակիչ: Բայց և այնպես F_0 -ի զգայնությունն արգելակչի նկատմամբ ավելի մենահատուկ է:

Վենտուրիցիդին-ը (Ասֆոմիցին) հակաբիոտիկ է, որն անջատվել է *Streptomyces sp.* և ի սկզբանե նկարագրվել որպես հակասնկային նյութ: Հետագայում հայտնաբերվեց, որ վենտուրիցիդինը ԱԵՖ-սինթազի պոտենցիալ արգելակիչ է, որն յուրահատուկ կերպով արգելակում է F_0 -ի միջով պրոտոնի տեղափոխումը (Nicholls and Ferguson, 2013): Օլիգոմիցինի նման, այն կապվում է α ենթամիավորի և c -օղակի օլիգոմերի հպման հատվածին: Այս արգելակիչը արդյունավետորեն արգելակում է ինչպես միտոքոնդրիումային, այնպես էլ բակտերիաների և քլորոպլաստների ԱԵՖ-սինթազները: Na^+ տեղափոխող ԱԵՖ-սինթազը նույնպես խիստ զգայուն է վենտուրիցիդինի նկատմամբ: Այն արգելակում է նաև F_1 -ի ակտիվությունը, եթե այն լավ կապված F_0 -ի հետ: Սրա շնորհիվ այս արգելակիչը ենթամիավորների կապման արդյունավետությունը ստուգելու լավ թեստ է: Ի տարբերություն ԴՅԿԴ-ի, այն ազդում է շատ ավելի արագ, հարմար է օգտագործման համար և կարելի է պահել խիտ լուծույթի տեսքով՝ միաժամանակ պահպանելով արգելակիչ հատկությունը: Պետք է նշել, որ F_0 -ի խնամակցությունը վենտուրիցիդինի նկատմամբ շատ բարձր է: 2-5 նՄ վենտուրիցիդինն արգելակում է *Rhodobacter capsulatus*-ի ԱԵՖ-ազի առավելագույն ակտիվության կեսը:

Հայտնի են F_1 **ենթամիավորի** մի քանի **արգելակիչներ**, որոնցից ամենահայտնին **ԼՖՏ-ՑԻ-ն** է (4-քլորո-7-նիտրոբենզոֆոնրազան), որն էլ մենահատուկ կերպով կապվելով β շղթաներից մեկի թիրոզինային մնացորդի հիդրօքսիլ խմբի հետ՝ ամբողջությամբ արգելակում է ֆերմենտը (Dadi et al., 2009): Այս կերպ ցույց տրվեց, որ β շղթան կատալիտիկ հատված է և հաստատվեց, որ երեք β ենթամիավորների երեք տարբեր կատալիտիկ հատվածները չեն կարող գործել միմյանցից անկախ:

Ազիդը ընտրողաբար արգելակում է ԱԵՖ-սինթազի միայն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ չազդելով ԱԵՖ-սինթազային ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ արգելակիչը միտոքոնդրիումային F_1 -ում կապվում է կառավարիչ հատվածի MgԱԿՖ-ին և հավանաբար կանխում ԱԿՖ-ի ելքը այդ հատվածից (Bowler et al., 2006):

Տենտոքսինը *Alternaria* տեսակի սնկերից անջատված ֆիտոտոքսին է: Այն մենահատուկ կերպով արգելակում է քլորոպլաստների ԱԵՖ-սինթազը և չի ազդում բակտերիական ու միտոքոնդրիումային ֆերմենտի վրա (Hong and Pedersen, 2008): Կան որոշ քլորոպլաստային ԱԵՖ-սինթազներ, որոնք տենտոքսին-կայուն են: Արգելակիչը կապվում է α և β ենթամիավորների միջև եղած տարածությանը՝ փակելով F_1 -ի N-ծայրը: Տենտոքսինի ցածր կոնցենտրացիաները՝ 1-10 մկՄ քանակները, արգելակում են ԱԵՖ-ի հիդրոլիզը, մինչդեռ ավելի բարձր կոնցենտրացիաների դոզքում արգելակումն ավելի թույլ է:

Էֆրապեպտինը կամ **A23871-ը** փոքր պեպտիդային հակաբիոտիկների խմբի ընդհանուր անվանումն է, որը կապվում է F_1 -ի հետ բարձր խնամակացությամբ՝ արգելակելով և՛ ԱԵՖ-ի սինթեզը և՛ հիդրոլիզը (Gledhill and Walker, 2005): Հորթի միտոքոնդրիումի F_1 ենթամիավորի բյուրեղների ռենտգեն ճառագայթման պատկերի միջոցով ցույց է տրվել արգելակչի կապման հատվածը: Այն ֆիքսում է γ ենթամիավորը և արգելակում վերջինիս պտույտը: Էֆրապեպտինը պոտենցիալ արգելակիչ է միտոքոնդրիումային և որոշ բակտերիական ԱԵՖ-սինթազների համար: Առաջին անգամ Էֆրապեպտինի արգելակիչ ազդեցությունը ցույց է տրվել *Rhodospirillum rubrum* ծիրանագույն բակտերիայի քրոմատոֆորի վրա, իսկ քլորոպլաստային ԱԵՖ-սինթազը ցուցաբերում է միջին զգայնություն այս արգելակչի նկատմամբ:

F_1 -ի ենթամիավորի արգելակիչ է նաև **ֆլյուրո-ալյումինադ** (AIF₄):

1.2. Խմորման առանձնահատկությունները բակտերիաներում գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորումը աղիքային ցուպիկում

1.2.1. Խմորման ընդհանուր բնութագիրը. մրջնաթվային կամ խառը խմորում

Բոլոր կենդանի օրգանիզմների կենսագործունեության անհրաժեշտ պայմանը էներգիայի ստացումն է, իսկ հիմնական էներգակիրն ԱԵՖ-ն է (Թեչոուսյան, 2001; Nicholls and Ferguson, 2013): Այս մոլեկուլը հայտնաբերվել է 1929 թվականին՝ Յարվարդի Բժշկական դպրոցի գիտնականներ Կարլ Լոմանի և Սայրուս Ֆիսկեի կողմից, իսկ 1941 թվականին Ֆրից Լիպմանը ցույց տվեց, որ ԱԵՖ-ը բջջի հիմնական էներգիակիրն է:

ԱԵՖ-ի հիմնական գործառույթը՝ բջջում ընթացող բազմաթիվ կենսաքիմիական և ֆիզիոլոգիական գործընթացների՝ էներգիայով ապահովումն է: Բոլոր բջիջներում, այդ թվում՝ բակտերիաներում, ԱԵՖ-ն առաջանում է ԱԿՖ-ի ֆոսֆորիլացմամբ: Հայտնի է ԱԿՖ-ի ֆոսֆորիլացման երեք ուղի՝ սուբստրատային ֆոսֆորիլացում կամ խմորում, օքսիդատատիվ ֆոսֆորիլացում կամ շնչառություն, ֆոտոֆոսֆորիլացում կամ ֆոտոսինթեզ: Նշվածներից համեմատաբար պարզ ուղի է խմորումը: Խմորումը անթթվածին պայմաններում, էլեկտրոնների արտաքին ակցեպտորների բացակայությամբ ընթացող օրգանական միացությունների (օրինակ՝ ածխաջրերի) նյութափոխանակային գործընթաց է, որի արդյունքում ԱԿՖ-ի ֆոսֆորիլացման հաշվին առաջանում է ԱԵՖ:

Դեռևս 19-րդ դարի 2-րդ կեսին՝ Լուի Պաստյորը, անաերոբ խմորումը նկարագրել էր որպես «la vie sans l'air», որը ֆրանսերենից թարգմանած նշանակում է՝ «կյանք առանց օդի»: Ներկայումս, առանձնացվում են անաերոբ մանրէների 3 ֆիզիոլոգիական խմբեր. 1) անաերոբ ֆոտոտրոֆներ, 2) անաերոբ շնչողներ, որոնց թվին են պատկանում դենիտրիֆիկացնող մանրէները, սուլֆատ, մեթան արտադրողները և հոմոացետոն արտադրողները, որոնք թթվածնի բացակայության պայմաններում որպես էլեկտրոնի ակցեպտոր

օգտագործում են նիտրատը, սուլֆատը և ածխածնի երկօքսիդը, և 3-րդ խումբը՝ խմորող օրգանիզմներ:

Խմորման պայմաններում սուբստրատն օքսիդանում է մասնակի, և միայն նրանում պահեստավորված էներգիայի փոքր քանակն է փոխակերպվում էներգիայի այլ տեսակի: Խմորող օրգանիզմների մեծ մասում, ԱԵՖ-ն արտադրվում է սուբստրատի ֆոսֆորիլացմամբ, բայց քիչ չեն նաև օրինակներն, երբ ֆոսֆորիլացման շարժիչ ուժը լրացուցիչ իոնային գրադիենտն է (կա՛մ պրոտոնային՝ $\Delta\mu_{H^+}$ կա՛մ նատրիումական՝ $\Delta\mu_{Na^+}$), որն առաջանում է էլեկտրոնների տեղափոխմամբ, օրինակ, մրջնաթթվի օքսիդացման ժամանակ: Վերը նշվածի օրինակներ են նաև դեկարբօքսիլացումը, իոնակաա արգասիքի հոսքը և սուբստրատ-արգասիք հակատեղափոխումը (Dimroth and Schink, 1998):

Կարելի է ասել, որ խմորումը օքսիդալերական գնողական ռեակցիա է, երբ մեկ սուբստրատի օքսիդացումը բերում է մեկ այլ սուբստրատի վերականգնմանը: Խմորման հիմնական ռեակցիաներում միևնույն սուբստրատը կարող է օգտագործվել և՛ որպես օքսիդիչ և՛ որպես վերականգնիչ, մինչդեռ որոշ ամինաթթվային խմորում իրականացնող օրգանիզմներում մեկ ամինաթթուն օքսիդանում է, իսկ մյուսը՝ վերականգնվում: Օքսիդացման ռեակցիան կապված է սուբստրատի ֆոսֆորիլացման հետ, իսկ վերականգնմանը՝ ոչ:

Բակտերիաներում խմորման արդյունքում առաջանում են տարբեր օրգանական միացություններ, ածխաթթու գազ: Տարբեր տեսակներում խմորման վերջնանյութերը տարբեր են: Կախված հիմնական վերջնանյութի քանակից և տեսակից՝ տարբերում են սպիրտային, կաթնաթթվային, պրոպիոնաթթվային, բուտիրաթթվային, ացետոն-բութանոլային, գլիցերոլային և այլ խմորումներ (նկ. 2) (Volker, 2001, Пинева, 2007):

Խմորման ընդհանրացրած կենսաէներգետիկական բնույթը կարելի է ներկայացնել հետևյալ կերպ.

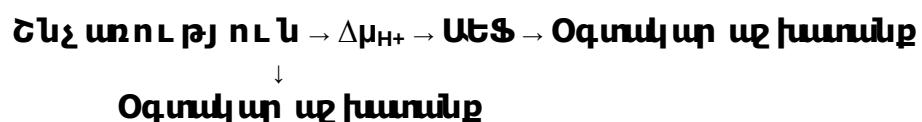
Խմորում $\rightarrow$ ԱԵՖ $\rightarrow$ $\Delta\mu_{H^+}$ $\rightarrow$ Օգտակար աշխատանք

↓

Օգտակար աշխատանք

Ընդունված է, որ շնչառության և խմորման հիմնական տարբերությունը՝ թթվածնի կլանումն է շնչառության ժամանակ:

Սակայն այս պնդումը ճիշտ է միայն բույսերի և կենդանիների մեծ մասի համար, քանի որ որոշ էուկարիոտ օրգանիզմներ և բազմաթիվ պրոկարիոտներ շնչառության ժամանակ թթվածնի փոխարեն օգտագործում են այլ օքսիդիչ, օրինակ, սուլֆատ կամ նիտրատ: Այն պնդումը, որ խմորման ժամանակ օգտագործվում է միայն էլեկտրոնի օրգանական ակցեպտոր՝ նույնպես բացարձակ չէ, քանի որ որպես այդպիսին կարող են հանդես գալ նաև էլեկտրոնների անօրգանական ակցեպտորները, օրինակ՝ երկաթի եռավալենտ կատիոնները: Այսինքն, այս երկու գործընթացների հիմնական տարբերությունը ոչ թե էլեկտրոնի ակցեպտորի բնույթն է, այլ էներգիայի ստեղծման եղանակը: Ի տարբերություն խմորման, երբ էներգիայի ստեղծման առաջնային փուլում առաջանում է ԱԵՖ, շնչառության դեպքում էներգիան ի սկզբանե կուտակվում է $\Delta\mu_{H^+}$ -ի տեսքով: Վերջինս էլ օգտագործվում է երկրորդային տեղափոխիչների և շարժողական համակարգերի կողմից, ինչպես նաև թաղանթակապ ԱԵՖ-սինթազի/ԱԵՖ-ազի կողմից ձևափոխվում է ԱԵՖ-ի քիմիական էներգիայի: Հետևաբար շնչառության կենսաէներգետիկական բնույթն կարելի է ներկայացնել այս կերպ.



Շաքարների (գլյուկոզ) խմորման հիմնական էլանյութը կաթնաթթվն է, որի առաջացումը բնորոշ է խմորման բոլոր տեսակներին: Մեծ քանակությամբ կաթնաթթվ արտադրում են կաթնաթթվային բակտերիաները: Վերջիններս ըստ խմորման վերջնանյութերի բաժանվում են ենթախմբերի. հոմոֆերմենտային բակտերիաներ, որոնք արտադրում են խմորման մեկ վերջնանյութ՝ կաթնաթթվ, և հետերոֆերմենտային բակտերիաներ, որոնք էլ ի դեմս կաթնաթթվի արտադրում են նաև այլ միացություններ՝ հիմնականում սպիրտ, ածխաթթվ գազ (Пинева, 2007, Volker, 2001):

Մանրէների մի մեծ խումբ էլ միավորվում են որպես մրջնաթթվային կամ այսպես կոչված խառը խմորում իրակացնողներ: Խմորման այս տեսակի անվանումը գալիս է վերջնանյութերից մեկի՝ մրջնաթթվի անվանումից, որի առաջացումն ուղեկցվում է

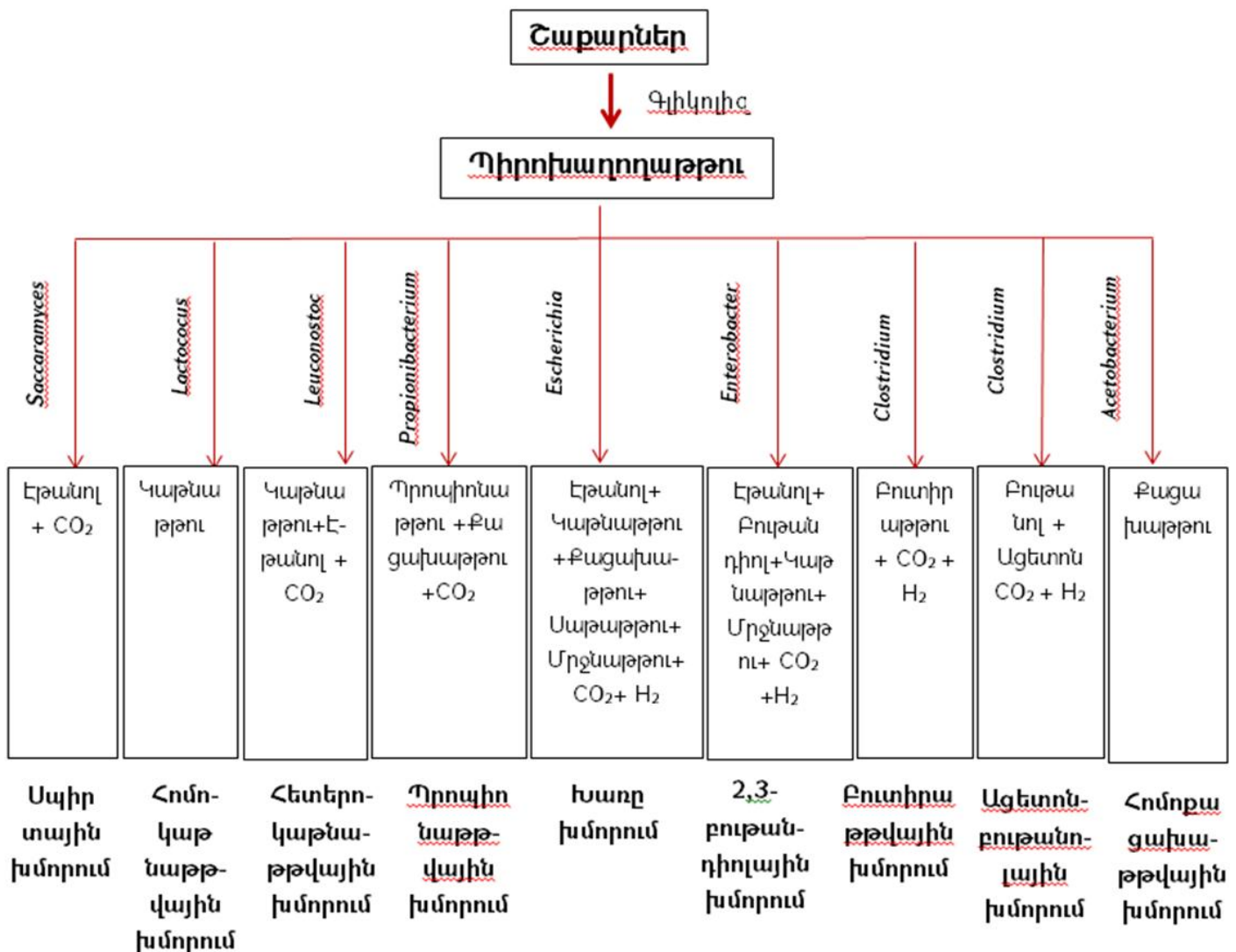
այլ օրգանական թթուների՝ սաթաթթվի, կաթնաթթվի, քացախաթթվի առաջացմամբ. այստեղից էլ խառը խմորում անվանումը: Մրջնաթթվային խմորում իրականացնում են *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* և *Enterobacteriaceae* ընտանիքին պատկանող այլ աղիքային բակտերիաներ (Пинева, 2007):

Էնտերոբակտերիաները բնության մեջ լայնորեն տարածված, գրամ-բացասական, ճկուն, հարմարողական նյութափոխանակություն ունեցող մանրէներ են, որոնք էներգիա ստանում են ինչպես խմորման, այնպես էլ շնչառության ընթացքում: Այս բակտերիաները հանդիպում են հողում (*Enterobacter aerogenes*), բուսական մեռուկազանգվածում (*Serratia marcescens*), մարդու և շատ կենդանիների աղիներում (*E.coli*), բազմաթիվ տեսակներ էլ մարդու, բույսերի և կենդանիների տարբեր հիվանդությունների հարուցիչներ են (*Salmonella enterica* Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumonia*, *Erwinia carotovra*):

Մրջնաթթվային խմորման դեպքում շաքարների նյութափոխանակությունն ընթանում է ֆրուկտոզաերկֆոսֆատային, Էնտեր-Դուդորովի կամ Վարբուրգ-Դիքենս-Յորրերերի հեքսոգոմոնոֆոսֆատային ուղիներով (Пинева, 2007; Muller, 2008): Առաջած պիրոխաղողաթթվի հետագա ճակատագիրը բարդ է և ոչ միանշանակ: Մրջնաթթվային խմորման դեպքում կաթնաթթու դեհիդրոգենազ ֆերմենտի միջոցով պիրոխաղողաթթվից առաջանում է կաթնաթթու, օքսալոացետատի դեկարբօքսիլացումից՝ սաթաթթու: Խառը խմորման առանցքային ֆերմենտի՝ պիրոխաղողաթթու: մրջնաթթու լիազ ֆերմենտի միջոցով էլ առաջանում են ացետիլ-CoA և մրջնաթթու: Մրջնաթթու-ջրածին լիազ (ՄՋԼ) համալիրով մրջնաթթուն ճեղքվում է ջրածնի և ածխածնի երկօքսիդի (նկ. 2) (Volker, 2001; Trchounian et al., 2012): Ֆոսֆոտրանսացետիլազային և ացետատիկնազային ռեակցիայի արդյունքում ացետիլ-CoA-ն վերածվում է քացախաթթվի:

Մեկ մոլեկուլ գլյուկոզի մրջնաթթվային խմորման էներգետիկ ելքը երեք մոլեկուլ ԱԵՖ-ի առաջացումն է, որոնցից

Երկուսը անջատվում են գլխով իզի փոխում, իսկ մեկը՝ քացախաթթվի առաջացման փոխում:



Նկ. 2. Շաքարների խմորման հիմնական ուղիները, իրականացնող մանրէները և առաջացած վերջնական ութերը (Volker, 2001):

Խմորման ելանյութերի հարաբերությունը հաստատուն չէ և կախված է տարբեր գործոններից, օրինակ, միջավայրի pH-ից, սուբստրատի քանակից, օքսիդալերական գնդակալան արտենցիալից և այլն (Förster and Gescher, 2014; Trchounian et al., 2015): Օրինակ, միջավայրի pH-ի նվազման դեպքում, *E.coli*-ն ներքին միջավայրի թթվեցումը սահմանափակելու համար, մրջնաթթվի և քացախաթթվի փոխարեն արտադրում է հիմնականում կաթնաթթու (Martinez et al., 2017; Penniston and Gueguim Kana, 2018): Առաջացած քացախաթթուն փոխարկվում է ագետիլ -

CoA-ի, իսկ մրջնաթթուն օքսիդանում է մինչև մոլեկուլային ջրածնի և ածխաթթու գազի:

1.2.2. *E.coli* –ի ՄՁԼ համալիրը և հիդրոգենազները

Ինչպես արդեն նշվել է, *E.coli*-ում մրջնաթթվի օքսիդացումը տեղի է ունենում թաղանթակա ՄՁԼ համալիրի միջոցով (Maeda et al. 2012; Trchounian et al. 2012, Jo and Cha, 2015): Համալիրը կազմված է 2 հիմնական բաղադրամասերից՝ մրջնաթթու դեհիդրոգենազ H-ից (ՄԴՀ-Ի) և հիդրոգենազից (ՀԻԴ), ինչպես նաև էլեկտրոնների տեղափոխիչներից (Աղյ . 2) (Maeda et al., 2012, Pinske and Sargent., 2016):

Աղյ ու սակ 2.

E.coli–ի ՄՁԼ համալիրի կառուցվածքագործառնական նկարագիրը

(McDowall et al., 2015; Pinske and Sargent, 2016)

Գեևարգաաիք	Մոլեկուլային զանգված, կԴա	Ենթամիավորների նույնականացումը և ենթադրվող դերը
FdhD	30.5	պրոտեազ
FdhE	32.0	կապում է համալիրը թաղանթին
FdhF	79.1	Se-Mo պարունակող [Fe-S]-ային սպիտակուց է, մրջնաթթու բենզիլվիոլոգեն ռեդուկտազ, ՄԴՀ-Ի մեծ ենթամիավորը
HycA	17.6	Տրանսկրիպցիոնային կարգավորիչ սպիտակուց է
HycB	21.8	Էլեկտրոն տեղափոխող սպիտակուց է, 4 [4Fe-4S] կլաստերներով
HycC	64.1	թաղանթային ենթամիավոր է, հոմոլոգ է ՆԱԴ H-ու բիբինոն օքսիդոռեդուկտազի (համալիր 1) 4-րդ ենթամիավորին
HycD	33.0	թաղանթային ենթամիավոր է, հոմոլոգ է համալիր 1-ի 1-ին ենթամիավորին,
HycE	65.0	ՀԻԴ-3-ի մեծ ենթամիավորն է, ակտիվ կենտրոնում Ni-պարունակող [Fe-S]-ային կլաստերով
HycF	20.3	Էլեկտրոն տեղափոխող սպիտակուց է, [Fe-S]-ային սպիտակուց է, կապում է համալիրը թաղանթին
HycG	28.0	[Fe-S]-ային սպիտակուց է, ՀԻԴ-3-ի փոքր ենթամիավոր
HycH	15.5	հոմոլոգ սպիտակուց հայտնի է, կարգավորիչ սպիտակուց է
HycI	հայտնի է	հոմոլոգ սպիտակուց հայտնի է,

		պրոտեազ
HyfA	22.2	հոմոլոգ է HycB (50 %), [Fe-S]-ային սպիտակուց է, բակտերիական ֆերրեդոքսին
HyfB	72.5	հոմոլոգ է HycC (37 %), թաղանթային ենթամիավոր, H ⁺ -ի տեղափոխության
HyfC	34.3	հոմոլոգ է HycD (51 %) և համալիր 1-ի 12-րդ ենթամիավորին, թաղանթային ենթամիավոր
HyfD	51.8	հոմոլոգ է HycC (17 %), H ⁺ -ի տեղափոխության
HyfE	23.4	դերնանհայտ է
HyfF	56.8	հոմոլոգ է HycC (22 %), H ⁺ -ի տեղափոխության
HyfG	53.4	հոմոլոգ է HycE (73%) և համալիր 1-ի 3-րդ ենթամիավորին, [Ni-S]-ային սպիտակուց է,
HyfH	20.2	հոմոլոգ է HycF (44 %), [Fe-S]-ային սպիտակուց է, բակտերիական ֆերրեդոքսին
HyfI	28.1	հոմոլոգ է HycG (63 %), [Fe-S]-ային սպիտակուց է, 3-ի 4-ի փոքր ենթամիավորը
HyfJ	15.6	հոմոլոգ է HycH (47 %), դերնանհայտ է
HyfR	75.3	հոմոլոգ է FhlA (46%), մրջնաթթվազային կարգավորիչ սպիտակուց
FocB	30.6	հոմոլոգ է FocA (50 %), մրջնաթթվի պերմեազ, մասնակցում է մրջնաթթվի տեղափոխմանը

*** հաշվարկված է ըստ համապատասխան գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության:**

Դեհիդրոգենազները օքսիդառեդուկտազների ընտանիքի մի մասն են, որոնք տեղափոխում են ջրածինը դեպի էլեկտրոնի ակցեպտոր և օքսիդացնում սուբստրատը (Ho and Weiner, 2005), իսկ հիդրոգենազները կա՛մ օքսիդացնում են ջրածինը կա՛մ վերականգնում պրոտոնները էլեկտրոնի ակցեպտորի կամ դոնորի ներկայությամբ (Ogata et al., 2016):

ՄԴՀ-ը սելեն և մոլիբդեն պարունակող բազմաենթամիավորային ծայրամասային թաղանթային սպիտակուց է, գաղտնագրվում է *fdh* գեներով: Մեծ կատալիտիկ ենթամիավորը (FdhF) ունի 80 կԴա մոլեկուլային զանգված, պարունակում է երկաթ-ծծմբային [4Fe-4S] կլաստեր և գաղտնագրվում է *fdhF* գենով (Axley et al., 1990; Skibinski et al., 2002; Maeda et al., 2012): Այս ենթամիավորի հասունացման համար անհրաժեշտ սպիտակուցը՝ FdhD-ն,

գաղտնագրվում է *fdhD* գենով, իսկ *fdhE* գենի արգասիքը՝ FdhE-ն, պատասխանատու է թաղանթի հետ համալիրի կապման համար: Հայտնի և նույնակացված են *E.coli*-ի սելենացիստեինի կենսասինթեզի և սպիտակուցներում դրանց ներդրման համար պատասխանատու *sel* գեները (*selA, B, C* և *D*), որոնցից SelC գենարգասիքն է պատասխանատու սելենացիստեինի կենսասինթեզի և սելենասպիտակուցներում դրանց ներդրման համար (Sawers et al., 1991):

ՄԴՀ-Ի-ի ակտիվությունը կախված է միջավայրի pH-ից և ճնշվում է միջավայրում արտաքին էլեկտրոնային ակցեպտորների, օրինակ, նիտրատի, նիտրիտի, թթվածնի և ազիդի առկայության դեպքում: Ֆերմենտի ակտիվությունը ուղիղ համեմատական է pH-ի արժեքի նվազմանը (Axley et al, 1990):

E.coli-ն ՄԴՀ-Ի-ից բացի սինթեզում է նաև այլ երկու դեհիդրոգենազներ՝ ՄԴՀ-N և ՄԴՀ-O, որոնք նույնպես մասնակցում են մրջնաթթվի օքսիդացմանը և ի տարբերություն ՄԴՀ-Ի-ի, խթանվում են էլեկտրոնների արտաքին ակցեպտորի, օրինակ, նիտրատի առկայության դեպքում (Sawers 1994; Andrews et al., 1997): ՄԴՀ-N-ը կազմված է երեք ենթամիավորներից (ՄԴՀ-N- α , ՄԴՀ-N- β , ՄԴՀ-N- γ) և պարունակում է մոլիբդեն, սելեն, երկաթ, ցիտոքրոմ b (Lamont et al., 2017): ՄԴՀ-O-ն մասնակցում է մրջնաթթվի օքսիդացմանը և օգտագործում թթվածինը, ինչպես նաև նիտրատը և նիտրիտը՝ որպես էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտոր: Այդտեղից էլ ֆերմենտը ստացել է մրջնաթթու օքսիդազ անվանումը և հապավման «O» տառը (Sawers, 1994):

E.coli-ում հայտաբերվել են թաղանթակապ չորս տեսակի [Ni-Fe] Հիդ-ներ, որոնք սինթեզվում են ֆիզիոլոգիական տարբեր պայմաններում (Vignais and Billoud, 2007, Trchounian et al, 2012): Այս ֆերմենտները կազմված են մեծ և փոքր ենթամիավորներից, որոնց մեծ ենթամիավորների կազմում գտնվում է ակտիվ Ni-Fe հատվածը, իսկ փոքր ենթամիավորները կրում են մոտ, միջին և ծայրային դիրք ունեցող $[Fe_4S_4]$ և $[Fe_3S_4]$ կլաստերներ: Վերջիններս էլ իրականացնում են ակտիվ կենտրոնով էլեկտրոնների տեղափոխումը (Zannoni and Philippas 2014, հիդրոգենազների գիրքը):

Չորս Յիդ-ներից երկուսը՝ Յիդ-3-ը և Յիդ-4-ը հանդես են գալիս *E.coli*-ի ՄՋԼ համալիրի կազմում:

Յիդ-3-ը թաղանթի ներքին մակերևույթին տեղակայված, մի քանի մեծ և փոքր ենթամիավորներից կազմված սպիտակուցային համալիր է, որը գաղտնագրվում է 9-ը գեններից կազմված *hycABCDEFGHI-focA* օպերոնով (Աղյ. 2): Համալիրի ամենամեծ ենթամիավորը Ni պարունակող և Fe-S կլաստերով HycE-ն է, որն ունի 65 կԴա մոլեկուլային զանգված և գաղտնագրվում է *hycE* գենով (Chan Chung and Zamble, 2011): HycA գենարգասիքը ամբողջ *hyc* օպերոնի տրանսկրիպցիոն խթանիչն է, ենթադրվում է, որ HycA-ն՝ FhlA-ին կապվելով է ազդում տրանսկրիպցիայի վրա (Skibinski et al., 2002): HycB սպիտակուցը մասնակցում է ՄՅՀ-ից Յիդ-3-ին էլեկտրոնների տեղափոխմանը, անհրաժեշտ է ՄՋԼ համալիրի ձևավորման և գործունեության համար, ունի նմանություն ՄՅՀ-ի փոքր ենթամիավորի հետ (Sauter et al., 1992): HycC-ն և HycD-ն, համապատասխանաբար, 12-16 և 8 տրանսթաղանթային դոմեններ ունեցող հիդրոֆոբ սպիտակուցներ են: *hycF* գենի արգասիքն ևս էլեկտրոն տեղափոխող սպիտակուց է, իսկ *hycG* գենինը նման է ՆԱԴԻ ուբիքինոն օքսիդոռեդուկտազ համալիրի G-նման սպիտակուցին և Յիդ-3-ի փոքր ենթամիավորներից է: HycH գենարգասիքն անհրաժեշտ է Յիդ-3-ի մեծ ենթամիավորի հասունացման համար, իսկ HycI-ն՝ սինթեզի համար (Lindenstrauß et al., 2017): Ցույց է տրվել, նաև Յիդ-3-ը գործում է թույլ թթվային միջավայրում (pH 5.5-7.0) (Sauter et al., 1992):

E. coli-ում հայտնաբերվել է նաև 10 ենթամիավորներից կազմված Յիդ-4-ը, որը գաղտնագրվում է *hyfABCDEFGHJR-focB* 12 գեններից կազմված օպերոնով և ունի 375 կԴա մոլեկուլային զանգված (Andrews et al., 1997): Հատկանշանական է այն, որ Յիդ-4-ի ենթամիավորների մեծ մասը հոմոլոգ է Յիդ-3-ի և/կամ ՆԱԴԻ ուբիքինոն օքսիդոռեդուկտազի ենթամիավորներին (Աղյ. 2): Այս համալիրի մեծ ենթամիավորը HyfG-ն է, որը Fe-S-ային սպիտակուց է, հոմոլոգ է Յիդ-3-ի HycE ենթամիավորին և համալիր 1-ի 3-րդ ենթամիավորին (ՄՋԼ-ի աղյ.): *hyfA* գենի արգասիքն էլ հոմոլոգ է Յիդ-3-ի HycB սպիտակուցին և հավանաբար էլ վերջինս նման ունի էլեկտրոնների տեղափոխման գործառնություն: HyfA-ն բակտերիական սպիտակուցների 16Fe

Ֆերրեդոքսին ընտանիքի անդամ է: Այս սպիտակուցները կրում են 4 [Fe-S] կլաստերներ և օքսիդաերականզնողական ուղիներում գործում են որպես էլեկտրոնների ակցեպտորներ կամ դոնորներ: HyfB, C, D, E, F և I-ը ինտեգրալ թաղանթային սպիտակուցներ են, իսկ HyfA, G, H-ը՝ ծայրամասային (Andrews et al., 1997): Ենթադրվում է, որ HyfB, D և F-ը արլիտոպ թաղանթային սպիտակուցներ են և նրանց նմանությամբ կազմում է ընդհամենը 20-24 %: HyfB-ն նման է Յիդ-3-ի HycC ենթամիավորին (37 %), իսկ D-ն և F-ն ունեն, համապատասխանաբար, 17 և 22 % նմանությամբ (Andrews et al., 1997): HyfC-ն շատ նման է Յիդ-3-ի HycD ենթամիավորին (51%), երկուսն էլ պատկանում են սպիտակուցների նույն ընտանիքին և ունեն 8 տրանսթաղանթային պարույրներ:

HyfR գենարգասիքը հոմոլոգ է *E. coli*-ի FhIA սպիտակուցին: Վերջինս պատկանում է σ^{54} -կախյալ (սիգմա) տրանսկրիպտային կարգավորիչների խմբին և ի պատասխան ներքջային մրջնաթթվի քանակի ավելացմանը՝ մասնակցում է *hyc*, *fdhF*, *hydN-hypF* և *hyp* գեների («մրջնաթթու ռեգուլոն») մակաժմանը (Hube et al., 2002): FhIA-ն ակտիվանում է թթվային pH-ի և մրջնաթթվի բարձր ներքջային քանակի դեպքում, իսկ ակտիվությունն ընկճվում է բացասական տրանսկրիպտային կարգավորիչի՝ HycA սպիտակուցի կողմից (Self et al., 2004): HyfR ու FhIA սպիտակուցները նման են կենտրոնական (69 %) և C-ծայրային հատվածներով, բայց պակաս նման են N-ծայրային հատվածներով: C դոմենը պատասխանատու է σ^{54} -ի հետ փոխազդեցության, բաց-համալիրի ձևավորման և ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի համար:

FocB-ն հայտնաբերվել է բակտերիաներում և սկներում, այն հոմոլոգ է *E. coli*-ի մրջնաթթվային տեղափոխիչ FocA-ին: Վերջինս կոդավորվում է *focA* գենով և մասնակիորեն էլ համակարգավորվում է մրջնաթթու-ջրածին-լիազ գենով (Beyer et al., 2013): FocB-ի ամինաթթվային հաջորդականության նմանությամբ FocA-ին թույլ է տալիս ենթադրել, որ այն *E. coli*-ի երկրորդ մրջնաթթու տեղափոխիչն է:

hyf և *hyc* օպերոնները խթանվում են նույն կերպ՝ վերոհիշյալ σ^{54} -կախյալ տրանսկրիպտային կարգավորիչի միջոցով, որն ևս

ակտիվանում է խմորման պայմաններում, թթվային pH-ի դեպքում, սակայն ներքջային մրջնաթթուն գրեթե չի ազդում *hyf* օպերոնի խթանման վրա (Skibinski et al., 2002): *Hyc* և *Hyf* սպիտակուցների նմանությունը փաստում է այս երկու համալիրների գործառական և էլոլյուցիոն կապի մասին: Ինչևէ, *hyf* օպերոնը տարբերվում է նրանում առկա երեք լրացուցիչ գեներով, որոնք գաղտնագրում են ինտեգրալ թաղանթային սպիտակուցներ (*HyfD*, *E* և *F*): Վերջիններս հոմոլոգ են պրոտոն տեղափոխող ՆԱԴՀ-ուբիքինոն օքսիդառեդուկտազի (միտոքոնդրիումային շնչառական շղթայի 1-ին համալիր և *E.coli*-ի *Nuo* կամ 1-ին համալիր) *ND2*, *ND4* և *ND5* ենթամիավորներին: Յիդ-3-ի և Յիդ-4-ի նմանությունը շնչառական շղթայի տարբեր բաղադրամասերի հետ, թույլ է տալիս ենթադրել, որ աներոբ, խմորման պայմաններում, երբ կա եներգիայի պակասորդ, հիդրոգենազները զուգակցելով էլեկտրոնների տեղափոխությունը պրոտոնների տեղափոխման հետ՝ հանդես են գալիս որպես եներգիա պահեստավորող, պրոտոն տեղափոխող համալիրներ (Баграмян, 2002, Andrews et al, 1997):

Ինչպես արդեն նշվել էր, *E.coli*-ի հիդրոգենազներից ՄՋԼ համալիրում հանդես են գալիս երկուսը՝ Յիդ-3-ը և 4-ը: ՄՋԼ-ն, որի կազմում հանդես է գալիս Յիդ-3-ը՝ համարվում է ՄՋԼ-1 ձևը, իսկ Յիդ-4 պարունակողը՝ ՄՋԼ-2 (Trchounian et al., 2012):

1.2.3. *E. coli*-ի Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը

E.coli-ում բացի վերը նշված երկու հիդրոգենազներից, հայտնաբերվել են նաև H_2 -ի նյութափոխանակությանը մասնակցող 2 այլ հիդրոգենազներ՝ հիդրոգենազ 1 (Յիդ-1) և հիդրոգենազ 2 (Յիդ-2) (Bock and Sawers, 1996):

Յիդ-1-ը թաղանթակա է, ուղղված է դեպի պերիպլազմային հատվածը և կրում է 4Fe-4S և 3Fe-4S կլաստերներ: Ի տարբերություն Յիդ-2-ի և Յիդ-3-ի, այն դիմացկուն է թթվածնի նկատմամբ (Laurinavichene et al., 2002, Lukey et al. 2010): Այս սպիտակուցը կազմված է երեք ենթամիավորներից՝ *HyaA*, *HyaB* և *HyaC*, որոնցից փոքրը՝ *HyaA*-ն, ունի 40.6 կԴա մոլեկուլային զանգված: Յենց այս ենթամիավորի՝ երկար, թաղանթով անցնող α պարույրի միջոցով էլ սպիտակուցը

«խարսխվում» է թաղանթում (Dubini et al., 2002): *hyaA* գենի արտահայտումը ավելի է խթանվում անթվածին, թվային պայմաններում և մրջնաթվի ներկայությամբ, սակայն ճնշվում է նիտրատով (Richard et al. 1999): Մեծ ենթամիավորը HyaB-ն է, ունի 66.5 կԴա մոլեկուլային զանգված և գտնվում է թաղանթում: HyaC-ն կամ b-տեսակի ցիտոքրոմային ենթամիավորը, ունի 27.9 կԴա մոլեկուլային զանգված և ամբողջությամբ ընկղմված է թաղանթում: Հիդ-1-ի ֆիզիոլոգիական գործառույթն ամբողջությամբ պարզ չէ: Ենթադրվում է, որ աերոբ պայմաններում այս սպիտակուլը ցիտոքրոմ *bd-2* ծայրային օքսիդազի հետ H₂-ի և թվածնի միջև կազմում է շնչառական շղթա (Wulff et al., 2016): Հավանաբար այն պահում է ներքջային թվածինը ցածր մակարդակում և գործում է որպես «աերոբ շոկի պաշտպան»՝ այդ կերպ պաշտպանելով թվածնի նկատմամբ զգայուն ֆերմենտները անաերոբ-աերոբ անցման ժամանակ (Volbeda et al., 2013):

Հիդ-2-ը ևս թաղանթակա, [Ni-Fe] հիդրոգենազներին դասվող սպիտակուլ է, սինթեզվում է անաերոբ պայմաններում և շատ ակտիվ է ջրածնի կլանման գործընթացում (Dubini et al, 2002): Այս ֆերմենտը զուգակցում է պերիպլազմային տարածությունում ջրածնի օքսիդացումը ներթաղանթային քիսոնային պուլի վերականգնման հետ (Richard et al., 1999): Հիդ-2-ը կազմված է [Fe-S] ֆերրեդոքսին տեսակի HybA, ներթաղանթային HybB, մեծ HybC և փոքր HybO ենթամիավորներից: Մեծ ենթամիավորը՝ Hyb-ն, ունի 62.5 կԴա մոլեկուլային զանգված և նման է Հիդ-1-ի մեծ ենթամիավորին, իսկ փոքր ենթամիավորն ունի 39.6 կԴա զանգված:

Հիդ-2-ը զգայուն է թվածնի նկատմամբ և գործում է միջավայրի ռեդոքս պոտենցիալի -100-ից -150 մՎ արժեքի պայմաններում (Lukey et al., 2010): Այս սպիտակուլը գործում է և՛ *in vitro* և՛ *in vivo* պայմաններում (Pinske et al., 2015): Պետք է նշել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում Հիդ-2-ը գործում է նաև ջրածնի սինթեզի ուղղությամբ. այս էնդերգոնիկ ռեակցիայի շարժիչ ուժը թաղանթային պրոտոնային գրադիենտն է և հավանաբար այդ կերպ կանխվում է քիսոնային պուլի գերվերականգնումը (Pinske et al., 2015):

Յիդ-2-ը գաղտնագրվում է *hyb* օպերոնով (*hybGFEDCBAO*), որն արտահայտվում է անաերոբ պայմաններում և ընկճվում է նիտրատով (Richard et al., 1999): Սափտակուցի հասունացմանը և թաղանթում տեղակայմանը բացի *hyb* օպերոնից մասնակացում են նաև *hyp* օպերոնը (*hypABCDE*) և առանձին օպերոնում գտնվող *hypF*-ը (Forzi and Sawers, 2007): *hyp* օպերոնի գեները կարևոր են բոլոր Յիդ-ների սինթեզի համար և մեծ դեր ունեն բոլոր Յիդ-ների մեծ ենթամիավորներում Ni-ի, Fe-ի, CO-ի և CN-ի ներդրման գործում (Mulder et al., 2011; Peters et al., 2015): Այս գեների խաթարումները բերում են Յիդ-ների մեծ ենթամիավորների և Յիդ-1-ի և 2-ի փոքր ենթամիավորների սինթեզի խանգարմանը (Sargent, 2016): *hypA* սափտակուցն անհրաժեշտ է Յիդ-3-ի սինթեզի համար, իսկ մուտացիաները *hypC*-ում հանգեցնում են Յիդ-3-ի սինթեզի խանգարմանը, ինչի արդյունքում էլ անհետանում է ՄՋԼ ակտիվությամբ (Petkun et al., 2011): *HypF*-ը ԱԵՖ-կախյալ ֆերմենտ է, որը կարբամոիլ ֆոսֆատը փոխակերպում է ԱՄՖ- OCONH_2 -ի: Ցույց է տրվել, որ *HypF*-ը կազմում է համալիր *HypE*-ի, իսկ *HypC*-ն *HypD*-ի հետ (Blokesch et al., 2004): Ենթադրվում է, որ *HypC*-*HypD* համալիրը հասցնում է Fe-ը Յիդ-ի ակտիվ կենտրոն:

1.2.4. Գլիցերոլի խմորումը աղիքային ցուպիկում

Էներգիայի և վառելիքի խնդիրը մարդկության առջև ծառացած հիմնահարցերից է: Ներկայումս՝ որպես էներգիայի հիմնական աղբյուրներ, օգտագործվում են հանածո վառելիքի տեսակները, որոնց օգտագործումը հանգեցնում է մեծ չափով ջերմոցային գազերի արտանետումների և մթնոլորտի ջերմաստիճանի աճի: Ավելին, կանխատեսվում է, որ էներգետիկ պաշարները կսպառվեն 21-րդ դարի երկրորդ կեսին:

Օրեցօր մեծացող կենսավառելիքի արտադրությունը՝ բերել է երկրորդային արգասիք գլիցերոլի բավական մեծ ավելցուկի կուտակմանը, ինչի արդյունքում էլ նվազել է վերջինիս գինը և այն դարձրել շատ հարմար հումք քիմիական նյութերի և անաերոբ խմորման միջոցով վառելիքի ստացման համար (10 կգ կենսավառելիքից ստացվում է գլիցերոլի 1 կգ հումք) (Dharmadi et al.

2006; Murarka et al. 2008): Եվ ժամանակի պահանջն է՝ կուլտակված գլիցերոլի անմշակ հումքը վերածել բարձրարժեք նյութի:

Չնայած նրան, որ շատ մանրէներ ընդունակ են յուրացնել գլիցերոլը Էլեկտրոնի արտաքին ակցեպտորների առկայության պայմաններում (շնչառական նյութափոխանակություն), միայն որոշները կարող են այն խմորել (Էլեկտրոնի ակցեպտորի բացակայությամբ): Գլիցերոլի խմորումը նկարագրված է *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* և *Anaerobiospirillum* ցեղերի տեսակների մոտ: Ինչևէ՝ նշված օրգանիզմների օգտագործումը արտադրական նպատակներով սահմանափակվում է պաթոգենության, խիստ անաբար պայմանների և հարուստ սննդամիջավայրերի անհրաժեշտության պատճառով: Սակայն այնպիսի մանրէի օգտագործումը կիրառական նպատակներով, ինչպիսին է *E. coli*-ն, կարող է լուծում տալ վերը նշված խնդիրներին: *E. coli*-ում գլիցերոլի նյութափոխանակության համար անհրաժեշտ են Էլեկտրոնի արտաքին ակցեպտորներ: Նյութափոխանակային գործընթացում ներառված են նաև գլիցերոլի տեղափոխիչ (կոդավորվում է *glpF* գենով), գլիցերոլ կինազ (կոդավորվում է *glpK* գենով) ֆերմենտները և 2 գլիցերոլ-3-ֆոսֆատ դեհիդրոգենազները (ԳՅԳՅ) (Samul et al., 2014):

Երկար ժամանակ գիտնականներն ու հետազոտողներն պնդում էին, որ արտաքին Էլեկտրոնների բացակայության պայմաններում և վերականգնվածության բարձր ասիտճանի պատճառով, *E. coli*-ն չի կարող խմորել գլիցերոլ (Booth, 2005): 2006 թ.ին ԱՄՆ-ում, Գոնզալ Եզի Լաբորատորիայում ցույց տրվեց, որ արտաքին Էլեկտրոնների բացակայության պայմաններում գլիցերոլը կարող է խմորվել աղիքային ցուպիկում (Dharmadi et al., 2006; Murarka et al., 2008):

Ցույց է տրվել, որ Էլեկտրոնների ակցեպտորների բացակայության պայմաններում *E. coli* բակտերիաները կարող են յուրացնել գլիցերոլը որպես ածխածնի աղբյուր: Ժամանակակից մոլեկուլային կենսաբանության տարբեր մեթոդների (գենային ճարտարագիտություն, միջուկամազնիսական սպեկտրոսկոպիա, կենսաքիմիական մեթոդներ) կիրառմամբ գիտնականներին հաջողվեց ձեռք բերել համոզիչ ապացույցներ գլիցերոլի խմորման

վերաբերյալ (Hidalgo and Puerta-Fernández, 2017): Օգտագործելով *E. coli*-ի վայրի տիպի տարբեր տեսակներ և մուտանտ շտամներ, այդ թվում և թթվածնային շղթայի տարբեր բաղադրիչների խախտումներով մուտանտներ՝ Գոնգալեզին և համահեղինակներին հաջողվեց ցույց տալ, որ գլիցերոլն օգտագործվում է բջիջների կենսազանգվածի սինթեզի համար և, որ տրիպտոնը կամ այլ նյութերը չեն հանդիսանում որպես էլեկտրոնների ակցեպտորներ (Murarka et al., 2008): Նրանք ցույց տվեցին նաև, որ աճման LB միջավայրում և թթվային pH-ում (6.0-6.3) *E. coli*-ի կողմից գլիցերոլի խմորման արդյունքում առաջանում է մեծ քանակությամբ էթանոլ (86 %), H₂, CO₂, սաթաթթու, 1,2-պրոպանդիոլ, 1,3-պրոպանդիոլ, նաև քիչ քանակություներով կաթնաթթու և քացախաթթու (Mazumdar et al., 2010), իսկ pH-7.5-ում առաջանում է նաև մրջնաթթու: Ցույց է տրվել նաև, *E. coli*-ն չի կարող աճել և յուրացնել գլիցերոլը հիմնային pH-ում (pH 8,0), իսկ LB միջավայրում *E. coli*-ի կողմից գլիցերոլի խմորման օպտիմալ pH-ը 6.0-6.5 տիրույթում է (Murarka et al., 2008): Խմորման այս պայմաններում *E. coli*-ի օպտիմալ աճը կախված է CO₂-ի և HCO₃⁻-ի կոնցենտրացիայից: Վերջինիս կոնցենտրացիան նվազում է CO₂-ի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգահեռ, ինչի արդյունքում բջիջների աճն արագանում է, այսինքն CO₂-ը թողնում է խթանող ազդեցություն (Dharmadi et al., 2006): Ենթադրվում է, որ CO₂-ը, որն առաջանում է ՄՋԼ համալիրի կողմից մրջնաթթվի օքսիդացման արդյունքում, նպաստում է *E. coli*-ի կողմից գլիցերոլի խմորմանը: Հայտնի է, որ ՄՋԼ-ի տրանսկիրացիան տեղի է ունենում միայն խմորման պայմաններում և կախված է թթվային pH-ից և մրջնաթթվի առկայությունից (Pinske and Sawers, 2016): Նշվածից կարելի է ենթադրել, որ ՄՋԼ-ի արգելակումը, հետևաբար և CO₂-ի բացակայությունը, կընկճի գլիցերոլի խմորումը pH-ը 6.0-ում: Ցույց է տրվել, որ ՄՋԼ-ի կազմի մեջ մտնող Հիդ-3-ը գաղտագրող *hycB*-ի հեռացումը բերում է թթվային միջավայրում՝ մրջնաթթվից CO₂-ի և H₂-ի արտադրության բացակայությանը (Sawers 2005): Նշված արդյունքները փաստում են, որ թթվային pH-ում գլիցերոլի խմորումը պահանջում է մրջնաթթվի օքսիդացում CO₂-ի և H₂-ի, մի

գործընթաց, որն էլ հավանաբար իր հերթին միտված է բավարարել ու CO₂-ի նկատմամբ բջջի պահանջը: Համեմատած գլյուկոզի՝ գլիցերոլի խմորման արդյունքում առաջանում են երկու անգամ ավելի շատ վերականգնողական համարժեքներ (Ngadi 2012):

E. coli-ի որոշ տեսակների կողմից գլիցերոլի խմորման արդյունքում որպես այլընտրանք վերականգնված ՆԱԴ⁺-ին, առաջանում է կաթնաթթու (Nwachukwu et al. 2013; Garlapati et al. 2016; Hastati et al. 2017): Գենային ճարտարագիտության շնորհիվ ստացվել են *E. coli*-ի և այլ կենսատեխնոլոգիական ներուժ ունեցող այլ բակտերիաների գենետիկորեն ձևափոխված տարբեր շտամներ, որոնցից որոշները՝ համեմատած վայրի տիպերի, ընդունակ են արտադրել մի քանի անգամ ավելի գլիցերոլի խմորման վերջնանյութեր և օգտագործվել արդյունաբերական նպատակներով (Samul et al. 2014; Hidalgo and Puerta-Fernández 2017):

Տարբեր կենդանի օրգանիզմների կողմից գլիցերոլի յուրացման մասին տեղեկություններ ստացվել են դեռևս 19-րդ դարում: 20-րդ դարում կենսատեխնոլոգիայի բուռն զարգացումը նպաստեց այդ ուղղության առաջընթացին: Գլիցերոլի նյութափոխանակության կարգավորումը ներառում է երկու հիմնական գործոն՝ տեղափոխություն և յուրացում: Տարբերում են գլիցերոլի յուրացման երկու հիմնական ուղիներ՝ ֆոսֆորիլացում, որն առավել տարածված է և օքսիդացում: Առաջին ուղին հիմնականում հայտնաբերվել է եուկարիոտ օրգանիզմներում և իր մեջ ներառում է գլիցերոլ կինազ ֆերմենտի կողմից գլիցերոլ-3-ֆոսֆատի (Գ3Ֆ) առաջացումը, որն էլ հետո ՆԱԴ-կապված դեհիդրոգենազ ֆերմենտի միջոցով փոխակերպվում է գլիցերոլ-3-դիհիդրոօքսիացետոնի (ԳԴԱ) (Canonico et al., 2016): Օքսիդացման ժամանակ գլիցերոլը սկզբից փոխակերպվում է դիհիդրոօքսիացետոնի, որն էլ հետո ֆոսֆորիլացվում է և կրկին առաջանում է ԳԴԱ (Garlapati et al. 2016): Մանրէները հիմնականում օգտագործում են վերը նշված ուղիներից մեկը, սակայն *Neurospora crassa* բակտերիայում երկու ուղիներն էլ գործում են: Ընդհանրացնելով՝ գլիցերոլի յուրացումը կարելի է ներկայացնել հետևյալ կերպ.

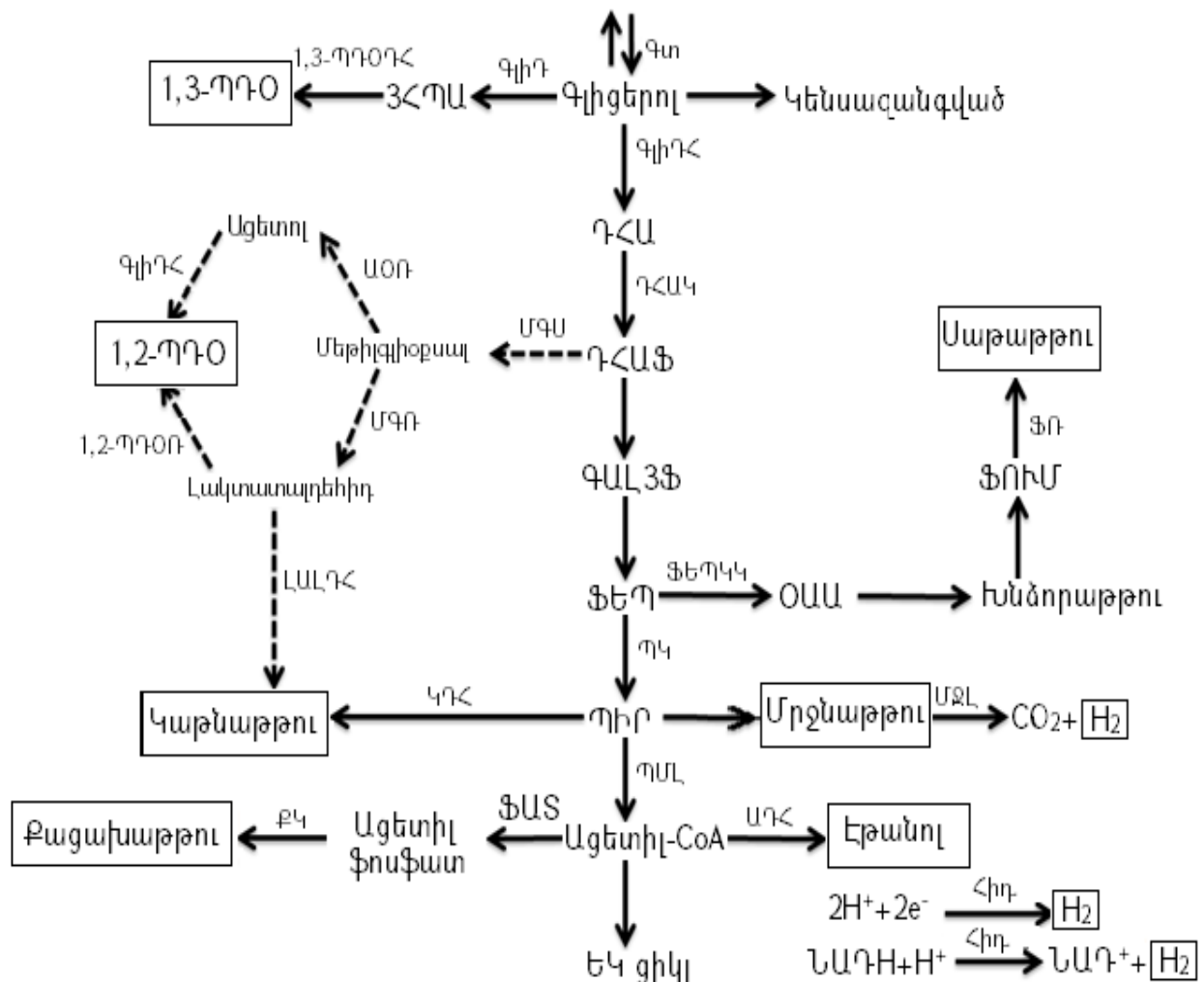


Մեկ մոլ գլ իցերոլ ից առաջանում են մեկական մոլ ԱԵՖ և ափրոխաղողաթթու: Վերջինս հետագայում վերածվում է ացետիլ – CoA-ի:

Ներբջջային գլ իցերոլը ՆԱԴ⁺-կախյալ գլ իԴՅ-ի միջոցով փոխակերպվում է ԴՅԱ, որն էլ ՖԷՊ- կախյալ ԴՅԱԿ-ի միջոցով ֆոսֆորալիցվում է ԴՅԱՖ-ի: Վերջինիս հետագա օքսիդացումից առաջանում են ՖԷՊ և ացետիլ –CoA: Պետք է նշել, որ 1,2- պրոպանդիոլ ուղին, որը հիմնականում հայտնաբերվել է *E.coli*-ի տարբեր տեսակներում, կարող է գործել որպես ՆԱԴ⁺-ի վերականգնման այլ ընտրանքային ուղի (Gonzalez et al., 2008):

1.2.5. Գլ իցերոլի տեղափոխումը

Չնայած իր բևեռացվածությանը, գլ իցերոլը կարող է անցնել թաղանթի միջով հասարակ դիֆուզիայի միջոցով՝ կոնցենտրացիոն գրադիենտի ուղղությամբ: Հասարակ դիֆուզիան որոշ մանրէներում, օրինակ, *Saccharomyces cerevisiae*-ում (*S. cerevisiae*), գլ իցերոլի տեղափոխման միակ ճանապարհն է (Sutherland et al., 1997): Գլ իցերոլը տեղափոխվում է նաև հեշտացված կամ միջնորդված դիֆուզիայի եղանակով, որն իրականանում է թաղանթում տեղակայված հատուկ սպիտակուցային տեղափոխիչների միջոցով և հասարակ դիֆուզիայի նման ընթանում է



Նկ .3. Գլ իցերոլ ի յ ուրացման նյ ու թափոխանակ այ ի ն ու ղին *Enterobacteriaceae* ընտանիքի ներկայացուցիչներում (da Silva et al. 2009; Li et al. 2013): **ՖԵՐՄԵՆՏԵՐ` ԱՐՅ** (ացետալ դեհիդր/ալ կոհոլ դեհիդրոգենազ), **ԱՕՌ** (ալ դեհիդր օքսիդոռեդուկտազ), **ԳԼԻԴ** (գլ իցերոլ դեհիդրատազ), **ԳԼԻԴՅ** (գլ իցերոլ դեհիդրոգենազ), **ԳՄ** (գլ իցերոլ տեղափոխիչ), **ԴՅԱԿ** (դիհիդրոօքսիացետոն կինազ), **ԼԱԼԴՀ** (լ ալ տալ դեհիդր դեհիդրոգենազ), **ԿԴՅ** (կաթնաթթու դեհիդրոգենազ), **ՄՋԼ** (մրջնաթթու ջրածին լիազ), **ՄԳՍ** (մեթիլ գլ իօքսալ սինթազ), **ՄԳՌ** (մեթիլ գլ իօքսալ ռեդուկտազ), **ՊՋԼ** (պիրուվատ ջրածին լիազ), **ՊԿ** (պիրուվատ կինազ), **1,2-ՊԴՕՌ** (1,2-պրոպանդիոլ ռեդուկտազ), **1,3-ՊԴՕԴՅ** (1,3-պրոպանդիոլ դեհիդրոգենազ), **ՖԵՊԿԿ** (ֆոսֆոէնոլ պիրուվատ կարբօքսիկինազ), **ՖԱՍ** (ֆոսֆատացետիլ տրանսֆերազ): **Միջանկյալ միացույթյուններ և վերջնաթափքներ` ԳԱԼՅՖ** (գլ իցերալ դեհիդր-3-ֆոսֆատ), **ԴՅԱ** (դիհիդրօքսիացետոն), **ԴՅԱՖ** (դիհիդրօքսիացետոն ֆոսֆատ), **3-ՅՊԱ** (3-հիդրօքսիպրոպիոնալ դեհիդր), **ՊԻՐ** (պիրուվատ), **1,2-ՊՌՕ** (1,2-պրոպանդիոլ), **1,3-ՊՌՕ** (1,3-պրոպանդիոլ), **ՕԱԱ** (օքսալ ոացետատ), **ՖՈՒՄ** (ֆոլմարատ), **ՖԵՊ** (ֆոսֆոէնոլ պիրուվատ):

կոնցենտրացիոն գրադիենտի ուղղությամբ և չի պահանջում էներգիա: Գլիցերոլի տեխափոխիչները (GlpF) մենահատուկ չեն, դրանք կարող են տեղափոխել ճարպեր, այլ մոլեկուլներ (գլիցին, միզանյութ), սակայն պետք է նշել, որ Գ3Ֆ-ն չի տեղափոխվում գլիցերոլի տեղափոխիչներով (Duskova et al., 2015): Այս տեղափոխիչները կարգավորվում են թաղանթի լիպիդային կազմով, քանի որ այդ կազմի փոփոխություններն ազդում են գլիցերոլի տեղափոխության արագության վրա: *E. coli*-ում՝ թաղանթի հեղուկային թափանցելիության մեծացմանը զուգահեռ, մեծանում է հասարակ և միջնորդավորված դիֆուզիաների միջոցով գլիցերոլի տեղափոխման արագությունը (Hénin et al., 2008): Սուբստրատների տեղափոխումը միջնորդավորված դիֆուզիայի միջոցով հազվադեպ է հանդիպում, քանի որ մանրէներն հիմնականում ապրում են ցածր կոնցենտրացիաներով սուբստրատների միջավայրերում:

Գլիցերոլի տեղափոխման ակտիվ համակարգերը տեղափոխում են այն՝ կոնցենտրացիայի գրադիենտին հակառակ: *S. cerevisiae* բակտերիայում ակտիվ տեղափոխության արդյունքում ներքջային գլիցերոլի կոնցենտրացիան տասն անգամ բարձր է արտաքին կոնցենտրացիայից (Swinnen et al., 2013): Այս մեխանիզմն ենթադրում է, որ բջիջներից ցիտոպլազմային թաղանթով պրոտոնների արտահոսքի միջոցով ստեղծվում է պրոտոնային գրադիենտ, որի առաջացման համար անհրաժեշտ էներգիան մատակարարվում է ԱԵՖ-ի ճեղքումից: Պրոտոնային գրադիենտի հաստատումից հետո՝ գլիցերոլը կարող է տեղափոխվել պրոտոնի հետմիասին (Ferreira et al., 2005):

1.3. Թաղանթային սպիտակուլների փոխազդեցությունն ու գերհամալիրների ձևավորումը

Բոլոր կենդանի բջիջների և արտաքին միջավայրի միջև տեղի է ունենում մոլեկուլների և իոնների անընդհատ փոխանակություն: Այս բարդ գործընթացում ընդգրկված են բջջի ինչպես առաջնային, այնպես էլ երկրորդային տեղափոխիչ համակարգերը: Ըստ Միտչելի

քեմիոսմոսային տեսության՝ տեղափոխիչ համակարգերի անուղղակի փոխազդեցությունն իրականանում է $\Delta\mu_{H^+}$ -ի և $\Delta\mu_{Na^+}$ -ի միջնորդմամբ (Mitchell and Moyle 1968): Կան նաև բազմաթիվ փորձարարական տվյալներ, որոնք փաստում են այս համակարգերի ուղղակի փոխազդեցության և գերհամալիրների ձևավորման մասին (Trchounian 1997; Brown et al. 2006): Յարկե Նշել, որ այս գերհամալիրների ձևավորումը՝ կարգավորման գենային համակարգերից անկախ, բակտերիաների գոլգորդող թաղանթների առանձնահատկություններից է և նպաստում է արտաքին միջավայրի փոփոխվող պայմաններում բջջի արդյունավետ պատասխանի ձևավորմանը:

Խմորման պայմաններում աղիքային ցուպիկում պրոտոն-կալիումական փոխանակությունը ուսումնասիրությունը առաջ քաշեց գաղափար H^+/K^+ պոմպի մասին (Trchounian and Vassilian 1994; Trchounian 1997), որի հիմքում ընկած է H^+ -ԱԵՖ-ազի և K^+ իոնների տեղափոխիչ TrkA համակարգի ուղղակի փոխազդեցությունը: Գերհամալիրի ներսում ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի արդյունքում անջատված էներգիան ուղղակիորեն փոխանցվում է TrkA համակարգին և ապահովում տեղափոխիչի կողմից K^+ -ի կլանումը՝ նպաստելով ցիտոպլազմի և միջավայրի միջև բարձր կալիումական գրադիենտի ստեղծմանը: Ցույց է տրվել, որ խմորման պայմաններում *E. coli*-ում պրոտոն-կալիումական փոխանակությունը ճնշվում է H^+ -ԱԵՖ-ազի արգելակիչ ԴՅԿԴ-ի ազդեցությունից, և ընթանում է երկու փուլով, որոնցից առաջինը ճնշվում է բացասական օսմոտիկ ազդեցությունից: Այս փուլում ԴՅԿԴ-զգայուն պրոտոն-կալիումական փոխանակությունը բնութագրվում է հաստատուն՝ $2H^+/K^+$ փոխանակությամբ, իսկ երկրորդ փուլում H^+/K^+ փոխանակությունն ընթանում է հոսքերի անկայուն հարաբերությամբ (Trchounian et al. 1998):

Խմորման պայմաններում *E. coli*-ում կալիումական գրադիենտը՝ համեմատած աերոբ շնչառության հետ, ավելի բարձր է: Կալիումական իոնաֆոր վալիսոմիցինը՝ խմորող *E. coli*-ում նվազեցնում է K^+ -ի հոսքը դեպի բջիջ, իսկ աերոբ շնչառությունն իրականացնող բջիջներում տեղի է ունենում K^+ -ի հոսքի մեծացում:

Խմորող աղիքային ցուպիկում H^+ -ԱԵՖ-ազի և TrkA համակարգի ուղղակի փոխազդեցությունը նպաստում է բջջի կողմից էներգիայի

արդյունավետ օգտագործմանը: Պետք է նշել, որ խմորման պայմաններում մեկ մոլեկուլ գլյուկոզի ճեղքումից առաջանում է երկու մոլեկուլ ԱԵՖ, իսկ վերը նշված համակարգերի ուղղակի փոխադեցությունն ապահովում է ձևավորված գերհամալիրի ՕԳԳ-ի մեծացումը մինչև 60-80%, մինչդեռ նրանցից յուրաքանչյուրի առանձին գործունեության դեպքում դրանց ՕԳԳ-ն 20-40% է (Trchounian et al. 1998): Աերոբ պայմաններում, երբ մեկ մոլեկուլ գլյուկոզի ճեղքումից առաջանում է մինչև 30 մոլեկուլ ԱԵՖ, համակարգերն փոխադրում են անուղղակիորեն:

Առաջարկվել է, որ թաղաթնում էներգիայի տեղային փոխանցումը զուգակցվում է վերականգնողական համարժեքների ($H^+ + e^-$) տեղափոխմամբ (Williams, 1994), սակայն ո՛չ պրոտոնային ԱԵՖ-ազում և ո՛չ էլ TrkA համակարգում չկան օքսիդավերականգնողական տեղամասեր: Հետևաբար գերհամալիրի կազմում պետք է ներգրավված լինի նաև այդ համարժեքները տրամադրող որևէ աղբյուր: Թռչունյանն ու համահեղինակները ցույց են տվել, որ *E. coli*-ում $2H^+/K^+$ փոխանակության դեպքում դիտվում է նաև ՄՋԼ համալիրի մասնակցությամբ մոլեկուլային ջրածնի արտադրություն (Trchounian et al., 2012): Վերջինս բացակայել է աերոբ շնչառություն իրականացնող *E. coli*-ում, ինչպես նաև խմորման պայմաններում աճեցված աղիքային ցուպիկի H^+ -ԱԵՖ-ազի և TrkA համակարգի տարբեր ենթամիավորներում խախտումներ ունեցող մուտանտներում (Trchounian and Kobayashi, 2000): Ջրածնի արտադրությունը և $2H^+/K^+$ փոխանակությունը բացակայել է նաև *E. coli*-ի ՄՋԼ համալիրի երկու կարևոր բաղադրամասերի՝ ՄԴՀ-Ի-ի կամ Հիդ-ի բացակայություն ունեցող մուտանտներում ($\Delta fdhF$ կամ $\Delta hycA-H$) (Trchounian et al, 2009): Այս հետազոտությունների հիման վրա էլ առաջարկվեց, որ F_0F_1 - TrkA գերհամալիրի կազմում խմորման պայմաններում գործում է նաև ՄՋԼ համալիրը, որն էլ օքսիդացնելով մրջնաթթուն մինչև ածխաթթու գազի և $2(H^+ + e^-)$ ՝ տրամադրում է վերականգնողական համարժեքներ, որոնք էլ ԱԵՖ-ազից TrkA-ին էներգիայի ուղղակի փոխանցման համար են:

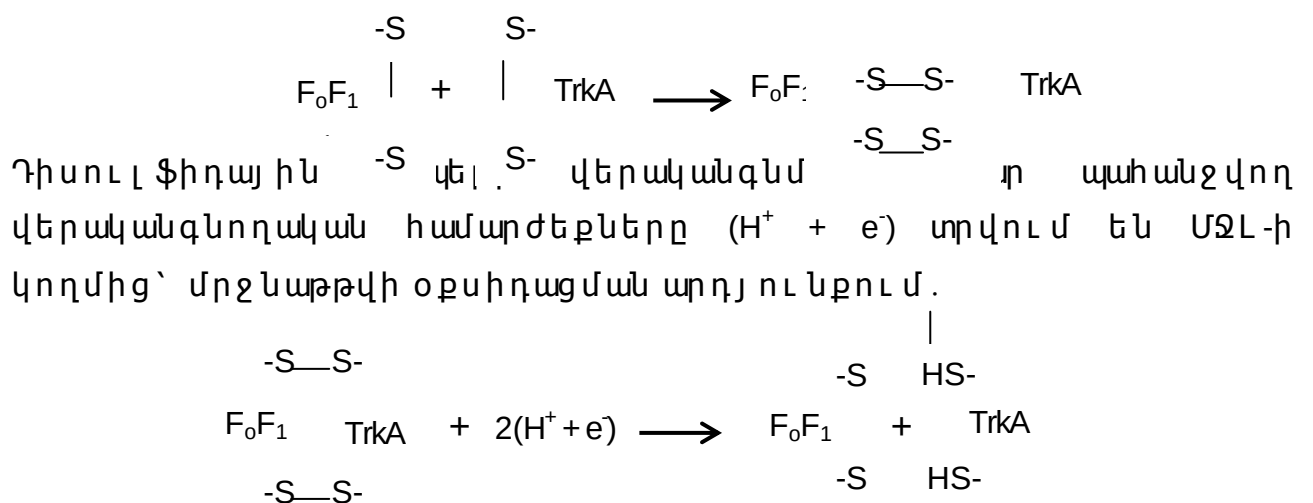
Հետքերքական է ձևավորված F_0F_1 -ՄՋԼ-TrkA գերհամալիրում էներգիայի ուղղակի փոխանցման մեխանիզմնի բացահայտումը:

Հայ տնի է, որ բազմաթիվ տեղափոխիչ սպիտակուցներ և թաղանթակաա ֆերմենտներ ցիստեինային մնացորդների կազմում պարունակում են թիոլային խմբեր: Որոշ սպիտակուցներում թիոլային խմբերը կարող են օքսիդանալ և առաջացնել դիսուլֆիդային կամրջակներ, որի արդյունքում անջատվում է էներգիա և սպիտակուցի ակտիվությունը փոխվում է (Bader and Bardwell, 2001; Kadokura et al., 2003): Հարկ է նշել, որ մի շարք սպիտակուցներում դիսուլֆիդային կամրջակները կատարում են դոնորից H^+ -ի և e^- -ի տեղափոխություն ակցեպտորին, որի ընթացքում տեղի է ունենում դարձելի փոխարկում թիոլային խմբավորումների (Hatahet et al. 2014): Դիթիոլ - դիսուլֆիդային անցումները կարևոր դեր ունեն այնպիսի թաղանթային գործընթացներում, ինչպիսիք են նյութերի տեղափոխությունը, էներգիայի ձևափոխությունը և հորմոն-ընկալիչ փոխազդեցությունը (Li et al., 2007):

Առաջարկվել է, որ F_0F_1 -ՄՋԼ-TrkA գերհամալիրում էներգիայի ուղղակի փոխանցումը F_0F_1 -ից TrkA համակարգին տեղի է ունենում հենց դիթիոլ-դիսուլֆիդային անցումների միջոցով (Trchounian et al., 2009, 2012).



F_0F_1 -ՄՋԼ-TrkA գերհամալիրի առաջացման ժամանակ ձևավորվում են դիսուլֆիդային կամրջակներ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և TrkA-ի միջև: Ներսպիտակուցային դիսուլֆիդային կապերի անցումը միջսպիտակուցայինի՝ չի պահանջում լրացուցիչ էներգիա (Trchounian et al, 1997; Bader and Bardwell, 2001).



Առաջնային տեղափոխիչ F_0F_1 -ի կողմից ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի արդյունքում անջատված էներգիայի մի մասը տրվում է այս գործընթացին: TrkA համակարգի թիոլային խմբերը կատարում են «շարժունակ միջնորդի» դեր և $2H$ -ի հետագա անջատումը և դիսուլֆիդային կամրջակների վերականգնումը բերում է էներգիայի անջատմանը, որն էլ կարող է օգտագործվել երկրորդային տեղափոխիչ համակարգի՝ TrkA-ի կողմից K^+ -ի տեղափոխման համար: Թռչունյանը և համահեղինակները պրոտոնային գրադիենտին վերագրում են կարգավորիչի դեր (Թռչունյան, 2001): Պետք է նշել, որ թերմոդինամիկական նպատակահարմարության տեսանկյունից գերհամալիրի երկու տեղափոխիչները՝ F_0 -ն և TrkA-ն, օգտագործում են էներգիայի մեկ ձևափոխիչ՝ F_1 : Այս պոմպն աշխատում է առավել մեծ արդյունավետությամբ, քանի որ ԱԵՖ-ի էներգիան միաժամանակ ծախսվում է ինչպես պրոտոնային պոտենցիալի առաջացման, այնպես էլ կալիումիական գրադիենտի ստեղծման վրա: Սա հնարավորություն է տալիս նվազեցնել էներգիայի կորուստը և թաղանթը դարձնել վնասվածքների նկատմամբ կայուն:

Այս գերհամալիրի առանձին բաղադրամասերի ուսումնասիրությունը, ինչպես նաև միմյանց հետ փոխազդեցությունը տարբեր սուբստրատների խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում ունի կարևոր նշանակություն ոչ միայն նշված ֆերմենտների դերի բացահայտման տեսանկյունից, այլ նաև կարևոր է ընդհանուր նյութափոխանակային գործընթացի, էներգափոխանակության կարգավորման մեխանիզմների և սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցությունների ուսումնասիրության առումով:

1.4. *Geobacillus* **ցեղի** նկարագրությունը

Ձերմասեր մանրէների մեծ մասը *Geobacillus* և *Anoxybacillus* ցեղերի ներկայացուցիչներ են, որոնք տարածված են միմյանցից ֆիզիկաքիմիական հատկություններով տարբերվող ցածր, միջին և տաք ջերմաստիճանների աշխարհագրական տիրույթներում: Այնուամենայնիվ, այս ցեղերի տեսակների հիմնական միջավայրերը

երկրաջերմային աղբյուրներն են:

Geobacillus ցեղի ներկայացուցիչներն ի սկզբանե դասակարգվել են *Bacillus* ցեղում՝ որպես *Bacillus* spp. ի ջերմասեր տարբերակներ, սակայն հետագա ֆենոտիպային և գենային ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ հայտնաբերված ջերմասերները կազմում են առանձին ֆիլոգենետիկ ճյուղ (Margaryan et al., 2018): Գեոբացիլների մեծ մասը աճում է 35-75°C ջերմաստիճային և pH-ի 6.0-8.5 սահմաններում, աճի համար նպաստավոր են pH-ի 6.2-7.5 և ջերմաստիճանի 55-65°C տիրույթները: Աերոբ կամ ֆակուլտատիվ անաերոբ են, էլեկտրոնի վերջնական ակցեպտորը թթվածինն է, բայց որոշ տեսակներում կարող է լինել նաև նիտրատը: Գրամ-դրական, սպոր (էլիպսաձև կամ գլանաձև) առաջացնող բացիլներ են, գաղութների ձևը և չափերը տարբեր են, կենտրոնական հատվածում կարող է կուտակվել գուռանյութ: Գեոբացիլների զգալի մասը յուրացնում է ֆրուկտոզ, գլյուկոզ, մալտոզ, մաննոզ, սախարոզ և արտադրում թթուներ, բայց ոչ գազ: Տեսակների մի մեծ մասն էլ յուրացնում է *n*-ալկաններ՝ որպես ածխածնի և էներգիայի աղբյուր: Գրեթե բոլոր գեոբացիլներն արտադրում են արտաբջջային, ջերմակայուն, ջրալուծ և արտադրական մեծ կիրառելիություն ունեցող ֆերմենտներ (Panosyan et al., 2018): Գենոմի միջին երկարությունը տատանվում է տատանվում է 3.5-3.9 մլն նուկլեոտիդային գույգի սահմաններում: Ամենափոքրը գենոմը *G. kaustophilus*-ն է, իսկ ամենամեծը՝ *G. thermoglucosidasius*-ը:

Գեոբացիլները լայնորեն տարածված են բնության մեջ և մեկուսացվել են տարբեր միջավայրերից, օրինակ, կոմպոստից, տաք և խոր երկրաջերմային աղբյուրներից, նավթահորերից և խորքային նստվածքներից: Բայց և այնպես, վաղուց է հայտնի, որ գեոբացիլների տեսակներ կարող են նաև մեկուսացվել միջին և ցածր ջերմաստիճանային միջավայրերից, օրինակ, անտառային հողերից, Բուխվյան Անդերից և Նույնիսկ Մարիանյան փողրակից (Hussein et al., 2015):

Ջերմասեր բացիլները՝ բարձր ջերմաստիճաններում աճելու շնորհիվ, զարգացրել են այդ ծայրահեղ միջավայրերում հարմարվելու տարբեր մեխանիզմներ: Ջերմահարմարողականության

հիմնական մեխանիկական որոշիչները թաղանթների ֆոսֆոլիպիդային կազմն է, ջերմային շոկի սպիտակուցներ սինթեզելն է, նաև ֆերմենտների կառուցվածքային ճկունությունը: Գենոմում Գ-Ց զույգի բարձր քանակը նույնպես նպաստում է դրանց ջերմահարմարողականությանը: Ցույց է տրվել, որ փսիխրոֆիլ (ցրտասեր, *Psychrobacter*), մեզոֆիլ (*E.coli*) և ջերմասեր (*G. stearothermophilus*) բակտերիաներից անջատված լիպիդները միմյացից զգալիորոն տարբերվում են (Margaryan et al., 2018): Աճման ջերմաստիճանի բարձրացման հետ, բակտերիաներում նվազում է չհագեցած կապերի քանակը և ավելանում լիպիդային ացիլային շղթաների ճյուղավորումը: Ջերմասերները մեզոֆիլներից տարբերվում են նաև ճարպաթթուներով և ֆոսֆոլիպիդների բևեռային կազմով:

Ջերմահարմարվողական հատկությունների բազմազանության և շրջակա միջավայրի ծանր պայմաններին դիմակայելու ունակության շնորհիվ, այս մանրէները արժեքավոր աղբյուր են ջերմակայուն ֆերմենտների, օրինակ ամիլազների, լիպազների, պրոտեազների և այլ բաղադրիչների համար: Այս ֆերմենտները մեծ պահանջարկ ունեն և լայնորեն կիրառվում են տարբեր կենսատեխնոլոգիական և արդյունաբերական գործընթացներում, քանի որ սովորաբար չեն բնափոխվում բարձր ջերմաստիճաններում, այլ ակտիվ են, ավելի դիմացկուն են քիմիական նյութերի և pH-ի ծայրահեղ արժեքների նկատմամբ: Ինչպես արդեն նշվեց, գեոբացիլներն ունեն մեծ ներուժ և կարող են օգտագործվել կենսամաքման, հատկապես, արոմատիկ միացությունների քայքայման և ծանր մետաղների հեռացման նպատակով: Օրինակ՝ *Geobacillus thermantarcticus*-ի 50 մգ/լ չոր բջջային զանգվածը կարող է հեռացնել Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} և Mn^{2+} , համապատասխանաբար, մինչև 85.4%, 46.3%, 43.6% և 65.1% (Margaryan et al., 2018):

Ջերմասեր մանրէների մեկուսացումը և ուսումնասիրումը կարևորվում է ինչպես հիմնարար գիտական նպատակների, այնպես էլ կիրառական տեսանկյուններից:

ԳԼՈՒԽ 2

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐՆ ՈՒ ՆՅՈՒԹԵՐԸ

2. 1. Բակտերիաներ և նյութեր

Հետազոտությանը ունենցող մոլսումնասիրվել են *E.coli*-ի ֆակուտատիվ անաերոբ գրամբացասական վայրի տիպի և ՄՋԼ համալիրի տարբեր բաղադրամասերի, Հիդ-նեռի կամ դրանք կարգավորող սպիտակուցների գենետիկական խանգարումներով հետևյալ շտամները (աղյուսակ 2.1).

- *E.coli* –ի BW25113 (նախնի), JW2701, JW0955, JW2962, MW1000 շտամները տրամադրել է պրոֆ. Թոմաս Վոլդը (Քիմիական ճարտարագիտության կենսաքիմիայի և մոլեկուլային կենսաբանության ամբիոններ, Փենսիլվանիայի պետական համալսարան, ԱՄՆ),
- *E.coli* –ի FM460, DHP-F2 շտամները տրամադրել է պրոֆ. Գարի Սովերսը (Կենսաբանության/Մանրէաբանության ինստիտուտ, Մարտին Լյութերի անվան Հալլե-Վիտենբերգի համալսարան, Գերմանիա),
- JRG3621 շտամը տրամադրել է պրոֆ. Սիմոն Անդրյուսը (Կենսաբժշկության բաժանմունք, մանրէաբանության գիտահետազոտական խումբ, Կենսաբանական գիտությանը ունենցող դպրոց, Ռիդինգի համալսարան, Մեծ Բրիտանիա)
- KT2110 եռակի խանգարումով շտամը կառուցել է դոցենտ, կ.գ.դ. Կարեն Թռչունյանը (Կենսաքիմիայի մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոն, Կենսաբանության ֆակուլտետ, Կենսաբանության գիտահետազոտական ինստիտուտ, Երևանի պետական համալսարան, ՀՀ) պրոֆ. Գ. Սովերսի և Լաբորատորիայում,
- *G. toebii* ArzA-8 (MDC 11859) շտամը մեկուսացրել և տրամադրել է դոցենտ, կ.գ.թ. Հովհիկ Փանոսյանը (Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոն, Կենսաբանության ֆակուլտետ, Երևանի պետական համալսարան, ՀՀ):

Փորձերում օգտագործվել են հետևյալ նյութերը.

- ազար, տրիսամինոմեթան, տրիս-HCl, ստանդարտ բուժերային և ուծոնյթներ, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , եռլորքացախաթթու, Ֆոլին-

Չոկալ տեղի ռեակտիվ, դեզօքսիտիլ աթթվի նատրիումական աղ (Roth, Գերմանիա)

- ալբումին, լիզոցիմ, ԱԵՖ, ԴՑԿԴ, ԴՆԹազ, սախարոզ (Roth, Գերմանիա, Sigma, ԱՄՆ)
- գլյուկոզ, գլիցերոլ (Roth, Գերմանիա, Unichem, Չինաստան)
- պեպտոն (Roth, Գերմանիա, Sigma, ԱՄՆ)

Լուծույթների պատրաստման հսմար օգտագործվել է թորած ջուր, էթիլ սպիրտ, ԱԵՖ-ի լուծույթը պատրաստվել է տրիս-HCl բուֆերում: Լուծույթները պահպանվել են ջերմաստիճանային համապատասխան պայմաններում:

Աղյուսակ 2.1

Աշխատանքում օգտագործված *E. coli*-ի շտամները

Շտամը	Գենետիկական բնութագիրը	Յիդրոգենազների հետկապված նկարագիրը	Գրականություն
BW 25113	<i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{W116} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} Δrha BAD_{LD78}</i>	Նախնի (վայրի տեսակի)	Maeda et al., 2007
JW 0955	BW25113 <i>ΔhyaB</i>	Յիդ-1-ի մեծ ենթամիավորի բացակայություն	Maeda et al., 2007
JW 2962*	BW25113 <i>ΔhybC</i>	Յիդ-2-ի մեծ ենթամիավորի բացակայություն	Maeda et al., 2007
JW 2701*	BW25113 <i>ΔfhfA</i>	ՄՋԼ-ի կարգավորիչի բացակայություն	Baba et al., 2006
MW 1000	BW 25113 <i>ΔhyaB ΔhybC</i>	Յիդ-1-ի և Յիդ-2-ի մեծ ենթամիավորների բացակայություն	Maeda et al., 2007
KT 2110	BW 25113 <i>ΔhyaB ΔhybC ΔselC</i>	Յիդ-1-ի և Յիդ-2-ի մեծ ենթամիավորների և սելենացիստեինի փոխադրող ՌՆԹ-ի բացակայություն	Trchounian et al, 2012
FM 460*	MC 4100 <i>ΔselC</i>	Սելենացիստեինի փոխադրող ՌՆԹ-ի խանգարում, ՄԴՅ-ների սինթեզի բացակայություն	Trchounian et al, 2012
DHP-F2	MC 4100 <i>ΔhypF</i>	Յիդ-1-ի, Յիդ-2-ի, Յիդ-3-ի և Յիդ-4-ի բացակայություն	Paschos et al., 2002

JRG3621	MC4100 $\Delta(hyfB-R)::spc$	Հիդ-4-ի բացակայություն	Skibinski et al., 2002
---------	------------------------------	---------------------------	------------------------

*այս շտամները կայուն են կանամիցինի նկատմամբ

Փորձերում օգտագործված ապակե և պլաստմասե սրվակները, փորձանոթները և մնացած լաբորատոր սպասքը ախտահանվել են:

2. 2. Բակտերիաների աճեցումը, պահպանումը և նախապարաստումը փորձին

Բակտերիաների բուր շտամները պահպանվել են լաբորատոր թանգարանում՝ համապատասխան ագարի կտրվածքների վրա, սառցախցիկում -20°C ջերմաստիճանում: 3 շաբաթյա պարբերականությամբ տեղափոխվել են ու պահվել Պետրիի թասիկներում պինդ սննդամիջավայրի վրա՝ $3-5^{\circ}\text{C}$ ջերմաստիճանում սառնարանում:

Անարերոբ պայմաններում բակտերիաների աճեցման համար՝ Պետրիի թասիկներից բակտերիաները ներմուծվել են համապատասխան հեղուկ միջավայրով փորձանոթ և աճեցվել 18-22 ժամ ջերմակայուն պահարանում (թերմոստատ)՝ 37°C ջերմաստիճանում: pH-ի տարբեր արժեքներով աճման հեղուկ սննդամիջավայրերը պարունակել են 20 գ/լ պեպտոն, 15 գ/լ K_2HPO_4 , 1.08 գ/լ KH_2PO_4 , 5 գ/լ NaCl (**pH 7.5**), 20 գ/լ պեպտոն, 7.4 գ/լ K_2HPO_4 , 8.6 գ/լ KH_2PO_4 , 5 գ/լ NaCl (**pH 6.5**) կամ 20 գ/լ պեպտոն, 15 գ/լ KH_2PO_4 , 1.08 գ/լ K_2HPO_4 , 5 գ/լ NaCl (**pH 5.5**) (Trchounian et al., 2012, Bibulyan and Trchounian 2015): Աճման միջավայրերին ավելացվել է 0.2 % կամ 0.8 % գլյուկոզ և/կամ 10 գ/լ գլիցերոլ (Trchounian et al., 2012, Bibulyan 2016): Բակտերիաների աճին հետևել են կախույթի օպտիկական խտության (ՕԽ) չափման միջոցով, 600 նմ ալիքի երկարության տակ՝ Spectro UV-vis Auto (Labomed, ԱՄՆ) կամ SP-2000 սպեկտրալ ուսաչափերի (Hinotek, Չինաստան) օգնությամբ:

Բակտերիաները հեղուկ սննդամիջավայրից անջատվել են 5000-6000 պտ/ր արագությամբ 15-20 րոպե ցենտրիֆուգմամբ (Rotina 420R, Hettich, Գերմանիա, PC-6, ՌԴ): Ստացված նստվածքը լվացվել է թորած ջրով և նորից ցենտրիֆուգվել վերը նշված պայմաններում: Այնուհետև, կախույթը տեղափոխվել է փորձարարական լուծույթ,

որը պարունակել է 18.15 գ/լ տրիսամինոմեթան, 1 մՄ NaCl, 1 մՄ KCL, 0.4 մՄ MgSO₄:

Փորձերում բակտերիաները ԴՑԿԴ-ով նախօրոք մշակվել են:

Փորձերում օգտագործված *G. toebii* ArzA-8 բակտերիան մեկուսացվել է Արգաքանի (Հայաստանի Հանրապետություն) երկրաջերմային աղբյուրից (ջերմաստիճանը > 44 °C, pH 7.0-7.2) (Panosyan et al., 2018): Բակտերիան աճեցվել է սննդարար արգանակում (ՍԱ) (5 գ/լ պեպտոն, 1.5 գ/լ մսային արգանակ, 1.5 խմորասկային մզվածք, 5 գ/լ NaCl), pH 7.5 կամ pH 6.5, աերոբ պայմաններում (թափահարիչի վրա 250 պտոյ տրոպե արագությամբ, 55 °C ջերմաստիճանում)՝ տարբեր կոնցենտրացիաներով գլյուկոզի առկայությամբ (5, 11, 22 մՄ) կամ առանց գլյուկոզի:

Միջավայրի pH-ը որոշվել է 0.01 միավորի ճշտությամբ HJ1131B կամ Hi2210 pH-չափիչների օգնությամբ (Hanna Instruments, Պորտուգալիա) և համապատասխան ընտրողական էլեկտրոդի օգնությամբ: pH-չափիչի ցուցմունքները տրամաչափվել են ստանդարտ բուժերային լուծույթների միջոցով: Միջավայրի pH-ը կարգավորվել է 0.1 Մ NaOH-ի կամ HCl-ի միջոցով:

2.3. *Escherichia coli*-ի «ուղիղ» և «շրջված» թաղանթային բշտիկների ստացումը

«Ուղիղ» թաղանթային բշտիկները ստացվել են Քենսինգտոնի և Քեբակի մեթոդով (Koningst and Kabackt, 1973): Բակտերիաների զանգվածը (1 լ) նստեցվել է 20 րոպե տևողությամբ 5000 պտրոպե արագությամբ ցենտրիֆուգմամբ 4 °C ջերմաստիճանի պայմաններում: Ստացված նստվածքը լուծվել է 10մՄ տրիս-HCl (pH 8.0) բուժերում և կրկին ցենտրիֆուգվել 10 րոպե, որից հետո բակտերիաների կախույթը (1 մլ) տեղափոխվել է քիչ ծավալով (5 մլ) 30 մՄ տրիս-HCl բուժեր (pH 8,0): Վերջինս պարունակել է 10 մՄ էթիլենդիամին-տետրապեպտաթթվային (ԷԴՏԹ) նատրիում, 0.5 մՄ MgCl₂, 20 % սախարոզ: Բջջապատը քայքայվել է 2-4 °C ջերմաստիճանի և անընդհատ թափահարման պայմաններում, 30 րոպեի ընթացքում՝ 0.5 մգ/մլ քանակով լիզոցիմի ներկայությամբ: Ստացված սֆերոպլաստները

ցենտրիֆուգվել են 15 րոպե՝ 5000 պտ/րոպե արագությամբ, այնուհետև ստացված կախույթը (1 մլ) լուծվել է 10 մՄ տրիս-HCl բուֆեր (9 մլ, pH 6.6), որը պարունակել է 2 մՄ $MgSO_4$, 10 մկգ/մլ ԴՆԹ-ազ-1 և «քանդվել» արագ դիսպերսիայով՝ 13 չափսի ներմաշկային ներարկիչով: Ստացված լիզատը ինկուբացվել է (պահվել է) 30 րոպե թափահարիչի վրա, 37 °C ջերմաստիճանում՝ թերմոստատում կամ թերմոստատի օգնությամբ ջերմակայունացվող խցիկում: 15 րոպե անց ավելացվել է 5 մՄ $MgSO_4$ և 20 մկգ/մլ ԴՆԹ-ազ-1: Լիզատի ինկուբացիան շարունակվել է ևս 15 րոպե, որից հետո ստացված կախույթը ցենտրիֆուգվել է 1 ժամ 500 պտ/րոպե արագությամբ կամ մոտավորապես 800 g արագացմամբ՝ կախված ռոտորի տեսակից: Վերնստվածքային հեղուկից թաղանթները նստեցվել են 28000 պտ/րոպե արագությամբ ցենտրիֆուգմամբ (կամ մոտավորապես 46000 g արագացմամբ):

«Շրջված» թաղանթային բշտիկների ստացման համար բակտերիաների կախույթը (5 մլ) նստեցվել է 20 րոպե տևողությամբ 5000 պտ/րոպե արագությամբ ցենտրիֆուգմամբ՝ 4 °C ջերմաստիճանի պայմաններում: Նստվածքը լվացվել է 10մՄ տրիս-HCl (pH 7.5) բուֆերում, որը պարունակել է 5 մՄ $MgSO_4$, որից հետո կախույթը (1 մլ) տեղափոխվել է նույն բուֆերի մեջ և բջիջները կոտրվել են ֆրանսիական մամլիչի (Ֆրենչ պրես) օգնությամբ՝ 55,2 ՄՊա ճնշման տակ: Չկոտրված բջիջները անջատվել են 20000 պտ/րոպե (32000 g արագացում) արագությամբ 15 րոպե տևողությամբ ցենտրիֆուգմամբ՝ 4 °C ջերմաստիճանի պայմաններում: «Շրջված» թաղանթային բշտիկները վերնստվածքային հեղուկից անջատվել են 1 ժամ 50000 պտ/րոպե (կամ 210000 g արագացում) արագությամբ ցենտրիֆուգմամբ՝ Beckman L-2 ուլտրացենտրիֆուգի միջոց (Reenstra and Forte, 1990):

2.4. ԱԵՖ-ազային ակտիվություն և որոշումը

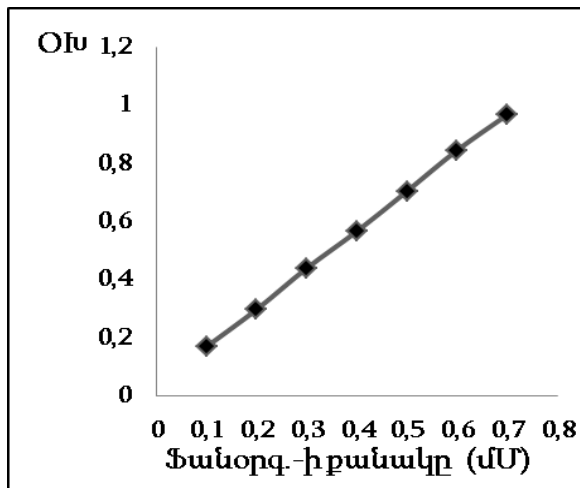
ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը որոշվել է թաղանթային բշտիկների հետ ԱԵՖ-ի ռեակցիայի արդյունքում անջատված անօրգանական ֆոսֆատի ($\Phi_{\text{անօրգ}}$) քանակի չափման միջոցով: ԱԵՖ-

ազայ ին ակտիվությունն արտահատվել է միավոր ժամանակում սպիտակուցի միավոր քանակից անջատված անօրգանական ֆոսֆատի քանակով: Անօրգանական ֆոսֆատի քանակը որոշվել է թաուսկիի և Շորի գուևաչ ափիչ մեթոդով (Taussey and Shorr 1953):

Փորձանոթի մեջ (37°C ջերմաստիճանում) լցվել է 2.5 մլ ռեակցիոն խառնուրդ (pH 5.5, 6.5 կամ 7.5), որը պարունակել է 50 մՄ տիսամինոմեթան, 1 մՄ կալցիումի քլորիդ, 2.5 մՄ MgSO_4 և անհրաժեշտության դեպքում կալիումի քլորիդ՝ 100 մՄ վերջնական կոնցենտրացիայով և ներմուծվել են թաղանթային բշտիկները (100 մկգ սպիտակուցի քանակով): Այնուհետև ավելացել է 0.2 Մ-անոց ԱԵՖ՝ 5 մՄ վերջնական կոնցենտրացիայով, արագ թափահարվել, անմիջապես վերցվել է 0.5 մլ նմուշ և լցվել ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի ռեակցիան կանգնեցնող 0.5 մլ 10 %-անոց ԵՔԲ պարունակող առաջին փորձանոթի մեջ և թափահարվել: Սահամարվել է 0 ռոպեն, որից հետո 5, 10 և 15 ռոպե անց վերցվել են 0.5 մլ նմուշներ և լցվել համապատասխանաբար՝ 2-րդ, 3-րդ և 4-րդ փորձանոթների մեջ, որոնցում նույնպես առկա է եղել 0.5 մլ 10 %-անոց ԵՔԲ: Անջատված անօրգանական ֆոսֆատի քանակի չափման համար յուրաքանչյուր նմուշին 1 ռոպե պարբերությամբ ավելացվել է 0.5 մլ ֆոսֆոռեազենտ, թափահարվել և 10 ռոպե անց չափվել է ՕԽ-ն՝ 710 նմ ալիքի երկարության ներքո և որպես ստուգիչ վերցվել է ռեակցիոն խառնուրդը: Հաշվարկվել են ՕԽ-ների միջինացված արժեքները: Անօրգանական ֆոսֆատի քանակը հաշվարկվել է Na_2HPO_4 -ի 0.01 Մ-անոց լուծույթի տարբեր ծավալների օգնությամբ ստացված տրամաչ ափիչ կորի միջոցով: ԴՏԿԴ-ի նկատմամբ զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը հաշվարկվել է ԴՏԿԴ-ով չմշակված և ԴՏԿԴ-ով մշակված թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունների տարբերությամբ: K^+ -ի վերջնական կոնցենտրացիան ռեակցիոն խառնուրդում եղել է 100 մՄ:

Ֆոսֆոռեազենտի տրամաչ ափումը կատարվել է Na_2HPO_4 -ի 0.01 Մ-անոց լուծույթով: 8 փորձանոթների մեջ լցվել են 0.5 մլ -ական ռեակցիոն խառնուրդ, 10 %-անոց ԵՔԲ: Յուրաքանչյուր փորձանոթին ավելացվել է Na_2HPO_4 -ի 0.01 Մ-անոց լուծույթ, համապատասխանաբար, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 մկլ ծավալներով՝ անօրգանական ֆոսֆատի

տարբեր քանակներով (0 մՄ, 0.1 մՄ, 0.2 մՄ, 0.3 մՄ, 0.4 մՄ, 0.5 մՄ, 0.6 մՄ, 0.7 մՄ): Այնուհետև յուրաքանչյուր փորձանոթին ավելացվել է 0.5 մլ - ական ֆոսֆոռետազենտ, արագ թափահարվել և 10 րոպե անց 710 նմալիքի երկարության ներքո չափվել են լուծույթների ՕԽ-ները: Կառուցվել է ՕԽ-ի կախվածության կորը $\Phi_{\text{անօրգ.}}$ -ից (նկ. 2.1)



Նկ.2.1 ՕԽ կախվածությունը անօրգանական ֆոսֆատի քանակից $\Phi_{\text{անօրգ.}}$

2.5. Սափտակուլոցի քանակի որոշումը

Սափտակուլոցի քանակը որոշվել է Լոուրիի սպեկտրալ ուսաչափիչ եղանակով, որն իր մեջ համադրում է բիուրետային ռեակցիան (ռեակցիան պեպտիդային կապերի վրա) և Ֆոլինի ռեակցիան (թիրոզինի և տրիպտոֆանի վրա)՝ որպես ստանդարտ օգտագործելով եզան շիճուկային ալբումինը (Lowry et al. 1951):

10-100 մկգ սափտակուլոցի պարունակությամբ հետազոտվող լուծույթը թորած ջրով հասցվել է 0.4 մլ-ի, իսկ նույնքան սափտակուլոցի պարունակությամբ թաղանթային բշտիկների կախույթը (10 մկլ քանակով) հասցվել է 0.4 մլ-ի Na-դեզօքսիտուլատի (ԴՕԽ) 1 %-անոց լուծույթով: Այնուհետև ավելացվել է 2 մլ ռեակտիվ «Գ» (նատրիումի կարբոնատի և պղնձի սուլֆատի լուծույթ): 10 րոպե անց ավելացվել է 0.2 մլ Ֆոլին-Չոկալ տեուի ռեակտիվ, խառնվել և 30-40 րոպե անց սպեկտրալ ուսաչափով չափվել է ՕԽ-ն՝ 750 նմ երկարության լույսի ալիքի տիրույթում:

Տրամաչափիչ կորի կառուցման համար 6 փորձանոթներում լցվել է համապատասխանաբար 0.04, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32 և 0.4 մլ ալբումինի

(1 մլ -ում 0.25 մգ սպիտակուցի պարունակությամբ) լուծույթ և թորած ջրով հասցվել մինչև 0.4 մլ -ի: Հետագա մշակումը կատարվել է ինչպես հետազոտվող նմուշների դեպքում: Ստացված ՕԽ-ների արժեքները տեղադրվել են օրդինատների առանցքի վրա, իսկ սպիտակուցի քանակը՝ արսցիսների առանցքի վրա: Օգտվելով տրամաչափիչ կորից՝ որոշվել է թաղանթային բշտիկների կախումը լուծույթում սպիտակուցի քանակից:

2.6. Բջջաթաղաթներով իոնների տեղափոխման ուսումնասիրումն իոնների ակտիվության որոշման պրտենցիաչ ափիչ մեթոդով

Բակտերիաների պլազմային թաղանթներով իոնների տեղափոխությունն ուսումնասիրվել է՝ հաշվի առնելով միջավայրում նրանց ակտիվության փոփոխություն, ինչն էլ որոշվել է պրտենցիաչ ափիչ մեթոդի օգնությամբ: Մեթոդի հիմքում ընկած է համեմատական և իոն-ընտրողական էլեկտրոդներից կազմված գալվանական մարտկոցի էլեկտրաշարժիչ ուժի չափումը: Այս մեթոդը թույլ է տալիս ճշգրտորեն որոշել իոնների հոսքի նույնիսկ չնչին փոփոխությունները բակտերիաներում, քանի որ բակտերիաներում բջջի մակերես/բջջի ծավալ հարաբերությունը բավականին մեծ է (10^{-4} սմ⁻¹) (Թռչունյան և ուրիշ., 2012):

Միջավայրում H^+ -ի և K^+ -ի ակտիվության որոշման համար օգտագործվել են համապատասխան կատիոն-ընտրողական էլեկտրոդներ ("НИКО АНАЛИТ" գիտարտադրական ընկերություն, ք. Մոսկվա, ՌԴ): Որպես համեմատական էլեկտրոդ օգտագործվել է ՅВЛ-ГМЗ (Գոմելի էլեկտրաչափիչ սարքերի գործարան, Գոմել, Բելառուս) քլորարծաթյա էլեկտրոդը՝ պատրաստված 3 Մ KCl-ի լուծույթի հիման վրա: Միաժամանակ օգտագործվել են K^+ -ի համակցված էլեկտրոդներ ("НИКО АНАЛИТ" գիտարտադրական ընկերություն, ք. Մոսկվա, ՌԴ):

Կատիոն-ընտրողական էլեկտրոդներն ընդհանուր համեմատական էլեկտրոդի հետ համակցված էլեկտրոդը տեղադրվել է փորձարարական լուծույթով (տրիս-ֆոսֆատային բուֆեր, որը պարունակում է 0.1 Մ-անոց NaCl 1 %, 0.1 Մ-անոց KCl 1 % 25 % MgSO₄)

լ ցված անոթի մեջ, որն էլ տեղադրված է եղել թերմոստատի միջոցով ջերմակայ ու նացվող խցիկում (37°C):

Էլեկտրոդների ցուցմունքներն որոշվել են իոնաչափի (HANNA Instruments, Պորտուգալիա) օգնությամբ և գրանցվել են համակարգչի միջոցով՝ LabView ծրագրով (Սեֆերյան, 2009): Անոթում լուծույթը կամ բակտերիաների կախույթն անընդհատ խառնվել է մագնիսական խառնիչի օգնությամբ:

pH-էլեկտրոդի տրամաչափումը կատարվել է բուֆերային ստանդարտ լուծույթներով: Միջավայրում H^+ -ի ակտիվությունն որոշվել է 0.01 Ն աղաթթվի լուծույթով փորձարարական լուծույթի տրամաչափմամբ:

K^+ -ի էլեկտրոդային պոտենցիալի թեքության կախվածությունը որոշվել է տրամաչափիչ կորի օգնությամբ, և այն սովորոբար հավասար է 56-58 մՎ-ի (37°C աստիճանում):

Միջավայրում K^+ -ի իոնների ակտիվությունն որոշվել է Նիկոլսկու հավասարման օգնությամբ.

$$E = E_0 + S \lg (a_{\text{K}^+} + K_{\text{Na}^+}),$$

որտեղ E -ն էլեկտրոդային պոտենցիալն է, E_0 -ն՝ ստանդարտ էլեկտրոդային պոտենցիալը, S -ը՝ էլեկտրոդի թեքությունը, K -ն էլեկտրոդի ընտրողականության հաստատունն է Na -ի նկատմամբ (մեր դեպքում այն հավասար է եղել 0.1-0.11), իսկ a_{K^+} և a_{Na^+} -ը միջավայրում, համապատասխանաբար, K^+ -ի և Na -ի ակտիվություններն են:

2.7. Օքսիդական-գնդական արտենցիալի որոշումը

Օքսիդական-գնդական (ռեդօքս) պոտենցիալի չափման համար օգտագործվել են բելառուսական արտադրության ՓՈԲ-1 տեսակի հարթ, կետային պլատինե (Pt) էլեկտրոդը կամ PT42BNC էլեկտրոդը (HANNA Instruments, Պորտուգալիա) և ՅՕ-021 տեսակի տիտան-սիլիկատային (Ti-Si) ապակյա էլեկտրոդը (Գոմելի էլեկտրաչափիչ սարքերի գործարան, Գոմել, Բելառուս): ՅՕ-021 էլեկտրոդը քիմիապես կայուն է, ինչի շնորհիվ էլ օգտագործվում է pH-ի և ջերմաստիճանի լայն տիրույթներում: Բացի այդ, տիտան-սիլիկատային էլեկտրոդը զգայուն է մոլեկուլային թթվածնի և մոլեկուլային ջրածնի նկատմամբ, նաև ընդունակ է կատալիզել ու ռեդօքս ռեակցիաներ,

ինչն էլ պայմանավորում է այս էլեկտրոդի առավելությունը պատին էլեկտրոդի նկատմամբ: Վերոհիշյալ հատկությունների շնորհիվ տիտան-սիլիկատային էլեկտրոդն օգտագործվում է բակտերիաների կախույթի ռեդօքս պոտենցիալի որոշման, իսկ պատին էլեկտրոդը՝ միջավայրում մոլեկուլային ջրածնի արտադրության որոշման համար (Թռչունյան և ուրիշն., 2012):

Փորձերից առաջ էլեկտրոդների պոտենցիալը չափվել է կալիումի երկաթացիանիդի խառնուրդ պարունակող ստուգիչ լուծույթում ($0.049 \text{ M K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ և $0.05 \text{ M K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH 6.86): Այս լուծույթում ռեդօքս պոտենցիալը 25°C -ում՝ քլորարժաթյա էլեկտրոդի համեմատ, եղել է $254 \pm 10 \text{ մՎ}$:

2.8. Բակտերիաների աճման տեսակարար արագությունը որոշումը

Բակտերիաներն աճեցվել են անաերոբ խմորման պայմաններում, բարձր բուժերայնությամբ պեպտոնային միջավայրերում: Բակտերիաների աճին հետևել են կախույթի Օհս փոփոխության չափման միջոցով՝ սպեկտրալ ուսաչափի օգնությամբ, 600 նմ երկարությանը սի ալիքի ներքո: Կախույթի Օհս փոփոխմանը հետևել են աճման ընթացքում մինչև աճման կայուն ստացիոնար փուլի հաստատումը, այսինքն, երբ Օհս-ի արժեքը մնացել է անփոփոխ: Լոգարիթմական փուլում աճման տեսակարար արագությունը հաշվարկվել է ըստ հետևյալ բանաձևի (Թռչունյան և ուրիշն., 2012),

$$\mu = 0.693/k$$

որտեղ՝ μ -ն աճման տեսակարար արագությունն է, k -ն օպտիկական խտության կրկնապատկման ժամանակը:

2.9. Արդյունքների մշակումը

Բակտերիաների աճման տեսակարար արագության, թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվության մեծությունները ներկայացված են առնվազն երեք անկախ փորձերի միջին արժեքներով: Մնացած արդյունքները վիճակագրական մշակման են ենթարկվել և հաշվարկվել են միջին արժեքների ստանդարտ շեղումները (Лакин, 1992): Վերջիններս չեն գերազանցել 3 %-ը: Տարբեր պայմաններում կամ գործոնների ազդեցությամբ

արդյունքների տարբերության համար հաշվարկվել է Ստյունդենտի հավաստիության գործակիցը (p) (Лакин, 1992): Հաշվարկների համար օգտագործվել է Microsoft Excel 2016 համակարգչային ծրագիրը:

ԳԼՈՒԽ 3

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐՆ ՈՒ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

3.1. *Eschereichia coli* –ի տարբեր հիդրոգենազների և F_0F_1 -ԱԵՖ- ազային ակտիվությունն կապը գլիցերոլի խմորման պայմաններում

Ցույց է տրվել, որ անթթվածին պայմաններում, pH-ի թույլ թթվային արժեքի դեպքում *E. coli*-ն յուրացնում է գլիցերոլը և իրականացնում դրա խմորումը (Dharmadi et al., 2006), որի արդյունքում առաջանում են տարբեր օրգանական թթուներ, այդ թվում՝ քացախաթթու, սաթաթթու, H_2 , CO_2 , էթանոլ և այլն: Նշված նյութերն առաջանում են նաև շաքարների խմորման ընթացքում, սակայն տարբեր հարաբերակցությամբ:

Հայտնի է, որ և՛ գլյուկոզի, և՛ գլիցերոլի խմորման արդյունքում առաջացած մրջնաթթուն՝ թաղանթակապ ՄՁԼ համալիրի միջոցով օքսիդանում է մինչև H_2 և CO_2 : Ինչպես արդեն նշվել է *E. coli*-ի ՄՁԼ-ն ՄՂՀ-ի և Հիդ. ֆերմենտներից կազմված համալիր է, որտեղ մրջնաթթուն գործում է որպես էլեկտրոնի դոնոր, մինչդեռ H^+ -ը վերջնական ակցեպտորն է: Սա նշանակում է, որ համալիրի երկու բաղադրամասերը պետք է պարունակեն օքսիդավերականգնողական կենտրոններ և ՄՂՀ-ից Հիդ-ին էլեկտրոնի տեղափոխման համար անհրաժեշտ են տեղափոխիչներ, որոնք կապված պետք է լինեն Հիդ-ի ենթամիավորներին:

Հիդ-ների և ՄՁԼ համալիրի էներգետիկ կարգավորման համար անհրաժեշտ է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազը, ինչը պրոտոնի տեղափոխման գործընթացի հիմական մեխանիզմն է: Ցույց է տրվել, որ գլյուկոզի կամ գլիցերոլի խմորման ընթացքում *E. coli*-ի կողմից ջրածնի արտադրությունը, արտաքին pH-ի չեզոք և թույլ հիմնային արժեքների դեպքում, զգայուն է ԴՑԿԴ-ի նկատմամբ (Trchounian et al., 2011): Բացի այդ, ցույց է տրվել նաև, որ գլիցերոլի խմորման

դեպքում, pH-ի ցածր արժեքի դեպքում H_2 -ի արտադրությունը ևս զգայուն է ԴՑԿԴ-ի նկատմամբ (Trchounian et al., 2012):

Ինչպես արդեն նշվել էր, խմորման պայմաններում F_0F_1 -ը գործելով որպես պրոտոնային պոմպ և ստեղծելով $\Delta\mu_H^+$ կարող է ուղղակիորեն կապվել երկրորդային տեղափոխիչ համակարգերի հետ, օրինակ, TrkA-ի (Bagramyan and Trchounian, 2003; Trchounian, 2004): Այս պայմաններում *E.coli*-ի F_0F_1 -ից ԱԵՖ-ի էներգիան՝ երկթիոլ-երկսուլֆիդ անցումների միջոցով փոխանցվում է TrkA-ին, իսկ էներգիայի տեղափոխման համար անհրաժեշտ վերականգնող համարժեքները մատակարարվում են F_0F_1 -ի և Յիդ-4-ի միջոցով (pH-ի թույլ հիմնային և չեզոք արժեքների դեպքում): Ելնելով վերոնշյալից՝ առաջարկվել էր, որ F_0F_1 -ն անհրաժեշտ է անաերոբ օքսիդավերականգնողական գործընթացների ֆերմենտների, օրինակ, *E. coli*-ի ՄՋԼ համալիրի և *Salmonella typhimurium*-ի համար (Blokesch et al., 2001):

Մեր լաբորատորիայում արված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում *E. coli*-ի կողմից ջրածնի արտադրության համար առավել պատասխանատու է Յիդ-2-ը, քան Յիդ-1-ը, իսկ H_2 -ի արտադրությունը զգայուն է F_0F_1 -ի արգելակիչների նկատմամբ (Trchounian and Trchounian, 2009):

Հետազոտության այս փուլում, վերը նշվածի առավել մանրամասն պարզաբանման նպատակով, ուսումնասիրվել է *E.coli*-ի վայրի տիպի և տարբեր հիդրոգենազային խախտումներով մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և H^+ -ի հոսքը՝ գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH-ի հիմնային և թթվային արժեքների դեպքում:

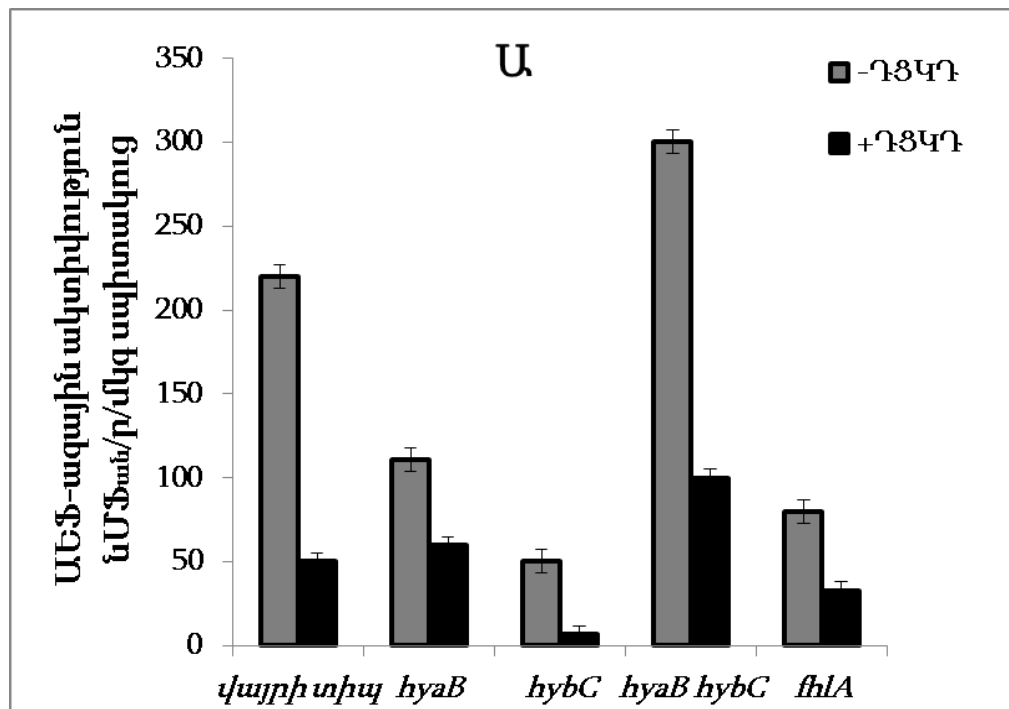
Հարկ է նշել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում աճեցված *E.coli*-ի BW25113 նախնու թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը զգալիորեն ճնշվել է 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ի ազդեցությամբ pH 7.5-ում (նկ.3.1.Ա): Այս ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գրեթե երկու անգամ ցածր է՝ համեմատած գլյուկոզի խմորում իրականացրած բջիջներից ստացված թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվության հետ:

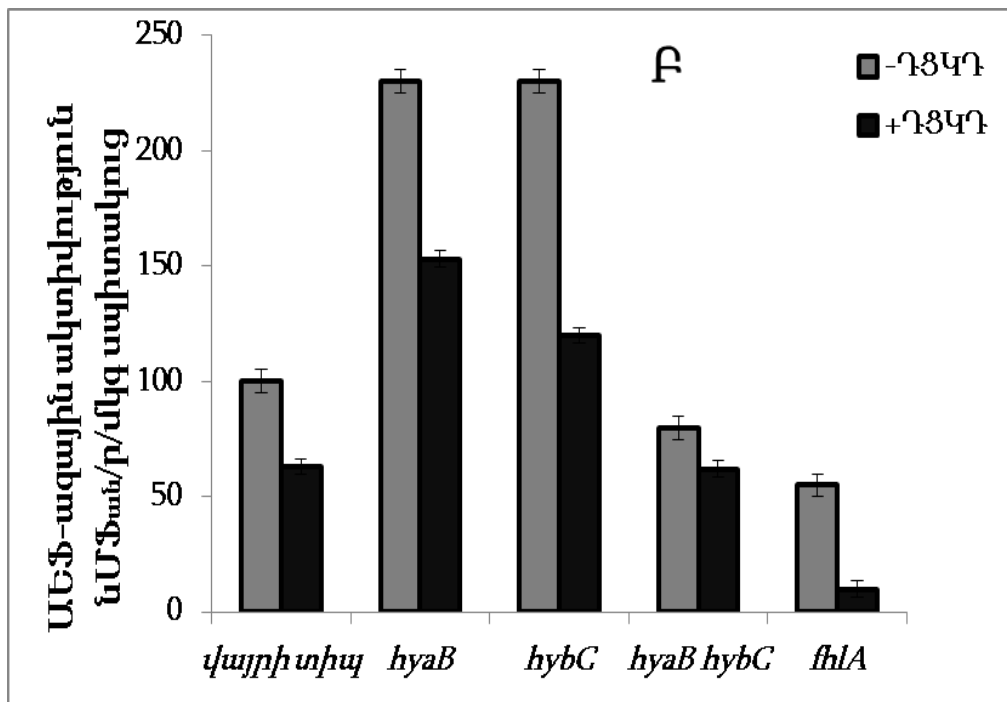
Համակարգերի փոխազդեցության կենսաքիմիական ապացույցներից մեկն այն է, որ մի համակարգի ակտիվության մեծացումը խթանում է մյուսի ակտիվացումը: Մեր լաբորատորիայում նախկինում արված հետազոտությունները ցույց էին տվել, որ փորձարարական միջավայր K^+ իոնների ավելացումը խթանել է H^+ -ԱԵՖ-ազի ակտիվությունը (Trchounian and Vassilian, 1994): Գլիցերոլի խմորման պայմաններում H^+ -ԱԵՖ-ազի և TrkA-ի փոխազդեցության պարզաբանման համար ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն ուսումնասիրվել է նաև 100 մՄ K^+ -ի ներկայությամբ և պետք է նշել, որ ի տարբերություն գլյուկոզի՝ գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում չի դիտվել ակտիվության խթանում: Այս արդյունքը թույլ է տալիս ենթադրել, որ ԱԵՖ-ազային այս ակտիվությունը խմորման այս պայմաններում կախված է TrkA-ից (Bibulyan et al., 2011):

Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է գլիցերոլի խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ում աճեցված *E. coli*-ի տարբեր Յիդ-ային խախտումներով մուտանտների «ուղիղ» թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Ցույց է տրվել, որ համեմատած վայրի տիպի հետ՝ *hyaB* և *hybC* մուտանտների (մուտանտների բնութագրերի համար տե՛ս աղյուսակ 2.1) թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ցածր էր, համապատասխանաբար, մոտավորապես երկու և չորս անգամ (նկ. 3.1.Ա): Հետաքրքրական է, որ *hyaB* *hybC* կրկնակի մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ համեմատած վայրի տիպի, զգալիորեն բարձր էր (տե՛ս նկ. 3.1. Ա), իսկ *fhIA* մուտանտինը (աղյ. 2.1)՝ մոտավորապես երեք անգամ ցածր (տե՛ս նկ. 3.1. Ա): *hyaB* և *hybC* մուտանտների ընդհանուր և ԴՅԿԴ-զգայուն ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը թույլ է տալիս ենթադրել, որ վերոհիշյալ պայմաններում՝ Յիդ-2-ը ավելին, քան Յիդ-1-ը, ունի ամուր փոխազդեցություն F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի հետ, իսկ կրկնակի մուտանտի բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը կարելի է բացատրել ինչպես տարբեր Յիդ-ների, մասնավորապես, Յիդ-1-ի և Յիդ-2-ի միմյանց, այնպես էլ վերջիններիս և ԱԵՖ-ազի փոխազդեցությամբ: Պետք է նշել, որ մեր լաբորատորիայում K^+ -ի տեղափոխման համակարգերում խախտումներ կրող մուտանտների

ուսումնասիրությունները նույնպես ցույց էին տվել նման արդյունքներ (Trchounian, 2009): Նշենք, որ 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ն արգելակել է *hyaB* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը 2 անգամ, *hybC*-ինը՝ մոտավորապես տասն անգամ, *hyaB hybC* կրկնակի մուտանտինը՝ մոտավորապես երեք անգամ, *fhlA*-ինը՝ մոտավորապես 2.5 անգամ (տե՛ս նկ. 3.1. Ա):

Վերը նշված շտամների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն ուսումնասիրվել է նաև գլիցերոլի խմորման և թույլ թթվային pH-ի պայմաններում (pH 5.5):





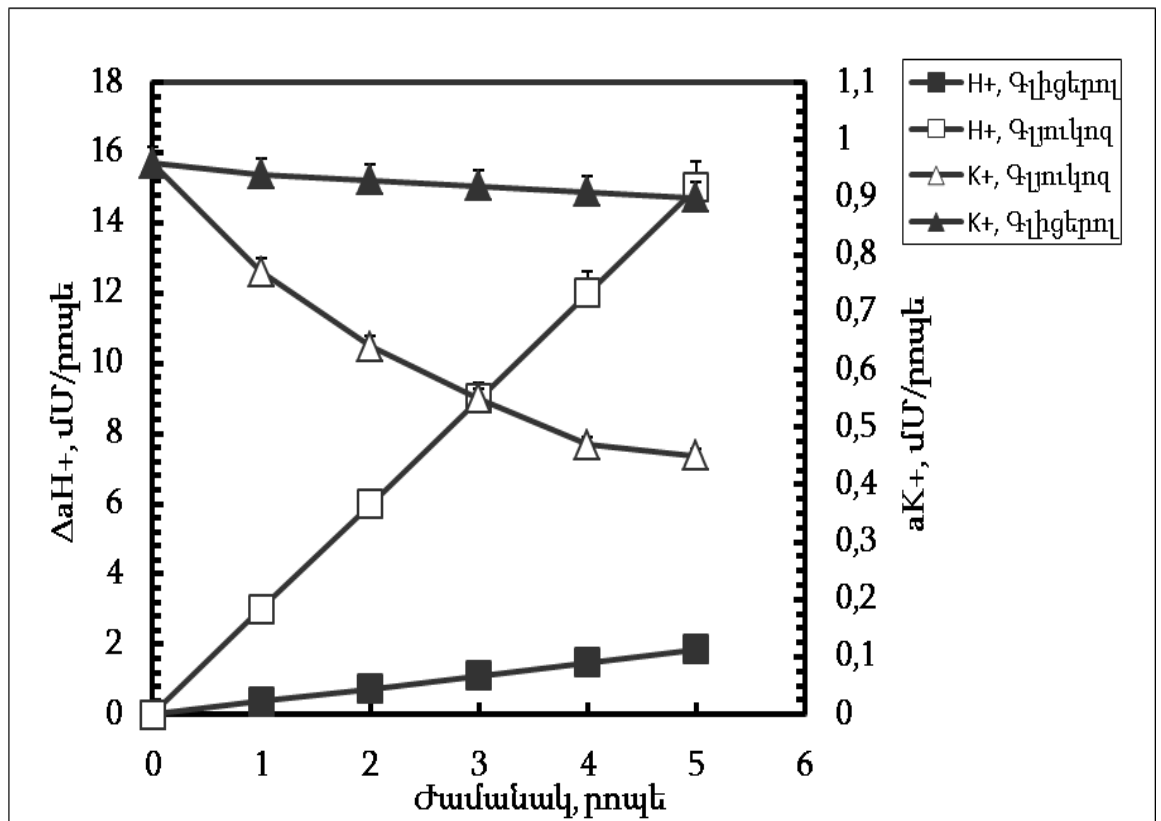
Նկ. 3.1. *E. coli*-ի BW25113 վայրի և *hyaB*, *hybC*, *hyaBhybC*, *fliA* հիդրոգենազային մուտանտների «ուղիղ» թաղանթային բշտիկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Բակտերիաներն աճեցվել են խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում (Ա) և 5.5-ում (Բ): Թաղանթային բշտիկները տեղափոխվել են ռեակցիոն խառնուրդ՝ տրիս-HCl բուֆեր (pH 7.5 և 5.5) և 10 րոպե մշակվել են 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ով: Ներկայացված են երեք անկախ փորձերի արդյունքների միջինացված արժեքները՝ ստանդարտ շեղումներով: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:

Պետք է նշել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում H^+ -ԱԵՖ-ազի և K^+ -ի տեղափոխման TrkA համակարգի փոփառեցության պարզաբանման համար, ինչպես և pH 7.5-ում, այնպես էլ 5.5-ում նույնպես ուսումնասիրվել է BW25113 վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը 100 մՄ K^+ -ի ներկայությամբ. այս ակտիվությունը չի խթանվում K^+ -ի ներկայությամբ և հետաքրքրական է, որ էապես չի ճնշվել ԴՑԿԴ-ի ազդեցությամբ: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ վերոհիշյալ համակարգերը փոխկապակցված չեն գլիցերոլի խմորման պայմաններում: ԴՑԿԴ-ի այսպիսի ազդեցությունը ևս մեկ անգամ ցույց է տալիս, որ արգելակիչ ը pH-ի ցածր արժեքների դեպքում չի ազդում (Trchounian and Kobayashi, 2000):

Թույլ թթվային pH-ի դեպքում դիտվել է *hyaB* և *hybC* մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունների աճ՝ համեմատած վայրի տիպի, իսկ *hyaB hybC* կրկնակի և *fhlA* մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները՝ կրկին համեմատած վայրի տիպի, ցածր էին, համապատասխանաբար 1.5 և 2.5 անգամ (նկ. 3.1. Բ): *fhlA* մուտանտի ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ևս մեկ անգամ փաստում է, որ FhlA-ն ունի ԱԵՖ-ազային ակտիվություն (Leonhartsberger et al., 2002; Bagramyan and Trchounian, 2003): Այս տվյալները վկայում են այն մասին նաև, որ թույլ թթվային pH-ի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և ՄՋԼ համալիրի միջև կազործառական կապ:

Հետազոտությունների այս փուլում նաև ուսումնասիրվել է H^+/K^+ փոխանակությունը: Հայտնի է, որ գլյուկոզի կամ այլ շաքարների խմորման դեպքում, հիմնային pH-ի և անաերոբ պայմաններում, *E.coli*-ն թթվեցնում է աճման միջավայրը, կուտակում է K^+ և ՄՋԼ համալիրով արտադրում է մոլեկուլային ջրածին (Trchounian, 2009): Ցույց է տրվել, որ ՄՋԼ-ն անհրաժեշտ է H^+/K^+ փոխանակության համար. հավանաբար այն մատակարարում է վերականգնող համարժեքներ և հեշտացնում K^+ -ի կլանումը TrkA-ով (Trchounian, 2004): Սակայն գլիցերոլի խմորման պայմաններում համակարգերի վերոնշյալ փոխազդեցությունը հայտնի չէ:

Ուսումնասիրվել է *E. coli*-ի BW25113 վայրի տիպի բջիջների H^+ -ի և K^+ -ի փոխանակությունը գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ի դեպքում: Համեմատած գլյուկոզի՝ գլիցերոլի խմորման դեպքում, և՛ H^+ -ի և՛ K^+ -ի հոսքերը ցածր են (նկ. 3.2.):



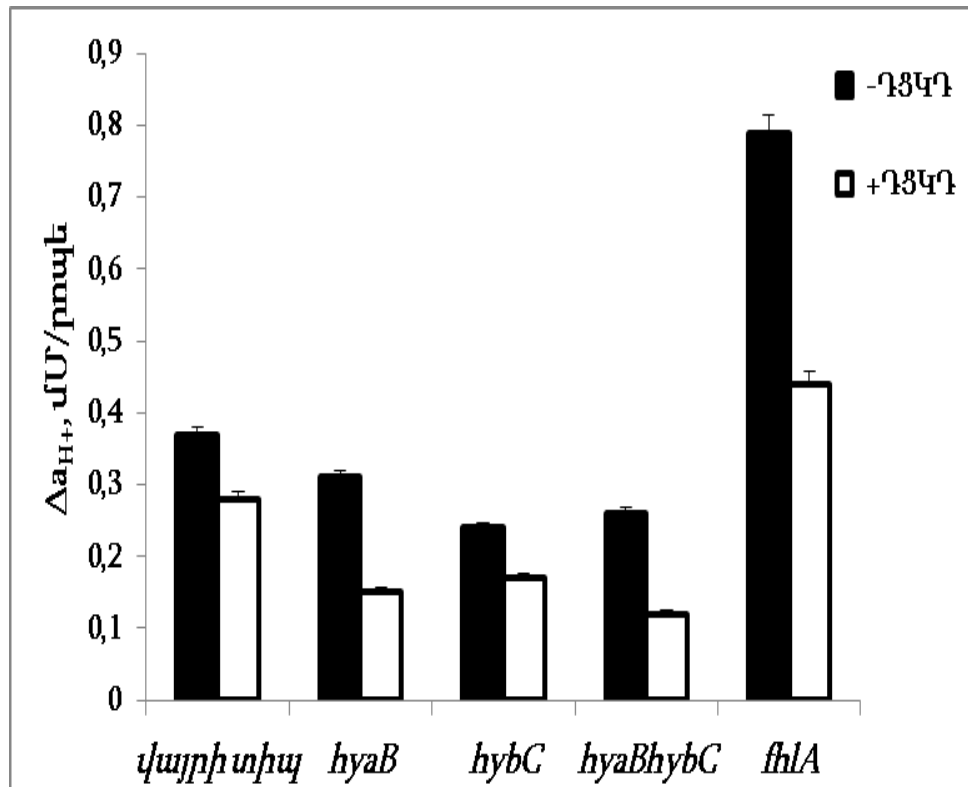
Նկ. 3.2. *E. coli*-ի BW25113 վայրի շտամի H⁺-ի և K⁺-ի փոխանակության կինետիկան գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ի դեպքում: Բակտերիաներն աճեցվել են կամ գլյուկոզի կամ գլիցերոլի խմորման պայմաններում, և վաղվել են թորած ջրով և տեղափոխվել փորձարարական միջավայր 150 մՄ տրիս-ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7.5), որը պարունակել է 0.4 մՄ MgSO₄, 1 մՄ KCl, 1 մՄ NaCl, 10 գ/լ գլիցերոլ կամ 20 մՄ գլյուկոզ: Հաշվարկված է 10¹⁰ բջիջ/մլ-ի համար:

0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ն մոտավորապես 1.3 անգամ արգելակում է H⁺-ի արտառոտքը և այդ կերպ փաստում, որ F₀F₁-ը մասնակցում է թաղանթով պրոտոնի շրջապտույտին (նկ. 3.3.): *hyaB*, *hybC* և *hyaB hybC* կրկնակի մուտանտների H⁺-ի արտառոտքը՝ համեմատած վայրի տիպի, զգալիորեն ցածր է (տե՛ս նկ. 3.3.): Ի տարբերություն նշված մյուս մուտանտների, *fhfA* մուտանտում դիտվել է H⁺-ի արտառոտքի նկատելի աճ (նկ. 3.3.): ԴՑԿԴ-ն մոտավորապես 2 անգամ արգելակում է *hyaB* մուտանտի H⁺-ի արտառոտքը, իսկ մոտավորապես 1.2 անգամ *hybC*-ինը, մոտավորապես 2.2 անգամ՝ *hyaB hybC* կրկնակի մուտանտինը և գրեթե 2

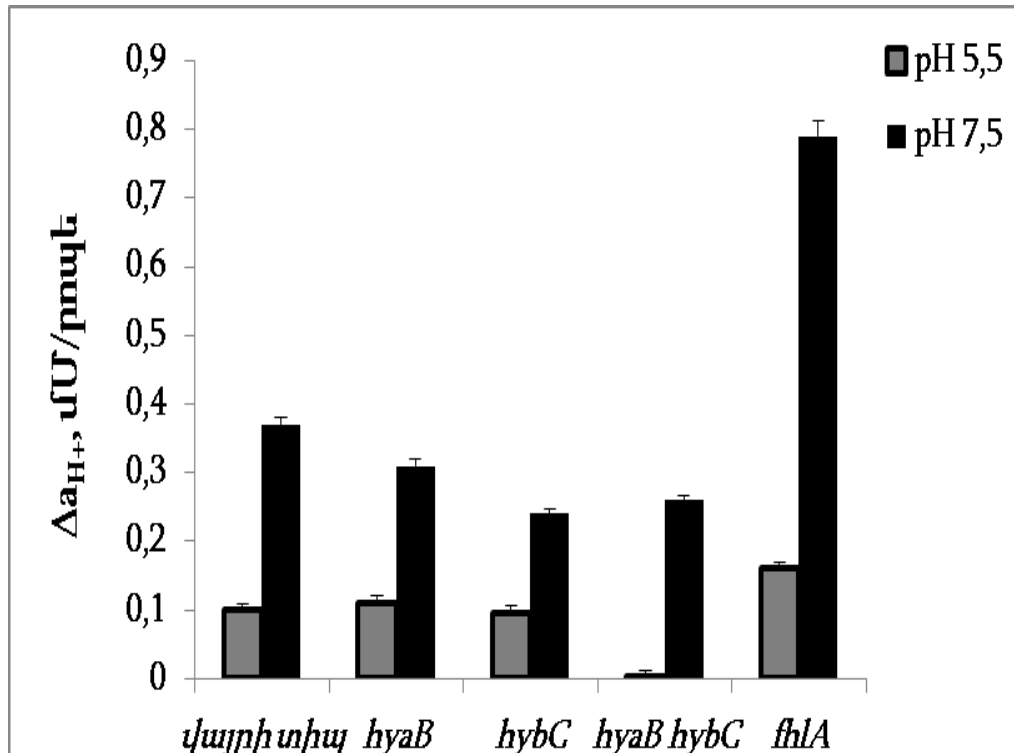
անգամ՝ *fhfA*-ինը (տե՛ս նկ. 3.3.): Ցույց է տրվել նաև, որ K^+ -ի կլանումն այս մուտանտներում ցածր է կամ ընդհանրապես բացակայում է:

BW25113-ի և վերը նշված բոլոր մուտանտների H^+ -ի հոսքը գլիցերոլի խմորման պայմաններում ուսումնասիրվել է նաև pH 5.5-ում: Վերջինիս դեպքում վայրի տիպի H^+ -ի հոսքը, համեմատած pH 7.5-ի, երեք անգամ ցածր է (նկ. 3.4.): *hyaB*, *hybC* մուտանտների H^+ -ի հոսքի արժեքները կրկին նման են, իսկ *hyaB hybC* կրկնակի մուտանտում այն բացակայում է՝ համեմատած վայրի տիպի հետ: Յետաքրքրական է, որ ինչպես թույլ հիմնային pH-ի պայմաններում այնպես էլ pH 5.5-ի դեպքում, *fhfA* մուտանտի H^+ -ի արտահոսքը՝ համեմատած վայրի տիպի հետ, զգալիորեն բարձր է (նկ. 3.4.):

Այս ուսումնասիրությունները վկայում են այն մասին, որ գլիցերոլի խմորման դեպքում, թույլ հիմնային pH-ի դեպքում, Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը ուղղակիորեն փոխազդում են F_0F_1 -ի հետ կամ մասնակցում թաղանթով պրոտոնի տեղափոխմանը: *fhfA* մուտանտի H^+ -ի արտահոսքի բարձր արժեքը կարող է ցույց տալ, որ գլիցերոլի խմորման դեպքում Յիդ-3-ը և Յիդ-4-ը կարող են գործել H^+ -ի կլանման ուղղությամբ. այս արդյունքը համընկնում է այն տվյալների հետ, որ հավանաբար և՛ Յիդ-3-ը և՛ Յիդ-4-ն օժտված են H^+ տեղափոխելու հատկությամբ (Trchounian, 2004; Hakobyan et al., 2005): Ստացված տվյալները համահունչ են նաև այն արդյունքների հետ, համաձայն որոնց՝ գլյուկոզի խմորման դեպքում Յիդ-3-ը կարող է գործել H_2 -ի կլանման, բայց ոչ արտադրման ուղղությամբ, իսկ գլիցերոլի խմորման պայմաններում Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը գործում են հակառակ ուղղությամբ (Trchounian and Trchounian, 2009): Ավելին, ստացված արդյունքները հաստատում են, որ թթվային pH-ի և գլիցերոլի խմորման դեպքում, H^+ -ի արտահոսքին առավել մասնակցում են Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը, քան F_0F_1 -ը (Bibulyan et al., 2011):



Նկ. 3.3. *E. coli*-ի BW25113 վայրի և *hyaB*, *hybC*, *hyaBhybC*, *flhA* հիդրոգենազային մոլտանտների բջջաթաղանթով ջրածնի հոսքը: Բակտերիաներն աճեցվել են գիցերոլի խմորման պայմաններում (pH 7.5) և տեղափոխվել փորձարարական միջավայր (pH 7.5): 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ի ներկայությամբ բջիջները մշակվել են 10 րոպե: Հաշվարկված է 10^{10} բջիջ/մլ-ի համար:



Նկ. 3.4. *E. coli*-ի BW25113 վայրի 2 տամի և *hyaB*, *hybC*, *hyaBhybC*, *fhlA* հիդրոգենազային մոլտանտների բջջաթաղանթով ջրածնի հոսքը: Բակտերիաներն աճեցվել են գիցերոլի խմորման պայմաններում (pH 7.5 և pH 5.5) և տեղափոխվել փորձարարական միջավայր (pH 7.5 և 5.5): Հաշվարկված է 10¹⁰ բջիջ/մլ -ի համար:

3.2. *E. coli* –ի թաղանթակապի հիդրոգենազների ազդեցությունը F₀F₁-ԱՇՖ-ազի վրագլիցերոլի և ածխածնի խառնադրյունների խմորման դեպքում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում

Ներկայումս մեծ է գիտական հետաքրքրությունը բակտերիաների ֆիզիոլոգիայի, օրինակ, մոլեկուլային ջրածնի արտադրության նյութափոխանակային ուղիների նկատմամբ՝ ածխածնի (գլյուկոզ, քսիլոզ, ֆրուկտոզ, գլիցերոլ) առանձին և խառն (գլյուկոզ և գլիցերոլ) ադրյունների խմորման պայմաններում (Liu et al., 2011; Trchounian and Trchounian, 2013): Ցույց է

տրվել, որ գլյուկոզի խմորման ընթացքում, *E. coli*-ում ջրածնի արտադրությունը կարող է ընկճվել՝ կախված գլյուկոզի կոնցենտրացիայից, բայց գլյուկոզի և գլիցերոլի խառը խմորման դեպքում H_2 -ի արտադրությունը խթանվում է (Trchounian et al., 2014):

3.2.1 *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում

Անաերոբ պայմաններում *E. coli*-ն գլիցերոլը փոխակերպում է դիհիդրօքսիացետոն ֆոսֆատի, ինչն էլ փոխակերպվում է պիրոխաղողաթթվի: Վերջինս էլ փոխակերպվում է մրջնաթթվի և ացետիլ-CoA-ի, իսկ ՄՋԼ համալիրը առաջացած մրջնաթթուն փոխարկում է H_2 -ի և ածխաթթու գազի (Sanchez-Torres et al., 2013):

Ինչպես արդեն նշվել է՝ ՄՋԼ համալիրը, որի կազմում ՄՂՀ-Հ-ի հետ գործում է Յիդ-3-ը, համարվում է ՄՋԼ-1, իսկ Յիդ-4 պարունակողը՝ ՄՋԼ-2 (Andrews et al., 1997; Trchounian et al., 2012): ՄՋԼ համալիրի երկու ձևերն ակտիվ են գլյուկոզի խմորման դեպքում, սակայն գլիցերոլի խմորման պայմաններում նրանք կարող են գործել տարբեր կերպ (Trchounian et al., 2012): Յայ տնի է, որ բացի նշված Յիդ-ներից, *E. coli*-ն սինթեզում է նաև երկու այլ Յիդ-ներ՝ Յիդ-1 Յիդ-2, որոնք նույնպես գործում են խմորման անաերոբ պայմաններում (Forzi and Sawers, 2007): Գլյուկոզի խմորման դեպքում այս Յիդ-ները օքսիդացնում են H_2 -ը և աշխատում են հակառակ ուղղությամբ գլիցերոլի խմորման դեպքում (Trchounian and Trchounian, 2009): ՄՂՀ-Հ-ի և Յիդ ֆերմենտների կենսասինթեզը կախված է երկու կարևոր գործոններից: ՄՂՀ-Հ-ի մՌՆԹ-ն կրում է ծայրային կոդոն, որն ապակոդավորվում է *sefC* գենի գենարգասիքով (Chen et al., 1993): Վերջինս անհրաժեշտ է սելենացիստեինը ՄՂՀ-Հ-ում ներդնելու համար: Ավելի ին, Յիդ-ների կենսասինթեզի և հասունացման համար անհրաժեշտ են տարբեր սպիտակուցներ, մասնավորապես, HypF-ը, որը գաղտնագրվում է *hypF* գենով (Paschos et al., 2002; Tominaga et al., 2012): HypF-ը կարևոր սպիտակուց է, որը մասնակցում է Յիդ-ների մեծ ենթամիավորների տարբեր բաղադրամասերի հավաքմանը և բացի այդ HypF-ը կապված է ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի հետ (Shomura and Higuchi, 2012):

Ցույց է տրվել, որ U_{2L} -ի և F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվություններն ազդում են *E.coli*-ի կողմից գլիցերոլի նյութափոխանակության խմորման բնույթի վրա (Gonzalez et al., 2008; Trchounian et al., 2012): Հայտնի է նաև F_0F_1 -ի անհրաժեշտությունը և նրա փոխապլածությունը տարբեր Յիդ-ների հետ՝ գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման դեպքում (Trchounian et al., 2011): Ցույց է տրվել նաև, որ pH 7.5-ի դեպքում Յիդ-3-ի և Յիդ-4-ի ակտիվությունները կապված են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի հետ և այդ փոխարարությունը բացատրվում է Յիդ-4-ի և F_0F_1 -ի փոխազդեցությամբ՝ ինչի արդյունքում երկրորդային տեղափոխիչ համակարգերին էներգիայի փոխանցման համար մատակարարվում են վերականգնող համարժեքներ ($H^+ e^-$) (Trchounian, 2004):

Հետազոտության այս փուլում ուսումնասիրվել է *E.coli*-ի տարբեր Յիդ-ների ազդեցությունը F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության վրա գլիցերոլի և գլյուկոզի ու գլիցերոլի խառը խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում:

E. coli-ի վայրի տիպը և տարբեր Յիդ-ային մուտանտներն (աղյ. 2.1) աճեցվել են պեպտոնային միջավայրում գլիցերոլի և գլիցերոլի ու գլյուկոզի խառնուրդի խմորման պայմաններում pH-ի 7.5, 6.5 և 5.5 արժեքների դեպքում (նկ. 3.5 Ա և 3.5 Բ): Հարկ է նշել, որ գլիցերոլի ու գլյուկոզի խառնուրդի խմորում իրականացրած բջջների աճն՝ համեմատած միայն գլիցերոլի խմորման, ավելի ինտենսիվ էր: Սակարելի է բացատրել նրանով, որ բակտերիական թաղանթն օժտված է գլիցերոլի և գլյուկոզի տեղափոխման տարբեր մեխանիզմներով և տարբեր են նաև դրանց նյութափոխանակային ուղիները (Poladyan et al., 2013a; Trchounian and Trchounian, 2014): *E.coli*-ի աճման տեսակարար արագությունը գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH 6.5-ի դեպքում 1.4 անգամ ավելի բարձր էր, իսկ pH-ի այս արժեքն՝ ամենանպաստավորը աճի համար (նկ. 3.5 Ա): Հետաքրքրական է այն, որ բոլոր Յիդ-ներից գուրկ *hypF* մուտանտի աճման տեսակարար արագությունը ցածր է pH-ի 7.5 և 5.5 արժեքների դեպքում, բայց ոչ 6.5-ի դեպքում (տե՛ս նկ. 3.5 Ա):

Պետք է նշել, որ *E. coli*-ի վայրի տիպի և մուտանտների աճման տեսակարար արագությունը գլիցերոլի և գլյուկոզի խառնուրդի

խմորման դեպքում՝ համեմատած pH 7.5-ի և 6.5-ի, 5.5-ի դեպքում զգալիորեն ցածր է (նկ. 3.5 Բ): se/C մուտանտի, որում բացակայում են ՄԴՅ-ները, աճման տեսակարար արագությունը ցածր է նաև pH 6.5-ի դեպքում (տե՛ս նկ.3.5 Բ): Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ Յիդ-ներն ունեն կարևոր դեր բակտերիաների աճի գործում ինչպես միայն գլիցերոլի, այնպես էլ գլիցերոլ և գլյուկոզ խառնուրդի խմորման դեպքում՝ կախված pH-ի արժեքից: Յիդ-ները կարող են ազդել խմորման վերջնանյութերի արտադրության վրա, նաև F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի վրա և այդ կերպ պահպանելով պրոտոնաշարժ ուժը (Trchounian et al., 2012; Trchounian, 2015):

Տարբեր Յիդ-ների և F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի փոխհարաբերությունը գլիցերոլի խմորման դեպքում պարզելու համար ուսումնասիրվել է *E. coli*-ի վայրի տիպի և տարբեր Յիդ-ային մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (աղյ. 2.1): BW25113 վայրի տիպի «ուղիղ» թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը մոտավորապես 220 ± 8 նմոլ Φ_{min} (ր/մկգ սպիտակուց): Հետաքրքրական է, որ այս ակտիվությունը կազմել է «շրջված» թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվության մոտավորապես 74%-ը (աղյ. 3.1)

Աղյ ուսակ 3.1

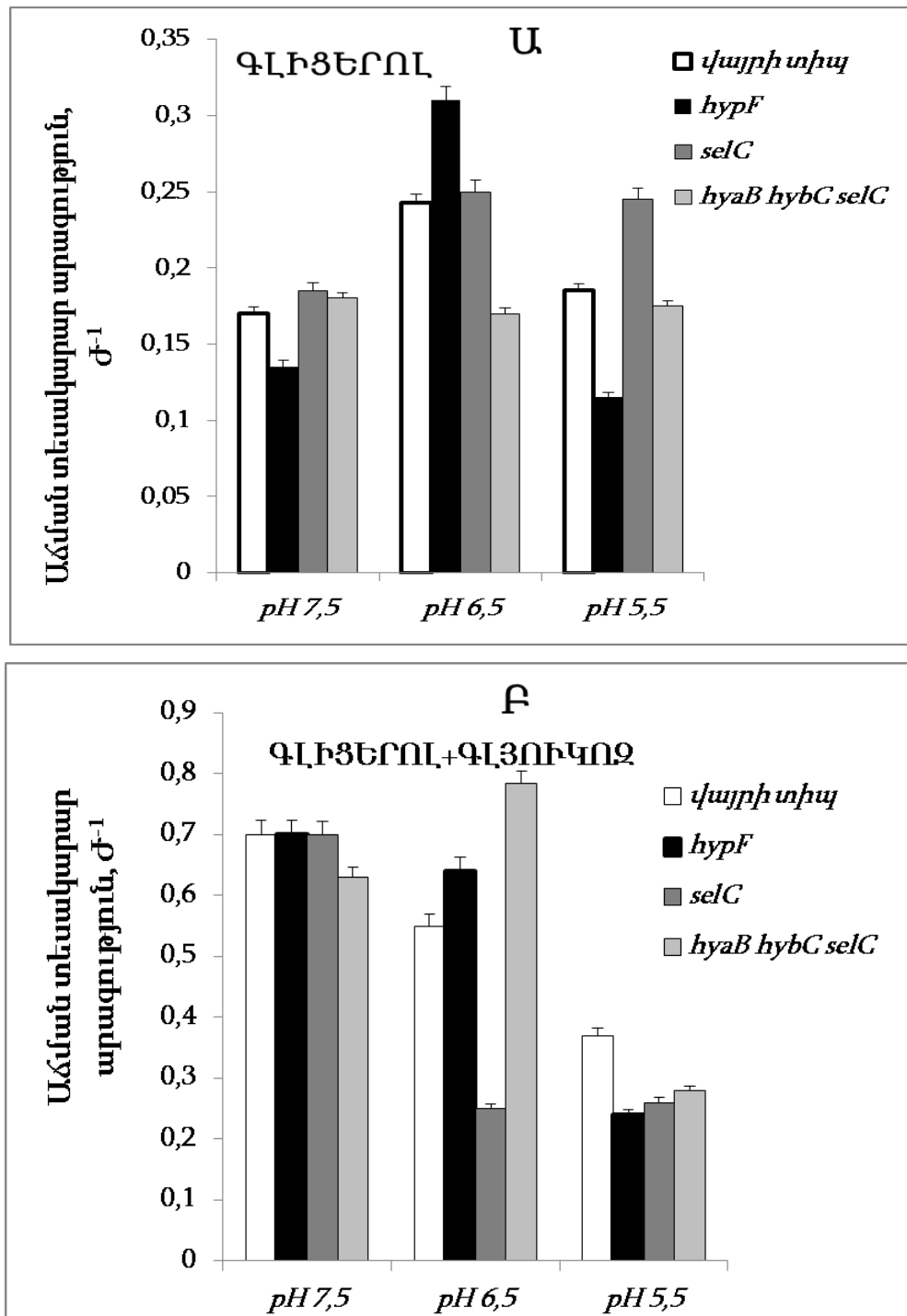
E. coli-ի BW25113-ի «ուղիղ» և «շրջված» թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը

Թաղանթային բշտիկներ	ԱԵՖ-ազային ակտիվություն նմոլ Φ_{min} (ր/մկգ սպիտակուց)	
	- ԴՅԿԴ	ԴՅԿԴ-զգայուն*
«Ուղիղ»	223 ± 8	203 ± 7
«Շրջված»	300 ± 12	256 ± 10

*ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը առանց ԴՅԿԴ-ի և ԴՅԿԴ-ի (0.5 մՄ) ներկայությամբ ակտիվությունների տարբերությունն է:

ԴՅԿԴ-ն զգալիորեն ճնշում է և՛ «ուղիղ» և՛ «շրջված» թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Հարկ է նշել, որ նախկինում մեր լաբորատորիայում արված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ գլյուկոզի խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ում (7.5) աճեցված *E.coli*-ի վայրի

տիպի «ուղիղ» թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը կազմել է «շրջված» թաղանթային բշտիկներում դիտված ակտիվության մոտավորապես 70 %-ը (Bagramyan and Trchounian, 2003):



Նկ.3.5. *E.coli*-ի BW25113 վայրի շտամի և *selC*, *hyaB hybC selC*, *hypF* հիդրոգենազային մուտանտների աճը pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում: Բակտերիաներն աճեցվել են գլիցերոլի (**Ա**), և գլիցերոլի ու գլյուկոզի (**Բ**) խառնուրդի խմորման պայմաններում և որոշվել է

աճման տեսակարար արագությունը: Մանրամասների համար տես
«Գլ ու խ2»-ը:

BW25113 վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը pH 7.5-ում՝ համեմատած 6.5-ի, մոտավորապես 3 անգամ մեծ է (նկ.3.6 Ա և Բ): 0.5 մՄ ԴՅԿԴ-ն pH 7.5-ում զգալիորեն արգելակում է վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (մոտավորապես տասն անգամ), իսկ pH 6.5-ում՝ մոտավորապես 1.3 անգամ (նկ.3.6 Ա և Բ և աղյ.3.2): Ստացված տվյալները հաստատում են այն փաստը, որ թույլ հիմնային pH-ը, գլիցերոլի խմորման պայմաններում, առավել բարենպաստ է F_0F_1 -ի գործելու համար:

E. coli-ի բոլոր չորս Յիդ-ներից զուրկ *hypF* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը pH 7.5-ում, համեմատած վայրի տիպի, մոտ 2 անգամ փոքր է (նկ. 3.6 Ա): Սա վկայում է այն մասին, որ վերոհիշյալ պայմաններում F_0F_1 -ը և Յիդ-ները փոխազդում են ուղղակիորեն: Այլ է պատկերը pH 6.5-ում. վայրի տիպը և *hypF*-ը ցուցաբերել են նման ԱԵՖ-ազային ակտիվություններ (նկ.3.6 Բ): pH 7.5-ում *hypF* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ճնշվում է ԴՅԿԴ-ի ազդեցությամբ, իսկ 6.5-ում արգելակիչը գրեթե չի ազդում (տե՛ս նկ. 3.6 Ա և Բ, աղյ. 3.2): Յարկ է նշել, որ pH 5.5-ում՝ համեմատած 7.5-ի, և՛ վայրի տիպի և՛ *hypF*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները ցածր էին (նկ. 3.6 Գ): Այսպիսով, այս արդյունքները ցույց են տալիս *E.coli*-ի վայրի տիպի ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության փոխկախվածությունը աճման միջավայրի pH-ից. գլիցերոլի խմորման պայմաններում ամենացածր ակտիվությունը դիտվել է pH 5.5-ում:

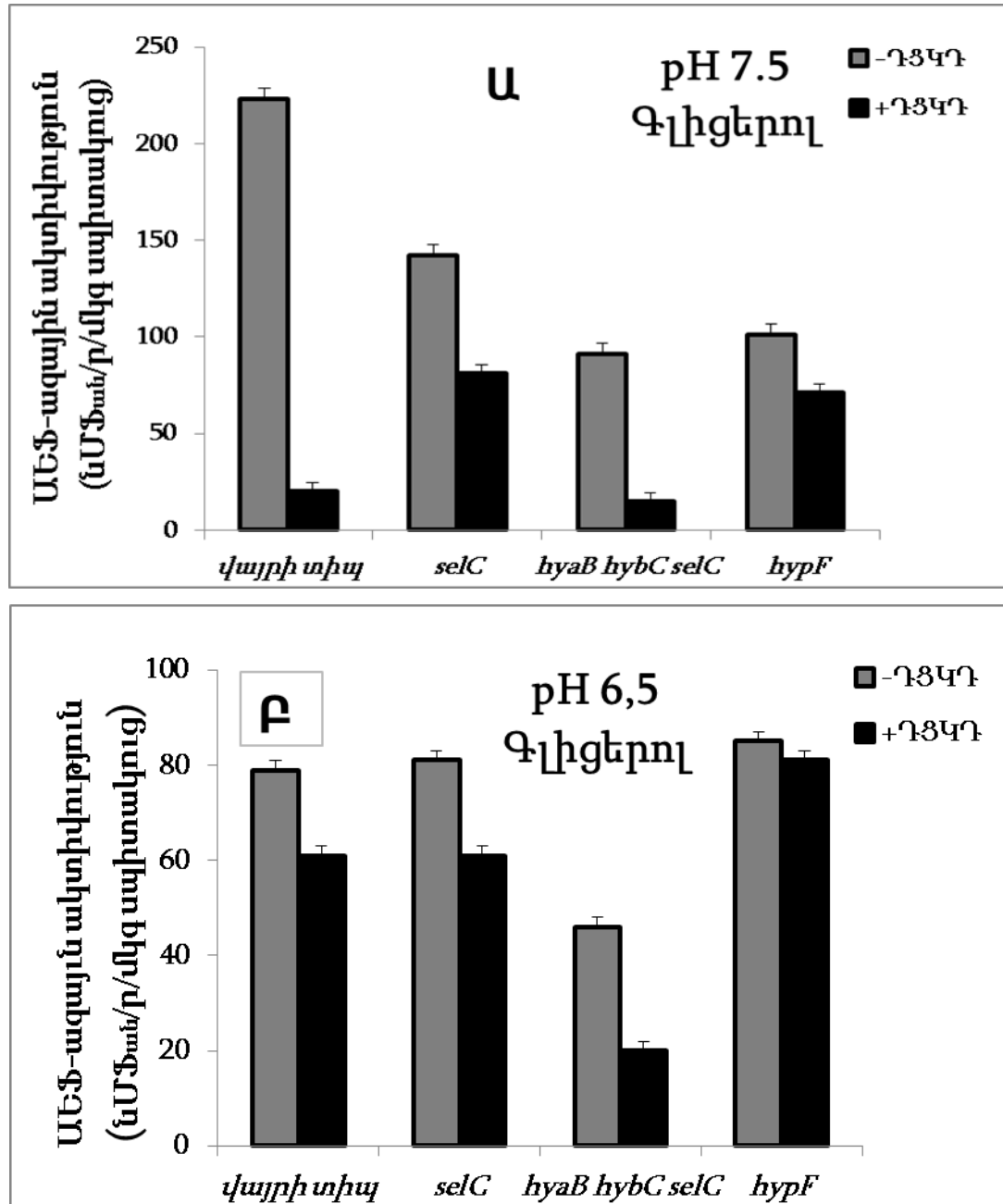
E. coli-ի *selC* մուտանտի, որն ընդունակ չէ սինթեզել ՄՋԼ-ի սելենոսպիտակուլները (աղյ.2.1), ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլիցերոլի խմորման դեպքում, pH 7.5-ում կազմել է վայրի տիպի նույն ակտիվության մոտավորապես 60-65 %-ը (նկ.3.6 Ա): *selC* մուտացիայի այս ազդեցությունը ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա փաստում է այն, որ pH 7.5-ում Մդհ-Յ-ը կամ ՄՋԼ-ն կարող են ազդել F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի վրա ուղղակիորեն կամ անուղղակի՝ Յիդ-3 և Յիդ-1 որոշակի փոխարաբերության շնորհիվ: Այս տեսակետը հաստատվել էր նաև մեր կողմից արված նախկին հետազոտություններում (Trchounian et al., 2013): Մդհ-Յ-ն անհրաժեշտ է

Յիդ-3-ի կայունացման համար, բայց էական դեր չունի վերջինիս ակտիվության համար (Pinske et al., 2012): *E. coli*-ի KT2110 *hyaB hybC selC* եռակի մուտանտի թաղանթային բշտիկների ընդհանուր և ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում՝ համեմատած վայրի տիպի հետ, զգալիորեն ընկճված է (նկ.3.6 Ա և Ա աղյ.3.2): Ի հակադրություն միայն *selC* մուտացիայի, եռակի *hyab hybC selC* մուտացիան գրեթե 2 անգամ նվազեցնում է ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Այս արդյունքները ցույց են տալիս, որ Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը ավելին, քան Յիդ-3-ը, անհրաժեշտ են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար: Ստացված տվյալները նաև հանահունչ էին F_0F_1 -ԱԵՖ-ազից զուրկ *E. coli atp* մուտանտում Յիդ-1-ի կամ Յիդ-2-ի ակտիվության բացակայության հետ (Trchounian, Pinske et al., 2011):

Գլիցերոլի խմորման պայմաններում աճեցված վայրի տիպը, *selC*-ն ու *hypF*-ն pH 6.5-ում ցուցաբերել են նման ԱԵՖ-ազային ակտիվություն, իսկ *hyab hybC selC* մուտանտի նույն ակտիվությունը՝ համեմատած վայրի տիպին, գրեթե 2 անգամ ցածր էր: ԴՅԿԴ-ն մոտավորապես 2.3 անգամ արգելակել է այս մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (նկ.3.6Բ Ա աղյ.3.2): Նշենք, որ ԴՅԿԴ-ն նման կերպ է արգելակում վայրի տիպի և *selC* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (նկ.3.6 Բ Ա աղյ.3.2): Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ թույլ թթվային pH-ում, գլիցերոլի խմորման պայմաններում Յիդ-3-ը և F_0F_1 -ԱԵՖ-ազը չեն փոխազդում ուղղակիորեն:

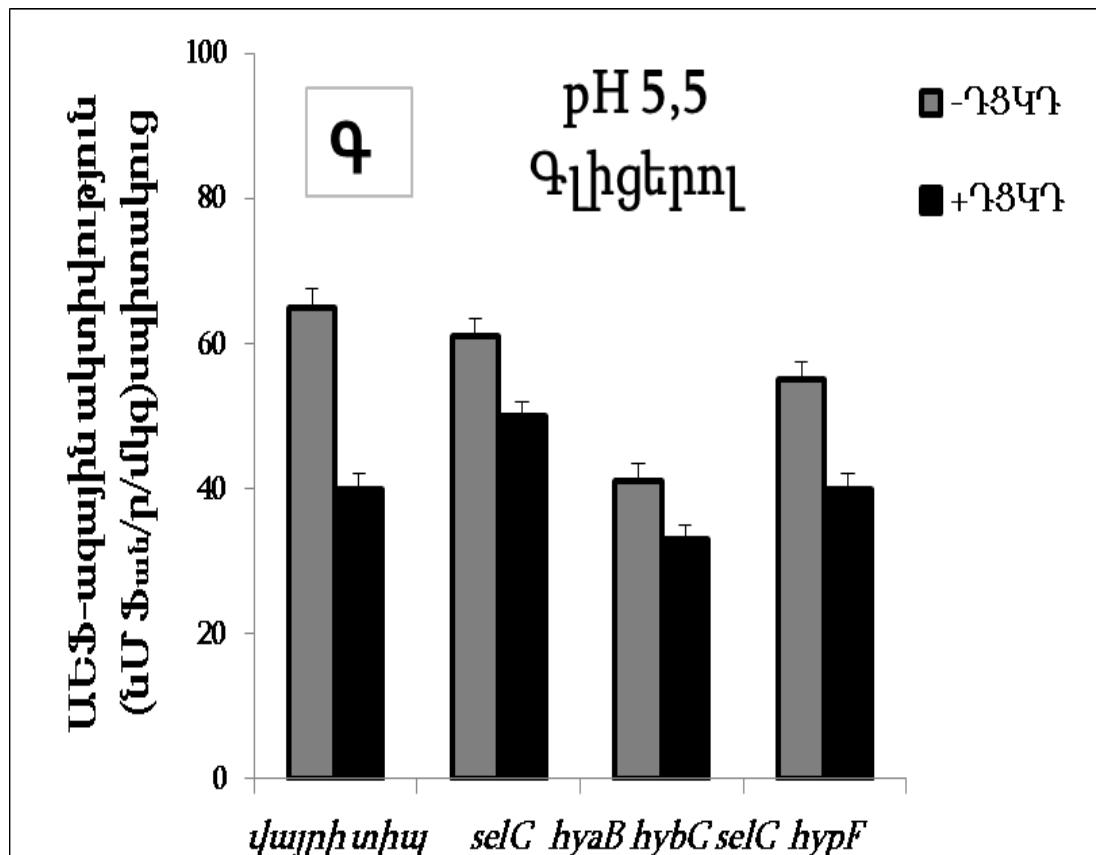
Գլիցերոլի խմորման պայմաններում աճեցված *E. coli*-ի BW25113 վայրի տիպի և վերոհիշյալ մուտանտների թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն ուսումնասիրվել է նաև pH 5.5-ում: Պետք է նշել, որ բոլոր մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը pH 5.5-ում՝ համեմատած pH 7.5-ի և 6.5-ի, ցածր էր (նկ.3.6 Գ): Այս pH-ում *hyab hybC selC* եռակի մուտանտը ցուցաբերել է գրեթե նույն ակտիվությունը ինչ pH 6.5-ում (տե՛ս նկ. 3.6 Բ Ա Գ): ԴՅԿԴ-ն՝ համեմատած թույլ հիմնային և թույլ թթվային pH-ների, թթվային pH-ում նվազ չափով է արգելակում ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Արգելակիչը զգալիորեն ազդում է եռակի մուտանտի ԱԵՖ-ազային

ակտիվություն (տե՛ս նկ. 3.5, 3.6 և աղյ. 3.2): Այս արդյունքները ցույց են տալիս, որ գլխեցերուլի խմորման պայմաններում թթվային pH-ը օպտիմալ չէ ԱԵՖ-ազային ակտիվության համար: Եռակի մոլտանտի ընդհանուր և ԴՑԿԴ-զգայուն ցածր ակտիվությունները վկայում են այն մասին, որ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար անհրաժեշտ են Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը:



Նկ. 3.6. *E. coli*-ի BW25113 վայրի շտամի և *selC*, *hyaB hybC selC*, *hypF* հիդրոգենազային մոլտանտների «ուղիղ» թաղանթային բշտիկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Բակտերիաներն աճեցվել են խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում (**Ա**), 6.5-ում (**Բ**) և 5.5-

ու մ (9): Թաղանթային բշտիկները տեղափոխվել են ռեակցիոն խառնուրդ՝ տրիս-HCl բուֆեր (pH 7.5, 6.5, 5.5) և 10 րոպե մշակվել են 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ով: Ներկայացված են երեք անկախ փորձերի արդյունքների միջինացված արժեքները՝ ստանդարտ շեղումներով: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:



Նկ. 3.6. *E. coli*-ի BW25113 վայրի շտամի և *selC*, *hyaB hybC selC*, *hypF* հիդրոգենազային մուտանտների «ուղիղ» թաղանթային բշտիկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Բակտերիաներն աճեցվել են խմորման պայմաններում, pH 5.5-ում (9): Ներկայացված են երեք անկախ փորձերի արդյունքների միջինացված արժեքները՝ ստանդարտ շեղումներով: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:

Ընդհանրացնելով վերը ստացված տվյալները՝ կարելի է ասել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության և միջավայրի pH-ի միջև կա ուղիղ հարաբերակցություն. ամենաբարձր ակտիվությունն դիտվել է pH 7.5-ում: Հիդ-1-ը Հիդ-2-ն անհրաժեշտ են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար:

3.2.2. *E. coli*-ի F₀F₁-ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում

Ցույց է տրվել, որ տարբեր բակտերիաներ ընդունակ են իրականացնել ածխածնի տարբեր աղբյուրների խառը խմորում (Trchounian and Trchounian, 2013; Thapa et al., 2014): Տարբեր գիտական խմբեր են հետազոտում ածխածնի տարբեր աղբյուրների դերը *E. coli*-ի և այլ բակտերիաների տարբեր գեների մակածման կամ խմորման արգասիքների առաջացման մեջ (Ngadi, 2012; Trchounian et al., 2014): Ցույց է տրվել, որ գլյուկոզն արգելակում է *E. coli*-ի *hyf* գենի մակածումը (Self et al., 2004) կամ ընկճում է գլիցերոլի որոշ տեղափոխիչներ *Klebsiella pneumoniae*-ում (Sprenger et al., 1989):

Մեր լաբորատորիայում արված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ածխածնի խառն աղբյուրների (գլյուկոզ և գլիցերոլ) խմորման ընթացքում *E. coli*-ին արտադրում է H₂, բայց տարբեր Յիդ-ների ակտիվությունը և ջրածնի արտադրությունը կախված են pH-ից և ածխածնի աղբյուրից (Trchounian & Trchounian, 2013): Այս տեսանկյունից հետաքրքիր է նաև վերը նշված պայմաններում F₀F₁-ԱԵՖ-ազի և տարբեր Յիդ-ների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը:

Ուսումնասիրվել է *E. coli*-ի վայրի տիպի և Յիդ-ային մուտանտների դեպքում: Հարկ է նշել, որ բոլոր շտամները խմորման պայմաններում և pH-ի 7.5, 6.5 և 5.5 արժեքների դեպքում՝ համեմատաբար միայն գլիցերոլի, ցուցաբերել են ավելի բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվություն: Վայրի տիպի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը pH 7.5-ում մոտավորապես 255±2 (նմուշ \$_{\text{ա}}\$/րոպե մկգ սպիտակուց) էր: 0.5 մՄ ԴՑԿԴ-ն գրեթե 2 անգամ արգելակել է վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (նկ. 3.7 Ա և աղյ. 3.2):

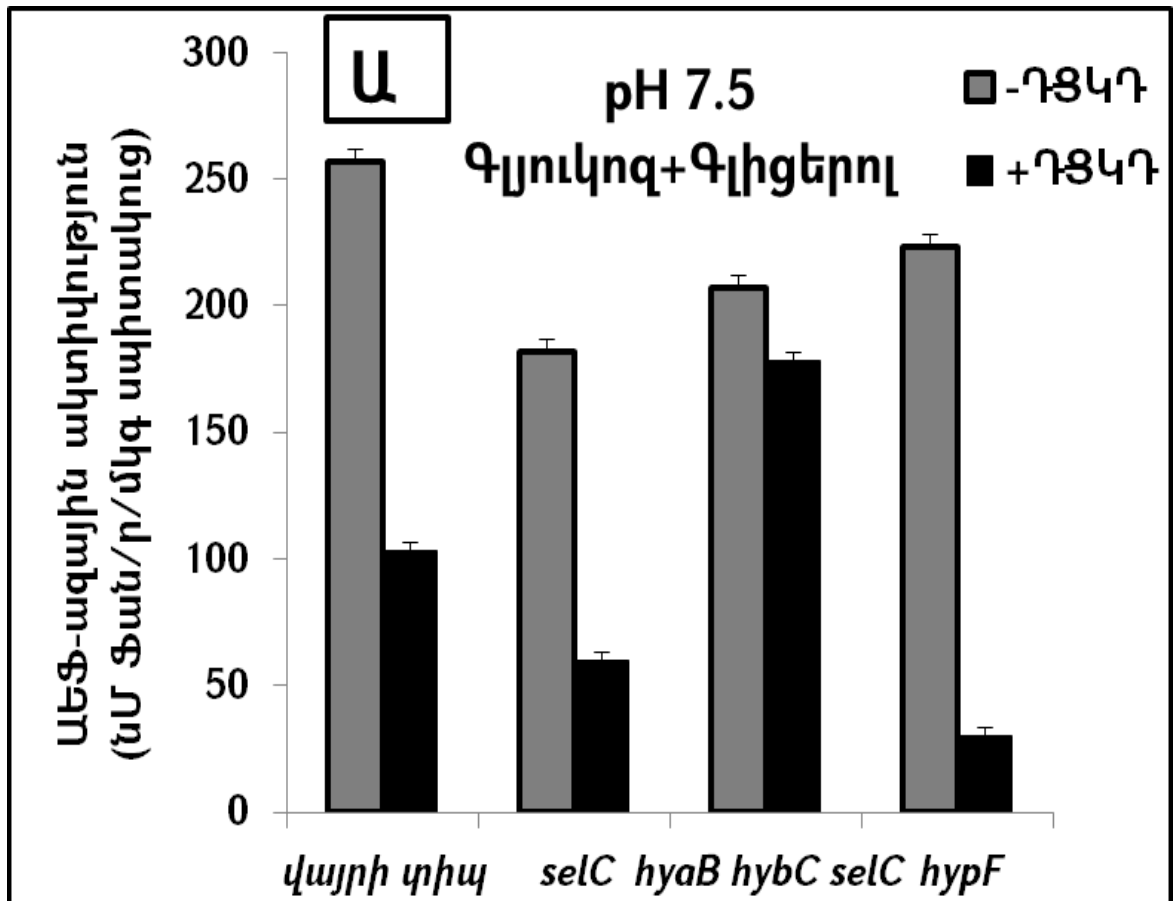
Աղյուսակ 3.2

E. coli-ի թաղանթային բշտիկների ԴՑԿԴ-ընկճված ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլիցերոլի, գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում

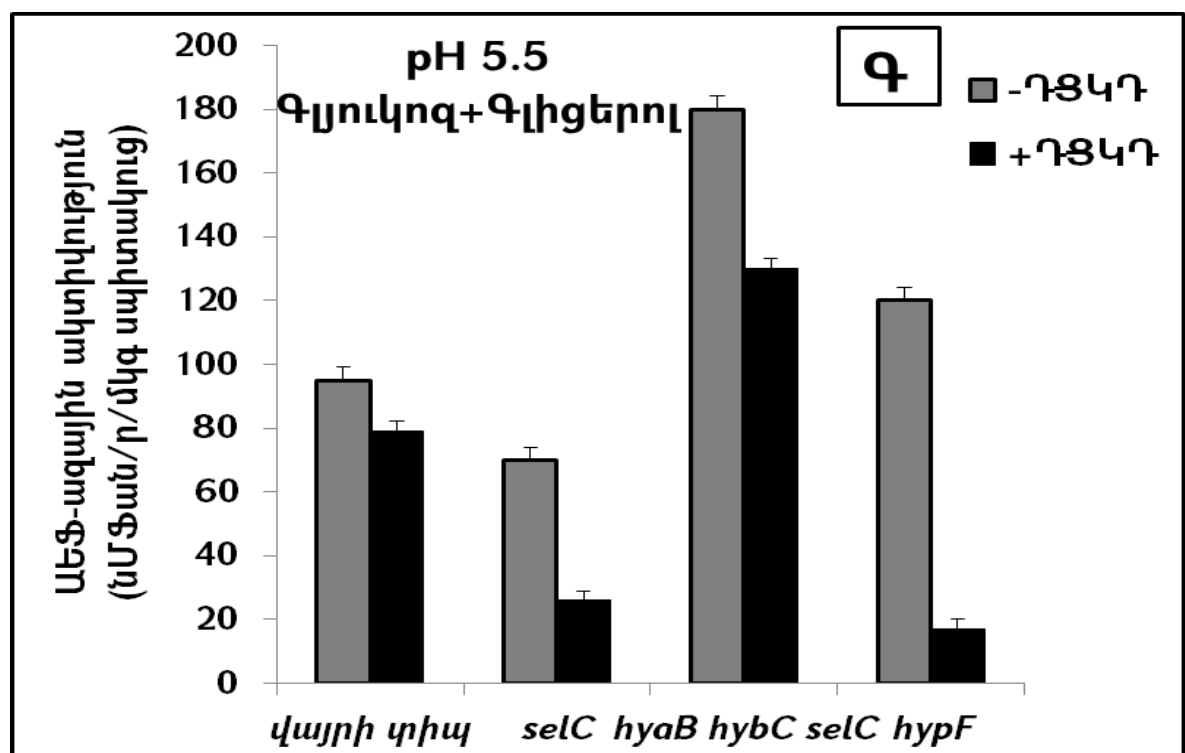
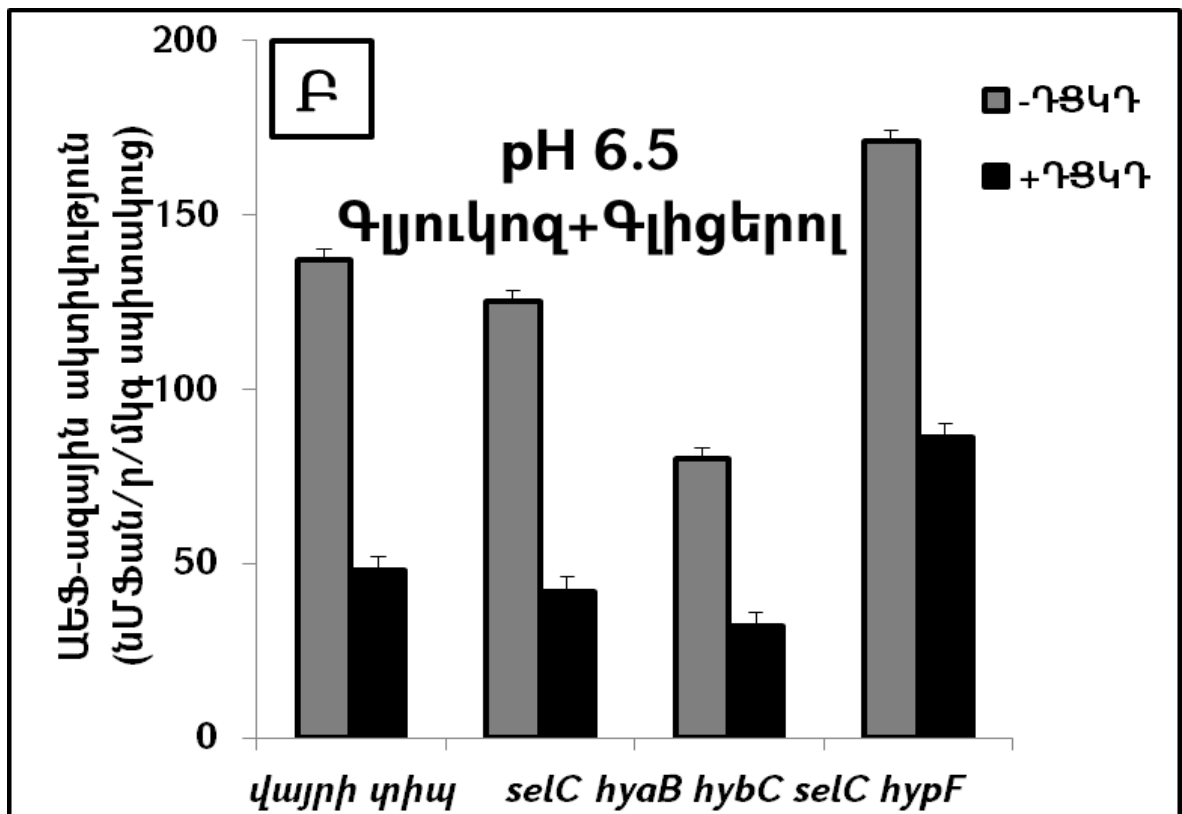
Տեսակ	ԴՑԿԴ-ընկճված ԱԵՖ-ազային ակտիվություն, %*					
	pH 7.5		pH 6.5		pH 5.5	
	Գլիցերոլ	Գլյուկոզ + Գլիցերոլ	Գլիցերոլ	Գլյուկոզ + Գլիցերոլ	Գլիցերոլ	Գլյուկոզ + Գլիցերոլ
<i>Վայրի տիպ</i>	91 ± 1	60 ± 1	25 ± 2	65 ± 1	33 ± 1	77 ± 1
<i>hypF</i>	30 ± 2	87 ± 1	5 ± 2	50 ± 1	16 ± 2	86 ± 1
<i>hyaB hybC selC</i>	83 ± 1	14 ± 2	56 ± 1	60 ± 1	19 ± 2	28 ± 2
<i>selC</i>	43 ± 2	67 ± 1	25 ± 1	66 ± 1	21 ± 2	63 ± 1

* Բակտերիաների համար տես «Գլյուխ 2»-ը: Յուրաքանչյուր շտամի ԴՑԿԴ-ընկճված ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը արտահայտված է %-ով, երբ ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ԴՑԿԴ-ի բացակայությամբ ընդունվել է 100 %՝ համապատասխան pH-ի և գլյուկոզի, և գլյուկոզի ու գլիցերոլի խառնուրդի խմորման պայմաններում:

Չետաքրքրական է, որ *hypF* մուտանտի (աղյ. 2.1) ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ համեմատած միայն գլիցերոլի խմորման հետ, մոտավորապես երկու անգամ խթանվել է և իր արժեքով մոտերվայրի տիպի ցուցաբերած ակտիվությանը (տե՛ս նկ. 3.7 Ա): ԴՑԿԴ-ն զգալիորեն ընկճել է այս մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (գրեթե 7 անգամ) (տե՛ս նկ. 3.7 Ա և աղյ. 3.2), հետևաբար մեծ է եղել F_0F_1 -ԱԵՖ-ազով պայմանավորված ակտիվությունը:



Նկ.3.7. *E. coli*-ի BW25113 վայրի շտամի և *selC*, *hyaB hybC selC*, *hypF* հիդրոգենազային մոլ տանտների «ուղիղ» թաղանթային բշտկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Բակտերիաներն աճեցվել են խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում (**Ա**), 6.5-ում (**Բ**) և 5.5-ում (**Գ**): Թաղանթային բշտկները տեղափոխվել են ռեակցիոն խառնուրդ՝ տրիս-HCl բուֆեր (pH 7.5, 6.5, 5.5) և 10 րոպե մշակվել են 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ով: Ներկայացված են երեք անկախ փորձերի արդյունքների միջինացված արժեքները՝ ստանդարտ շեղումներով: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:



Նկ.3.7. *E. coli*-ի BW25113 վայրի շտամի և *selC*, *hyaB hybC selC*, *hypF* հիդրոգենազային մուտանտների «ուղիղ» թաղանթային բշտիկներում ԱՆՖ-ազային ակտիվությունը: Բակտերիաներն աճեցվել են խմորման պայմաններում, pH 6.5-ում (Բ) և 5.5-ում (Գ): Մանրամասների համար տես Նկ. 3.7.-ի (Ա)-ն:

Այս արդյունքը վկայում է, որ ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, pH-ի 7.5 արժեքի դեպքում ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության մեջ մեծ է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի դերը: *hypF* գենի հեռացումն էականորեն չի ազդում ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա, բայց մեծացնում է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ դրանով ցույց տալով, որ ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ի դեպքում՝ ի հակադրություն միայն գլիցերոլի խմորման, Յիդ-ներն ազդում են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի վրա:

Վերոհիշյալ պայմաններում *selC* և *hyaB hybC selC* մուտանտները (աղյ. 2.1)՝ համեմատած միայն գլիցերոլի խմորման, ցուցաբերել են, համապատասխանաբար, մոտավորապես 1.5 և 2.3 անգամ բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվություններ (տե՛ս նկ.3.7 Ա և աղյ. 3.2): Չնայած եռակի *hyaB hybC selC* մուտանտի բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվությանը, ԴՅԿԴ-ն գրեթե չի արգելակել այս ակտիվությունը, մինչդեռ *selC* մուտանտի ակտիվությունը նույն արգելակչի ներկայությամբ ընկճվել է գրեթե երեք անգամ (տե՛ս նկ.3.7 Ա և աղյ. 3.2): Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս ասել, որ ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ի դեպքում ՄՋԼ համալիրը և հավանաբար Յիդ-3-ն ավելի անհրաժեշտ են F_0F_1 -ի ակտիվության համար, քան Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը:

Այլ է պատկերը pH 6.5-ում. բոլոր Յիդ-ների բացակայությունը չի ազդում գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա և *hypF* մուտանտը ցուցաբերել է ամենաբարձր ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (նկ.3.7 Բ): Պետք է նշել, որ վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն այս pH-ում՝ համեմատած 7.5-ի, գրեթե երկու անգամ ցածր է (տե՛ս նկ.3.7 Ա և Բ): Այս արդյունքը թույլ է տալիս ասել, որ ինչպես միայն գլիցերոլի խմորման դեպքում, այնպես էլ գլյուկոզի և գլիցերոլի խառն խմորման դեպքում, աճման միջավայրի pH-ի և ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության մեջ կաուղիղ կապ:

Եռակի *hyaB hybC selC* մուտանտի թաղանթային բշտիկների ընդհանուր և ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները՝ համեմատած pH 7.5-ի, գրեթե երեք անգամ ցածր է (տե՛ս նկ. 3.7 Բ): Այս

մուտանտի ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը կազմել է վայրի տիպի նույն ակտիվության մոտավորապես 55 %-ը, մինչդեռ *selC* մուտանտինը՝ մոտավորապես 90 %-ը: Ելնելով այս տվյալներից՝ կարելի է ասել, որ ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման ընթացքում, թույլ թթվային pH-ի դեպքում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար անհրաժեշտ են Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը, բայց ոչ Յիդ-3-ը: Եվ՝ pH-6.5-ի և՛ pH-7.5-ի դեպքում ԴՑԿԴ-ն արգելակել է մուտանտի ակտիվությունը գրեթե երեք անգամ (տե՛ս նկ. 3.7 Ա և Բ, աղյ. 3.2):

Ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում *E. coli*-ի վերը նշված բոլոր շտամների թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն ուսումնասիրվել է նաև pH 5.5-ի դեպքում: Այս pH-ում BW25113 վայրի տիպի ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը մոտ երեք անգամ ցածր է՝ համեմատած pH 7.5-ի, մինչդեռ *selC* և *hyaB hybC selC* մուտանտները վայրի տիպի համեմատ ցուցաբերել են ավելի բարձր ակտիվություն (նկ. 3.7 Գ): ԴՑԿԴ-ն էականորեն ճնշել է *selC* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (մոտ 7 անգամ), իսկ եռակի *hyaB hybC selC* մուտանտինը՝ մոտ 1.4 անգամ (նկ. 3.7 Գ, աղյ. 3.2): Հավանաբար այս պայմաններում (գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորում), երբ խմորման արգասիքները, օրինակ, մրջնաթթուն կամ այլ թթուներ, կարող են կուտակվել բջջում և այդ կերպ նվազեցնել ներբջջային pH-ը, F_0F_1 -ԱԵՖ-ազը՝ չեզոքացնելով այդ թթուները, կատարում է կարևոր դեր ներբջջային pH-ի կարգավորման մեջ:

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները կարելի է ասել, որ *E. coli*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվության և աճման միջավայրի pH-ի միջև կա ուղիղ կապ. Գլիցերոլի խմորման պայմաններում հիմնային pH-ը առավել օպտիմալ է ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվության համար: Սա թերևս պայմանավորված է նրանով, որ այս բակտերիաների աճման համար օպտիմալ է pH 7.5-ը: Ավելի, F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի դերը պրոտոնաշարժ ուժի պահպանման մեջ՝ կախված Յիդ-ներից, տարբեր է (Trchounian et al., 2012; Trchounian, 2014): Եռակի *hyaB hybC selC* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվության տվյալները ցույց են տալիս, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ն անհրաժեշտ են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար և այս ֆերմենտների փոխամագործակցությունը կամ փոխազդեցությունն առավել

ակնհայտ է թույլ հիմնային pH-ի դեպքում (նկ. 3.6 Ա): Ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ի դեպքում *selC* և *hyaB hybC selC* մուտանտների ցուցաբերած բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը հավանաբար կարելի է բացատրել նրանով, որ խմորման այս պայմաններում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազը մասնակցում է թաղանթով H_2 -ի ցիկլի ձևավորմանը (Trchounian, 2014): Փաստորեն, երբ Յիդ-3-ը ակտիվ չէ որպես ՄՋԼ համալիրի մաս, F_0F_1 -ԱԵՖ-ազը գործում է որպես ներքջային pH-ի կարգավորիչ:

hypF մուտանտի բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում հավանաբար բջջի պատասխանն է բուրբոն-ների բացակայությանը: F_0F_1 -ը մասնակցում է պրոտոնային ցիկլի հավասարակշռմանը և կարգավորում է բջջի էներգետիկ պահանջները: Գլիցերոլի խմորման պայմաններում *E.coli*-ի կողմից էներգիայի փոխակերպումը տարբերվում է գլյուկոզի խմորման պայմաններից:

Ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, թույլ թթվային pH-ի (6.5) դեպքում *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության վրա առավել ազդեցություն ունեն Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը: Խմորման այս պայմաններում եռակի *hyaB hybC selC* մուտանտի ցուցաբերած բարձր ակտիվությունը թթվային pH-ի դեպքում կարելի է բացատրել՝ խմորման արգասիքների չեզոքացմանը F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի մասնակցությամբ: Հավանաբար, F_0F_1 -ը գործում է որպես խմորման ընթացքում առաջացած օրգանական թթուների, մասնավորապես, մրջնաթթվի չեզոքացման լրացուցիչ մեխանիզմ:

Ստացված արդյունքները կարևոր են գլիցերոլի և ածխածնի խառն աղբյուրների (գլյուկոզ և գլիցերոլ) անաերոբ խմորման պայմաններում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և Յիդ-ների, մասնավորապես, Յիդ-1-ի և Յիդ-2-ի միջև գործառնական կապը հասկանալու համար: Ընդհանրացնելով՝ կարելի ասել, որ կախված խմորման սուբստրատից և pH-ից այս ֆերմենտների փոխհարաբերության բնույթը տարբեր է:

3.2.3. *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվության կախվածությունը գլյուկոզի կոնցենտրացիայից և Յիդ-4-ի դերը

Նախորդ բաժիններում արդեն նշվել է, որ *E. coli*-ի Յիդ-3-ը (*hyc*) և Յիդ-4-ը (*hyf*) Մդի-Ի-ի հետ կազմում են թաղանթակապ ՄՁԼ համալիրի երկու ձևերը՝ համապատասխանաբար ՄՁԼ-1-ը և ՄՁԼ-2-ը: Ցույց է տրվել, որ Յիդ-4-ն առավել ակտիվ է թույլ թթվային pH-ի դեպքում և այս ֆերմենտն է հիմնականում պատասխանատու ջրածնի արտադրության համար (Bagramyan et al., 2003): Ցույց է տրվել նաև, որ գլյուկոզն ունի արգելակիչ ազդեցություն *hyf* գեների մակածման վրա (Self et al., 2004):

Մեր Լաբորատորիայում արված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ Յիդ-4-ը առավել ակտիվ է գլյուկոզի ցածր կոնցենտրացիաների և pH-ի 7.5 և 5.5 արժեքների դեպքում (Trchounian & Trchounian, 2014): Վերոհիշյալ Յիդ-ներն անհրաժեշտ են F_oF_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար (Bagramyan et al., 2003; Blbulyan et al., 2011): Խմորման պայմաններում, երբ F_oF_1 -ի հիմնական գործառույթը H^+ -ի տեղափոխումն ու ԱԵՖ-ի հիդրոլիզն է, այն կարող է ուղղակիորեն փոխազդել երկրորդային տեղափոխիչների, օրինակ, K^+ -ի տեղափոխման TrkA համակարգի հետ և կազմել F_oF_1 -TrkA գերհամալիր (Trchounian & Kobayashi, 2000): Այս տեսանկյունից հետաքրքրական էր ուսումնասիրել H^+ - F_oF_1 -ազի գործառական կապը ինչպես Յիդ-4-ի, այնպես էլ TrkA համակարգի հետ՝ կախած գլյուկոզի կոնցենտրացիայից:

Աղյուսակ 3.3.

E. coli-ի BW25113 և *hyfB-R* բակտերիաների թաղանթային բշտիկների ԴՑԿԴ-ը նկճված ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը K^+ -ի բացակայության և առկայության պայմաններում

Շտամ	ԴՑԿԴ-ը նկճված ԱԵՖ-ազային ակտիվություն, %*							
	pH 7.5				pH 6.5			
	0.2% Գլյուկոզ		0.8% Գլյուկոզ		0.2% Գլյուկոզ		0.8% Գլյուկոզ	
	- K^+	+ K^+	- K^+	+ K^+	- K^+	+ K^+	- K^+	+ K^+
BW25113 <i>վայրի տիպ</i>	79 ± 1	85 ± 1	86 ± 1	73 ± 2	84 ± 1	92 ± 1	84 ± 1	63 ± 2

<i>hyfB-R</i> մուտանտ	82 ± 1	87 ± 1	92 ± 1	82 ± 2	85 ± 2	84 ± 1	67 ± 1	87 ± 2
--------------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

* Բակտերիաների համար տես «Գլ ու խ 2»-ը: Յուրաքանչյուր շտամի ԴՅԿԴ-ընկճված ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը արտահայտված է %-ով, երբ ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ԴՅԿԴ-ի բացակայությամբ ընդունվել է 100 %՝ համապատասխան pH-ի և գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների խմորման պայմաններում:

Ուսումնասիրվել է *E. coli* BW25113 վայրի տիպի և JRG3621 (*hyfB-R*) (տե՛ս աղյ. 2.1) մուտանտ շտամի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների խմորման պայմաններում, pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում: Պետք է նշել, որ 0.2 % գլյուկոզի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում վայրի տիպի ցուցաբերած ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (350 նմոլ Φ_{min} /րոպե մկգ սպիտակուց) համահունչ էր նախկինում ստացված արդյունքների հետ (Bagramyan et al., 2003): Վայրի տիպի ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը միջավայրում 100 մՄ K^+ -ի ներկայությամբ՝ համեմատած K^+ -ի բացակայության պայմանների, խթանվել է մոտ 1.4 անգամ (նկ. 3.8 Ա):

Այս արդյունքը վկայում է խմորման այս պայմաններում *E. coli* F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և TrkA տեղափոխիչի փոխարարելիության մասին: 0.2 մՄ ԴՅԿԴ-ն զգալիորեն ճնշել է ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը մոտ 5 անգամ և մոտ 7 անգամ՝ համապատասխանաբար K^+ չպարունակող և պարունակող միջավայրերում (աղյ.3.3): Ավելին, վերոհիշյալ պայմաններում (0.2% գլյուկոզ, pH 7.5) *hyfB-R* մուտանտի ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը K^+ -ի բացակայության դեպքում՝ համեմատած վայրի տիպի նույն ակտիվության հետ, ցածր էր 1.5 անգամ (տե՛ս նկ. 3.8 Ա):

100 մՄ K^+ -ը խթանել է մուտանտի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը մոտ 1.2 անգամ (նկ.3.8 Ա): Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ գլյուկոզի խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ի դեպքում Յիդ-4-ի դերը պրոտոնաշարժ ուժի պահպանումն է և համահունչ են մեր լաբորատորիայում ստացված տվյալների հետ (Trchounian & Sawers, 2014; Trchounian & Trchounian, 2014): Կարելի է ասել, որ Յիդ-4-ը այս դեպքում

կատարում է միջնորդի դեր F_0F_1 -TrkA համալիրի ձևավորման և F_0F_1 -ից TrkA-ին էներգիայի ուղղակի փոխանցման մեջ:

0.8% գլյուկոզի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ի դեպքում վայրի տիպի ընդհանուր և γ -ԳԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները K^+ -ի բացակայության դեպքում 18-22 %-ով բարձր էին՝ համեմատած 0.2% գլյուկոզի խմորման հետ (նկ. 3.8 Ա և Բ): Այս դեպքում էլ γ -ԳԿԴ-ն զգալիորեն արգելակում է վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ինչպես K^+ -ի բացակայությամբ (մոտ 7 անգամ), այնպես էլ ներկայությամբ (մոտ 4 անգամ) (աղյ. 3.3): Ինչևէ, պետք է նշել, որ միջավայրում K^+ -ի առկայության դեպքում վայրի տիպի ցուցաբերած γ -ԳԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ցածր էր՝ համեմատած K^+ -ի բացակայության պայմաններին (նկ.3.8 Բ): Այս արդյունքը թույլ է տալիս ենթադրել, որ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլյուկոզի կոնցենտրացիայից կախյալ է. ֆերմենտն առավել ակտիվ է գլյուկոզի ցածր կոնցենտրացիայի դեպքում (0.2%), pH 7.5-ում: Հավանաբար գլյուկոզի բարձր կոնցենտրացիայի դեպքում (0.8 %) F_0F_1 -ի և TrkA-ի միջև չի ձևավորվում գործառական կապ: Վերոհիշյալ պայմաններում *hyfB-R* մուտանտը միջավայրում K^+ -ի բացակայության դեպքում՝ համեմատած վայրի տիպի, ցուցաբերել է մոտ 2.2 անգամ ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվություն, իսկ 100 մՄ K^+ -ը չի ազդել մուտանտ ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա (նկ.3.8 Բ): Այս արդյունքները ևս մեկ անգամ ցույց են տալիս TrkA-ի տարբեր ռեժիմների կախվածությունը pH-ից և γ -ԳԿԴ-ի դերը F_0F_1 -ի և TrkA-ի գործառական կապի ձևավորման մեջ:

Ուսումնասիրվել են նաև *E. coli* վայրի տիպի և *hyfB-R* մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները գլյուկոզի 0.2 % և 0.8 % կոնցենտրացիաների խմորման պայմաններում, pH 6.5-ի դեպքում՝ միջավայրում K^+ -ի առկայությամբ և բացակայությամբ: Վայրի տիպի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը pH-ի այս արժեքի և 0.2 % գլյուկոզի խմորման դեպքում, միջավայրում ինչպես K^+ -ի բացակայության, այնպես էլ առկայության պայմաններում՝ համեմատած pH 7.5-ի, ցածր է (նկ. 3.9 Ա և տե՛ս նկ. 3.8 Ա): γ -ԳԿԴ-ն զգալիորեն ազդել է վայրի տիպի ընդհանուր ԱԵՖ-ազային

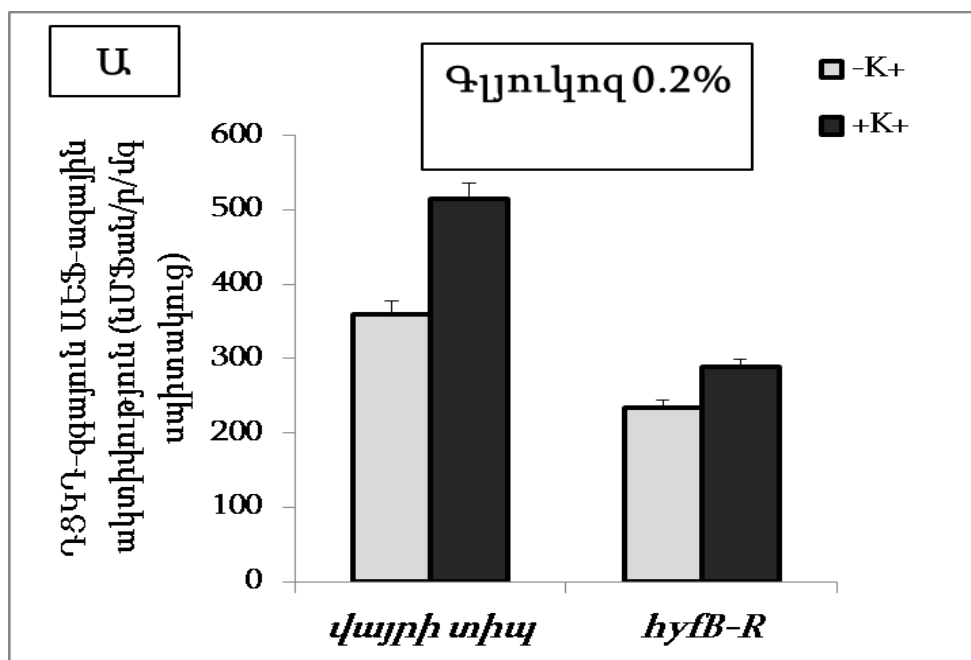
ակտիվություն վրա՝ ընկճելով այն մոտ 12 անգամ K^+ -ի բացակայության և մոտ 7 անգամ էլ՝ առկայության դեպքում (աղյ. 3.3), մինչդեռ 100 մՄ K^+ -ը գրեթե չի ազդել վայրի տիպի ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա (նկ. 3.9 Ա): Մուտանտի ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը K^+ -ազատ միջավայրում նման էր վայրի տիպի նույն ակտիվությանը (նկ. 3.9 Ա): Միևնույն կոնցենտրացիայով K^+ -ը չունեի որևէ ադեցություն *hyfB-R*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա, ավելին K^+ -ի ներկայությամբ ակտիվությունն ավելի ցածր էր (տե՛ս նկ. 3.9 Ա): Ստացված արդյունքը թույլ է տալիս ասել, որ Յիդ-4-ը կատարում է միջնորդի դեր F_0F_1 -TrkA համալիի ձևավորման մեջ:

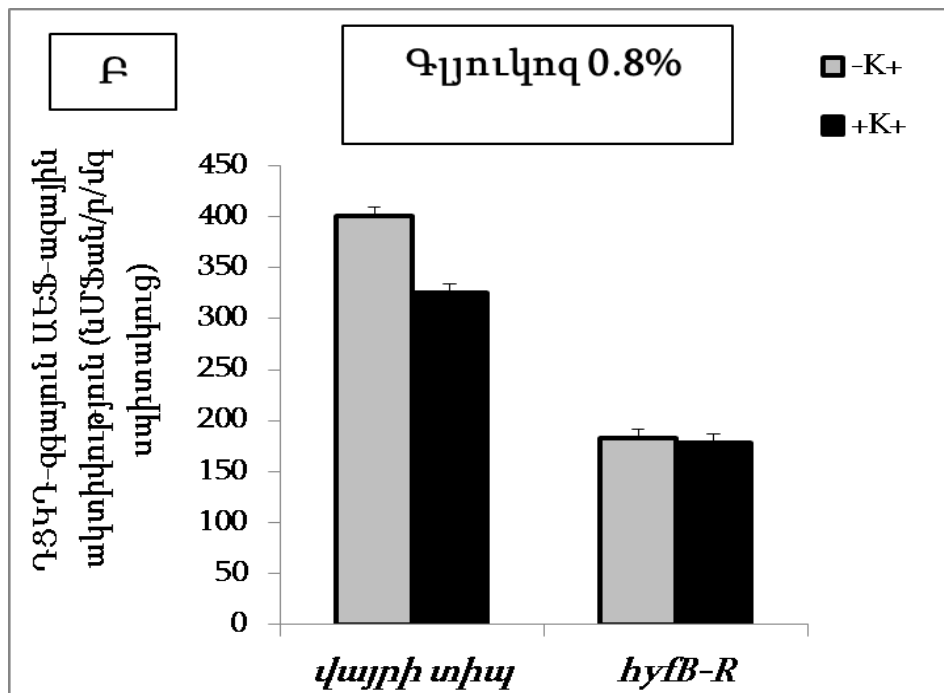
Պատկերն հետաքրքրական է pH 6.5-ում և 0.8% գլյուկոզի խմորման պայմաններում: Համեմատած 0.2% գլյուկոզի խմորման հետ և՛ վայրի տիպի և՛ *hyfB-R*-ի ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները K^+ -ի բացակայությամբ ցածր էին (նկ. 3.9 Ա և Բ): K^+ -պարունակող միջավայրում վայրի տիպի թաղանթային բշտիկների ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը մոտ 1.6 անգամ ցածր էր՝ համեմատած K^+ -ի բացակայությանը (տե՛ս նկ. 3.9 Ա և Բ), մինչդեռ մուտանտի նույն ակտիվությունը K^+ -ի ներկայությամբ մոտ կրկնակի անգամ խթանվել է (նկ. 3.9 Բ): Այս արդյունքները ցույց են տալիս F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և K^+ -ի կլանման համակարգի կապը գլյուկոզի բարձր կոնցենտրացիայի (0.8%) խմորման պայմաններում, pH 6.5-ում, որում Յիդ-4-ը դեր չի կատարում: ԴՑԿԴ-ն զգալիորեն ընկճել է վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը K^+ -ի բացակայության դեպքում (մոտ 7 անգամ), իսկ վերջինիս ներկայությամբ արգելակումը համեմատաբար ցածր էր (մոտ 2.4 անգամ) (աղյ. 3.3): Ի հակադրություն վայրի տիպի՝ մուտանտի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ԴՑԿԴ-ով զգալիորեն արգելակվել է միջավայրում K^+ -ի ներկայության դեպքում (տե՛ս աղյ. 3.3):

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները՝ կարելի է ասել, որ գլյուկոզի բարձր կոնցենտրացիան (0.8%) ազդում է *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության և Յիդ-4-ի, ինչպես նաև երկրորդային տեղափոխիչների, օրինակ, TrkA-ի հետ դրա փոխգործակցության վրա: 100 մՄ K^+ -ը խթանում է վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլյուկոզի ցածր կոնցենտրացիայի (0.2 %) խմորման պայմաններում,

pH 7.5-ում և 6.5-ում: Այս արդյունքները ցույց են տալիս, որ F_0F_1 -TrkA գերհամալիրի ձևավորվում է գլյուկոզի ցածր կոնցենտրացիայի խմորման պայմաններում, հիմնային pH-ում: Գլյուկոզի բարձր կոնցենտրացիայի խմորման պայմաններում և pH 6.5-ում *hyfB-R* մուտանտի ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը կարելի է բացատրել մեծ քանակությամբ մրջնաթթվի առաջացմամբ, ինչն էլ հանգեցնում է ներքջջային միջավայրի թթվեցմանը և արդյունքում սկսում է գործել F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի կարգավորիչ մեխանիզմը՝ ընկճելով ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը:

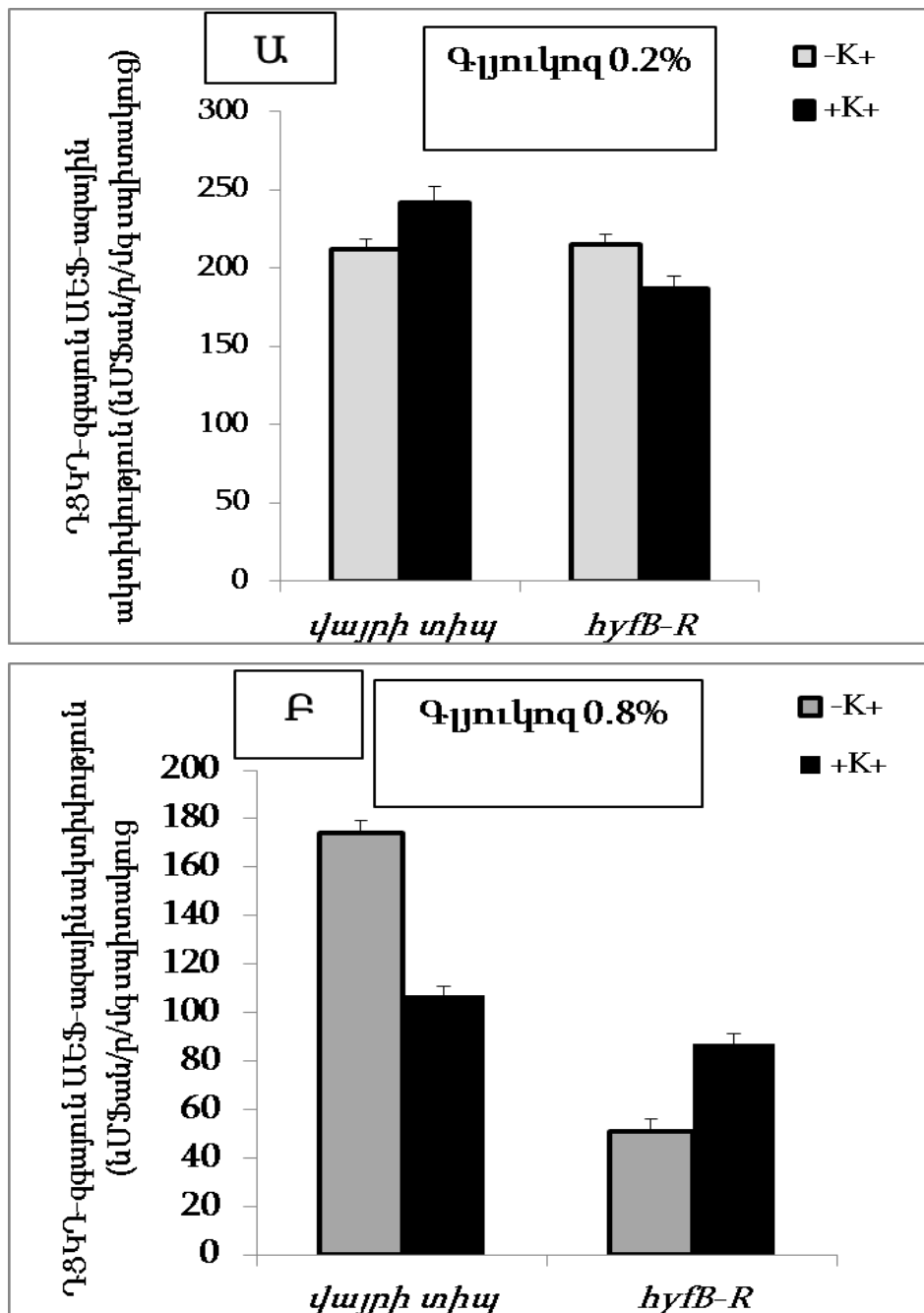
Վայրի տիպի ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլյուկոզի բարձր կոնցենտրացիայի խմորման պայմաններում, pH-ի 7.5 և 6.5 արժեքների դեպքում և K^+ -ի ներկայությամբ, ցույց է տալիս, որ F_0F_1 -ի և երկրորդային տեղափոխիչ համակարգի՝ TrkA-ի, գործառական կապը կախված է գլյուկոզի կոնցենտրացիայից և արտաքին pH-ից:





Նկ. 3.8. *E. coli*-ի BW25113 վայրի և *hyfB-R* հիդրոգենազային մուտանտի «ուղիղ» թաղանթային բշտիկներում ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Բակտերիաներն աճեցվել են 0.2 % գլյուկոզի (Ա) և 0.8 % գլյուկոզի (Բ) խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում: ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը որոշվել է ԴՑԿԴ-ի ներկայությամբ և առանց ԴՑԿԴ-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունների տարբերությամբ: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:

Այս արդյունքները ցույց են տալիս Յիդ-4 և TrkA-ի հետ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի փոխազդեցության բնույթը և դրա կարևորությունը խմորման պայմաններում:



Նկ. 3.9. *E. coli*-ի BW25113 վայրի և *hyfB-R* հիդրոգենազային մուտանտի «ուղիղ» թաղանթային բշտիկներում ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ունը: Բակտերիաներն աճեցվել են 0.2 % գլյուկոզի (Ա) և 0.8 % գլյուկոզի (Բ) խմորման պայմաններում, pH 6.5-ում: ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ունը որոշվել է ԴՅԿԴ-ի ներկայությամբ և առանց ԴՅԿԴ-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունների տարբերությամբ: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:

3.3. Թաղանթակապգործընթացները *G. toebii*-ում՝ որպես ռեդօքս սթրեսի հաղթահարման պատասխան

Բակտերիաների օքսիդականացնողական (ռեդօքս) զգայնության մեջ ընդգրկված ուղիներն ու մեխանիզմները, ինչպես նաև նյութափոխանակության կարգավորումը, դեռևս հստակ պարզաբանված չեն տարբեր բակտերիաներում, իսկ որոշների, մասնավորապես, ջերմասեր (*Geobacillus*) մանրէների համար, վերոհիշյալ հարցադրումները գրեթե ուսումնասիրված չեն: Ուսումնասիրվել են տարբեր ջերմասեր մանրէների որոշ նյութափոխանակային ռեդօքս ռեակցիաներ, հաշվվել են դրանց էներգիայի փոփոխությունները՝ կախված աճման միջավայրի կազմից և ջերմաստիճանից (Wang et al., 2015):

3.3.1. *G. toebii* ArzA-8-ի աճն ու ՕՎՊ-ի կինետիկան. գլյուկոզի ազդեցությունը

Հետաքրքրական է, որ ջերմասեր բակտերիաների տարբեր թաղանթային միավորները կարող են ձևափոխել ռեդօքս գործոնների ազդեցությունը և հետևաբար նաև սթրեսային պատասխանները:

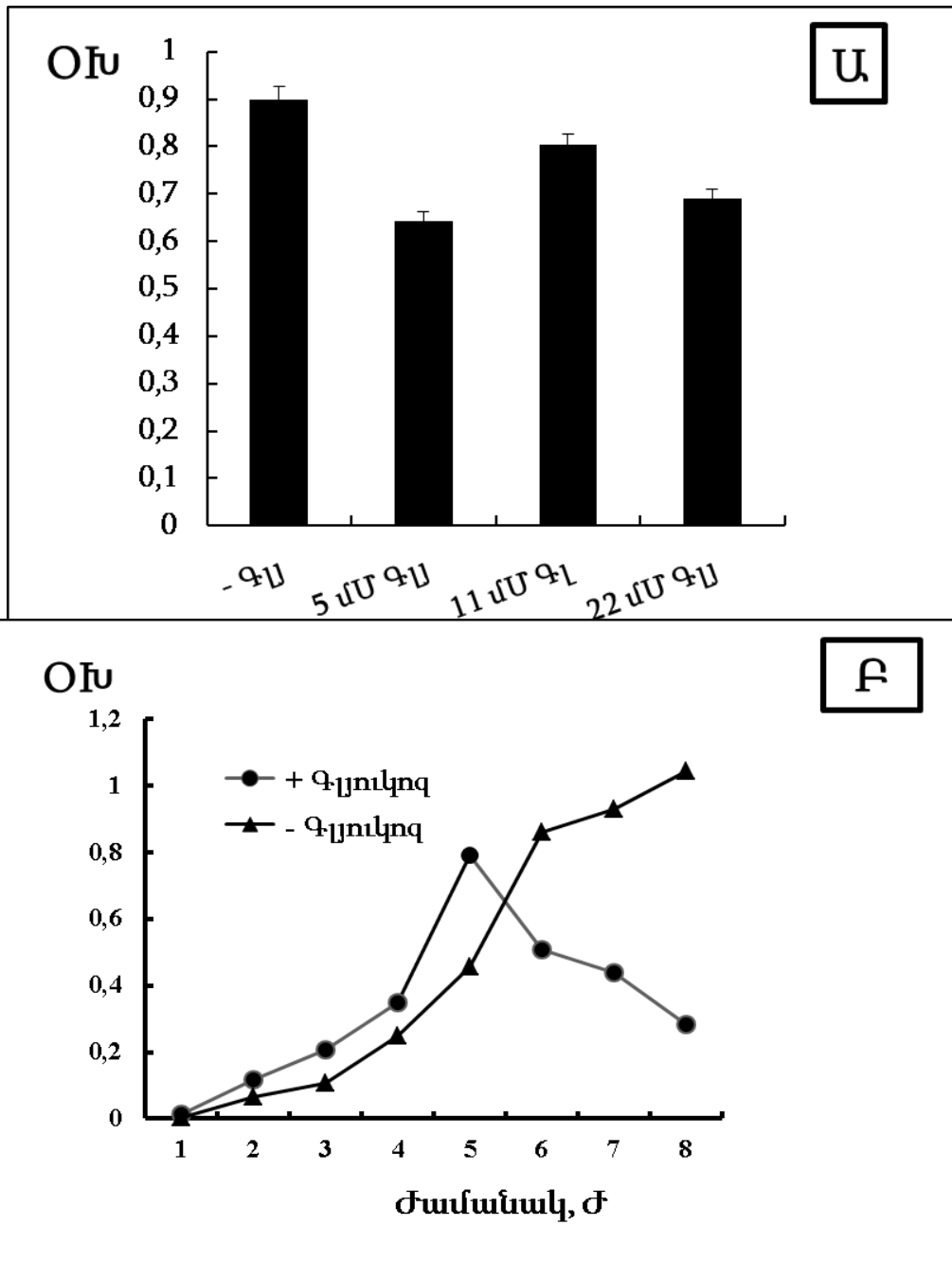
Հետազոտության այս փուլում արտաքին միջավայրում ռեդօքս սթրեսի պայմաններում ուսումնասիրվել է ջերմասեր *Geobacillus toebii* (*G. toebii*) ArzA-8 տեսակի աճը, ՕՎՊ-ի կինետիկան և pH-ի փոփոխությունները, ինչպես նաև պրոտոնի տեղափոխությունն ամբողջական բջիջներում և թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Մանրէն մեկուսացվել է Հայաստանի Արզաբանի երկրաջերմային աղբյուրից (ջերմաստիճանը $> 44^{\circ}\text{C}$, pH 7.0-7.2) (Panosyan et al., 2018): Օքիդիչների և վերականգնիչների առկայությամբ՝ ռեդօքս սթրեսի պայմաններում, դիտվել է բակտերիաների աճի ընկճում: Ինչևէ, որոշ ռեդօքս գործոններ բակտերիաների աճի լոգարիթմական փուլում խթանել են աճը՝ նպաստելով սթրեսի հաղթահարմանը:

G. toebii ArzA-8-ի աճի առավելագույն ելք (ՕԽ~0.9) դիտվել է օրգանական սուբստրատներով հարուստ ՍԱ-ում աճելիս՝ գլյուկոզի բացակայությամբ (Նկ. 3.10 Ա): Գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների (5.11 և 22 մՄ) ներկայությամբ աճելիս դիտվել է

այլ պատկեր, ինչն հավանաբար պայմանավորված է եղել բակտերիայի կողմից գլյուկոզի կլանման տարբեր արագություններով, արտազատված արգասիքների քանակների տարբերությամբ կամ pH-ի արժեքի փոփոխությամբ (Նկ. 3.10): Ելնելով վերոհիշյալից ուսումնասիրվել է նաև pH-ի փոփոխությունը: Միևնույն ժամանակ առանց գլյուկոզի աճելիս, 24 ժամ անց, դիտվել է աճի միջավայրի հիմնայնացում. միջավայրի pH-ը եղել է 8.4:

Այնուամենայնիվ, 5, 11 և 22 մՄ գլյուկոզի ներկայությամբ աճելիս, լոգ փուլի վերջում դիտվել է աճման միջավայրի pH-ի անկում, համապատասխանաբար, 5.9, 5.7 և 5.4 (Նկ. 3.11): Ստացված արդյունքներն հավանաբար պայմանավորված են ածխածնի աղբյուրի (գլյուկոզ) նյութափոխանակության արգասիքների տարբերությունից, իսկ միջավայրի հիմնայնացումը արդյունք է հիմնական արգասիքների արտազատման կամ ՍԱ-ում առկա ամինաթթուների յուրացմամբ: Բակտերիաների աճման կայուն (ստացիոնար) փուլի սկզբում՝ գլյուկոզի առկայությամբ աճելիս, դիտվել է ՕԿ-ի անկում (Նկ. 3.10 Բ): Պետք է նշել, այս բակտերիաների մանրադիտակային պատրաստուկներում դիտվել է նաև Էնդոսպորների առաջացում: Հավանաբար սպորագոյացման պատճառը միջավայրի ծայրահեղ թթվեցումն է (Ghazaryan et al., 2015):

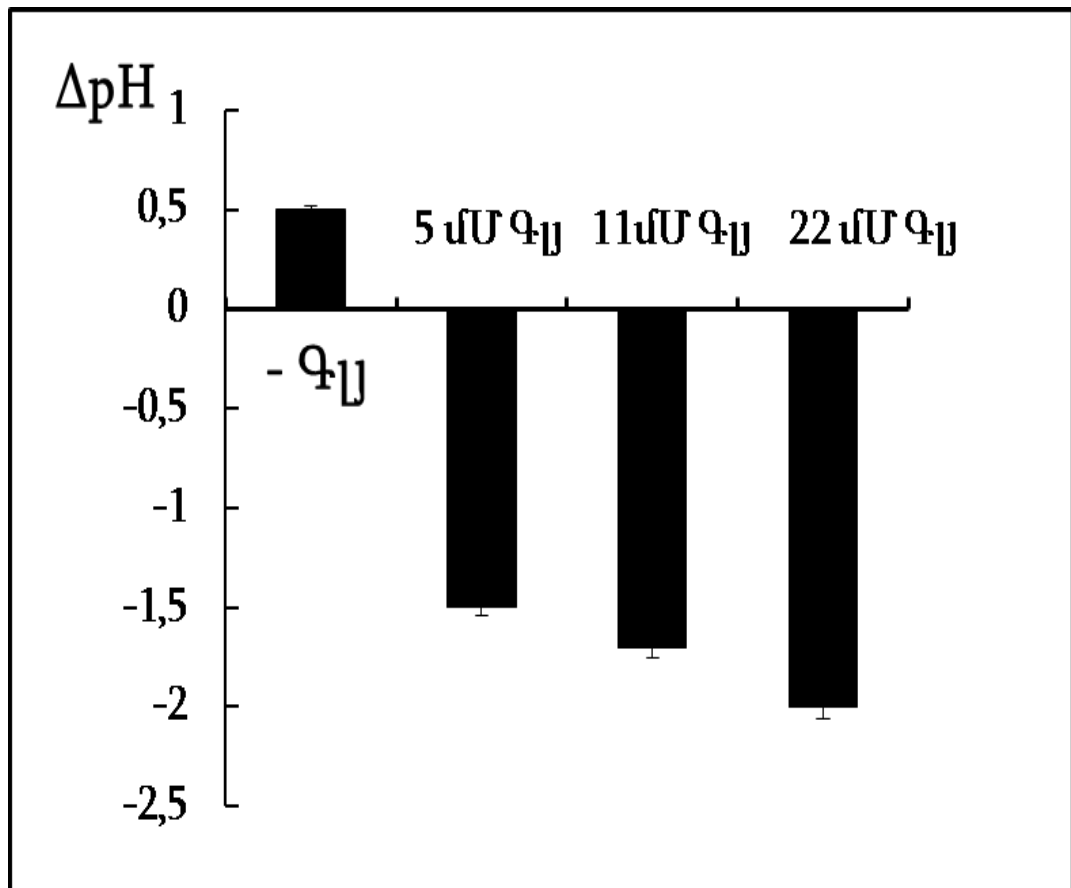
Բակտերիաների աճի լոգ փուլում, միջավայրի pH 6.5 և 7.5 արժեքների դեպքում, դիտվել է ՕՎՊ-ի անկում: Աճման միջավայրի pH-ի նախնական արժեքը չի ազդում ՕՎՊ-ի կինետիկայի վրա (Նկ. 3.12): Գլյուկոզի բացակայությամբ աճելիս pH-ի աճին զուգընթաց դիտվել է ՕՎՊ-ի անկում դեպի բացասական արժեքների (Ti-Si էլեկտրոդ -150±5 մՎ, Pt -350±4), մինչդեռ pH-ի ավելի ցածր արժեքի դեպքում և գլյուկոզի ներկայությամբ դիտվել է ՕՎՊ-ի աճ դեպի դրական արժեքների (+111±3 մՎ, +80±3 մՎ) (Նկ. 3.12): Հարկ է նշել, որ գլյուկոզի վերոհիշյալ բոլոր կոնցենտրացիաներն էլ (5, 11 և 22 մՄ) ընկճում են ՕՎՊ-ի անկումը, բայց չեն ազդում ՕՎՊ-ի կինետիկայի բնույթի վրա:



Նկ .3.10
toebii

G.

ArzA-8-ի աճի ընթացքում ՕԽ-ի փոփոխությունը: Բակ տերիաներն աճեցվել են սննդարար արգանակում, առանց գլյուկոզի կամ գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների ներկայությամբ, pH 7.5-ում մ (Ա): Ներկայացված են ՕԽ-ի տվյալները աճից 5 ժամ անց: ArzA-8-ի աճը 11 մՄ գլյուկոզի ներկայությամբ և բացակայությամբ (Բ): Ներկայացված են երեք անկախ փորձերի արդյունքների միջինացված արժեքները՝ ստանդարտ շեղումներով: Մանրամասների համար տես «Գլյուկոզ 2»-ը:



Նկ. 3.11. *G. toebii* ArzA-8-ի աճի ընթացքում միջավայրի pH-ի փոփոխությունը առանց գլյուկոզի կամ գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների ներկայությամբ: ΔpH -ը միջավայրի նախնական և աճից 8 ժամ անց միջավայրի pH-ների տարբերությունն է: Մանրամասների համար տես «Նկ. 3.10.»-ը:

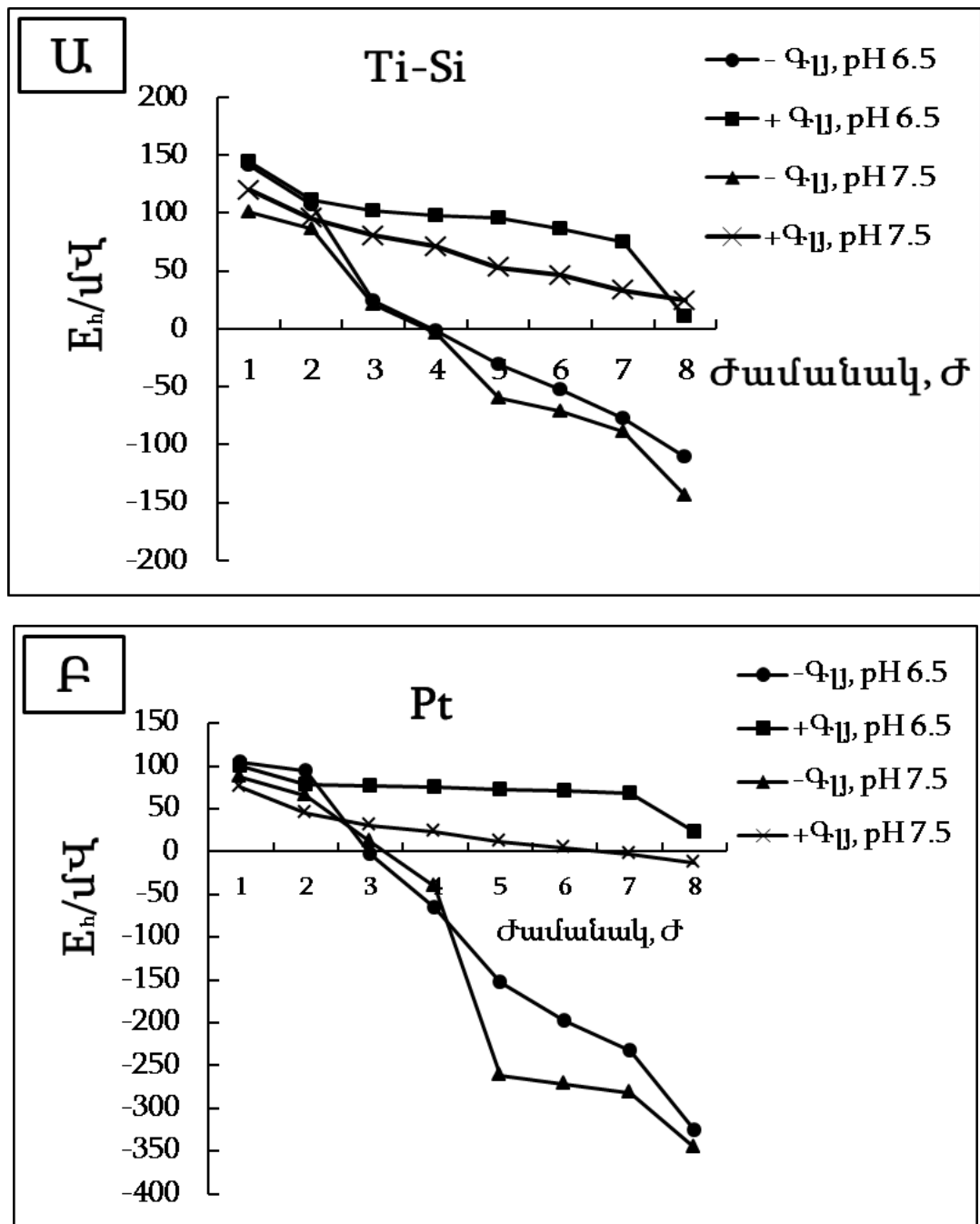
G.toebii ՕԿՊ-ի քիչ անկումը դեպի բացասական արժեքները գլյուկոզի ներկայությամբ զգալիորեն տարբերվում է, օրինակ, մեզոֆիլ *E. coli* և *E. hirae* մանրէների համար ստացված նույն արժեքներից (Poladyan et al., 2013): Տարբեր հետազոտողներ ցույց են տվել, որ աճի ընթացքում բակտերիաների կրկնապատկումը դիտվում է ՕԿՊ-ի անկումից հետո և կարող է ցույց տալ բակտերիայի՝ լոգարիթմական փուլից կայուն փուլ անցումը:

3.3.2 Ռեդօքս ռեագենտների ազդեցությունը *G. toebii* ArzA-8-ի աճի և ՕՎՊ-ի կինետիկայի վրա

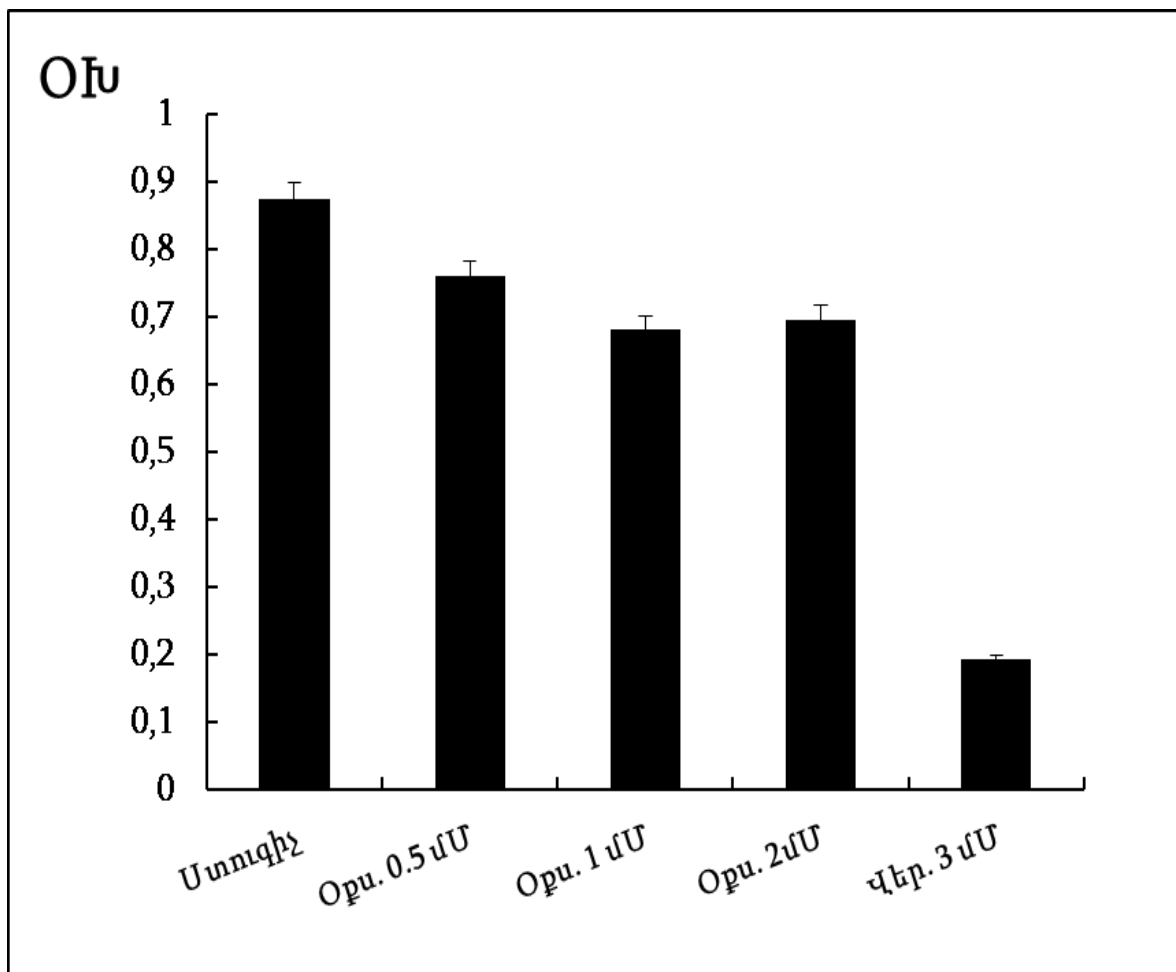
ՕՎՊ-ի որոշիչ դերը բակտերիաների աճի համար ցույց է տալիս, որ տարբեր օքսիդիչները և վերականգնիչները, որոնք ազդում են ՕՎՊ-ի վրա, կարող են միջնորդել բակտերիաների աճը: Հետազոտության այս փուլում ուսումնասիրվել է օքսիդիչ կալիումի երկաթացիանիդի ($K_3[Fe(CN)_6]$) և վերականգնիչ դիթիոտրեյտոլի (ԴԹՏ) ազդեցությունը *G. toebii*-ի աճի և ՕՎՊ-ի կինետիկայի վրա: Նախկինում մեր լաբորատորիայի և այլ հետազոտողների արած աշխատանքներում ցույց է տրվել այս ռեագենտների ազդեցությունը *E. coli*-ի և այլ բակտերիաների վրա (Ghazaryan et al., 2015): Հետաքրքրությունը նշված նյութերի նկատմամբ պայմանավորված է նաև նրանով, որ դրանք օգտագործվում են կենսատեխնոլոգիական գործընթացներում՝ բակտերիաների աճը միջնորդելու և սննդամթերքի պահպանման կամ պահածոյացման համար: Պետք է նշել, որ $K_3[Fe(CN)_6]$ -ի երկաթացիանիդը և ԴԹՏ-ն ընկճում են *G. toebii*-ի աճը (Նկ. 3.13 և 3.14): Միջավայրում գլյուկոզի բացակայության պայմաններում, 1 կամ 2 մՄ $K_3[Fe(CN)_6]$ -ը, աճի լոգ փուլի սկզբում խթանում է այն, սակայն հաջորդող փուլերում արգելակում է ~ 1.3 անգամ, իսկ ՕՎՊ-ի արժեքը նվազում է մինչև -20 ± 5 մՎ (Նկ. 3.13): 3 մՄ ԴԹՏ-ն գլյուկոզի բացակայությամբ աճելիս՝ զգալիորեն ընկճում է *G. toebii*-ի աճը՝ ~ 4.4 անգամ (տե՛ս Նկ. 3.13):

Բակտերիաների նյութափոխանակային գործընթացների բնականոն իրականացման համար կարևոր է ներքջային միջավայրի վերականգնված վիճակը: Ինչևէ, գլյուկոզի ներկայությամբ աճելիս, ԴԹՏ-ն զգալիորեն ընկճել է *G. toebii*-ի աճը, բայց միևնույն ժամանակ էլ աճի սկզբում դիտվել է խթանում՝ ~ 1.3 անգամ (Նկ. 3.13 և 3.14):

Այս արդյունքները հակադրվում էին գլյուկոզի բացակայությամբ ստացված տվյալների հետ: Միջավայրում գլյուկոզի և 3 մՄ ԴԹՏ-ի ներկայությամբ աճից 8 ժամ հետո, դիտվել է ՕՎՊ-ի անկում բացասական արժեքների (-280 ± 3 մՎ):



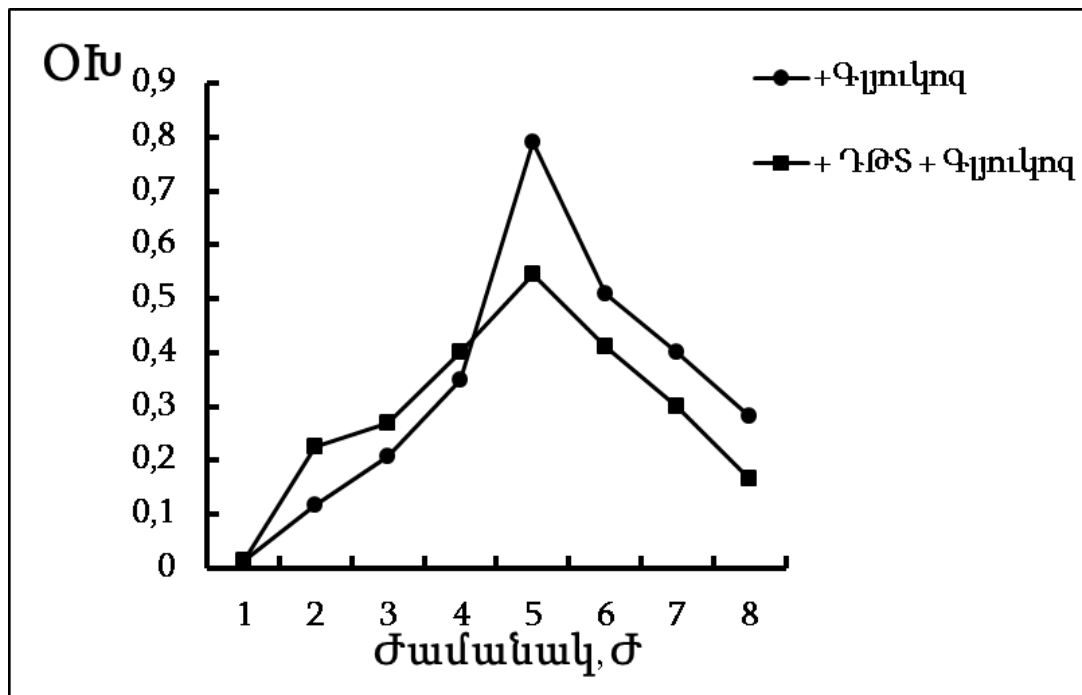
Նկ. 3. 12 ՕՎՊ-ի կինետիկան *G. toebii* ArzA-8-ի աճի ընթացքում առանց գլյուկոզի և 5 մՄ գլյուկոզի ներկայ ու թյամբ, pH 6.5-ում և 7.5-ում:
ՕՎՊ-ն չափվել է Ti-Si-այ ին (**Ս**) և Pt (**Ք**) էլեկտրոդների միջոցով:



Նկ.
3.13
Գ.

toebii ArzA-8-ի աճի ընթացքում ՕԽ-ի փոփոխությունը՝ տարբեր կոնցենտրացիաներով օքսիդիչ կալիումի երկաթացիանիդի (Օքս.) և վերականգնիչ ԴԹՏ-ի (Վեր.) ներկայությունը: Ներկայացված են ՕԽ-ի արժեքները աճից 5 ժամ անց: Ստուգիչն աճեցվել է առանց օքսիդիչի և վերականգնիչի:

Գ. *toebii*-ի վրա օքսիդիչ $K_3[Fe(CN)_6]$ -ի և վերականգնիչ ԴԹՏ-ի ազդեցությունների տարբերությունը, հալանաբար, պայմանավորված է բակտերիայի պլազմային թաղանթով՝ դրանց թափանցելության տարբերությամբ. $K_3[Fe(CN)_6]$ -ը համարվում է մեզոֆիլ մանրէների թաղանթի համար անթափանցելի, իսկ ԴԹՏ-ն թափանցում է թաղանթով (Poladyan et al., 2013): Հալանաբար, այս առանձնահատկությունները ջերմաստիճանների համար այլ են:



Նկ. 3.14. *G. toebii* ArzA-8-ի աճի կինետիկան՝ 11 մՄ գլյուկոզի և/կամ 3 մՄ ԴԹՏ- ներկայ ու թյամբ, pH 7.5-ում:

3.3.3. *G. toebii* ArzA-8-ի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և արոտոնի տեղափոխումը

ՕԿՊ-ի փոփոխությունների մեխանիզմները և ռեդօքս սթրեսին բակտերիայի պատասխանը հասկանալու համար, ուսումնասիրել ենք նաև *G. toebii*-ի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և թաղանթով արոտոնի տեղափոխությունը: 11 մՄ գլյուկոզի ներկայ ու թյամբ դիտվել է H^+ -ի ցածր արտահոսք ($0.32 \text{ մՄ/ր} \cdot 10^{10}$ բջիջ): F_oF_1 -ԱԵՖ-ազի և H^+ տեղափոխող այլ կառույցների արգելակիչ ԴՑԿԴ-ն (0.5 մՄ) ընկճել է H^+ -ի արտահոսքը ~ 1.7 անգամ ($p < 0.01$): Արգելակչի այս ազդեցությունը կարելի է բացատրել F_oF_1 -ԱԵՖ-ազով H^+ -ի տեղափոխման մեխանիզմի վրա ունեցած ազդեցությամբ, քանի որ աերոբ պայմաններում ԱԵՖ-սինթազը պետք է աշխատի ԱԵՖ-ի սինթեզի ուղղությամբ՝ այն է H^+ -ի ներհոսքի ռեժիմում: Օքսիդիչ $K_3[Fe(CN)_6]$ -ը (1 մՄ) և վերկանգնիչ ԴԹՏ-ն (3 մՄ) ամբողջությամբ արգելակում են H^+ -ի արտահոսքը (Աղյ. 3.4): Պետք է նշել, որ պլազմային թաղանթով K^+ -ի տեղափոխություն չի դիտվել:

G. toebii-ի ArzA-8 բակտերիաների բջջաթաղանթով H^+ -ի արտահոսքը pH 7.5-
 ում:

11 մՄ գլյուկոզ, 0.5 մՄ ԴՑԿԴ, 1 մՄ $K_3[Fe(CN)_6]$, 3 մՄ ԴԹՏ

Միջավայրի պայմաններ	H^+ -ի արտահոսք (մՄ/ր. $\cdot 10^{-10}$ բջիջ)			
Առանց գլյուկոզի	Ընդհանուր	ԴՑԿԴ- ընկճված*	$K_3[Fe(CN)_6]$	ԴԹՏ
	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	—**	—**
Գլյուկոզի ներկայությամբ	0.32 ± 0.02	0.14 ± 0.02 ($p < 0.01$)	0.02 ± 0.01 ($p < 0.001$)	0.01 ± 0.01 ($p < 0.001$)

* Առանց ԴՑԿԴ-ի և ԴՑԿԴ-ով H^+ -ի արտահոսքերի տարբերությունն է

** ցույց տրված չէ

Հետաքրքրական է, որ գլյուկոզի բացակայությամբ աճից հետո *G. toebii*-ի թաղանթային բշտիկների ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը բավականին բարձր էր՝ $\sim 530 \pm 0.05$ նՄ Ֆ_{ան}/րոպե մկգ սպիտակուց, ինչը ~ 1.3 անգամ բարձր էր համեմատած գլյուկոզի ներկայությամբ աճած բակտերիաների (Նկ. 3.15 Ա): 0.5 մՄ ԴՑԿԴ-ն զգալիորեն ճնշել է ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (~ 3 անգամ, $p < 0.005$): ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլյուկոզի բացակայությամբ նույնպես բարձր էր (~ 1.23 անգամ)՝ համեմատած գլյուկոզով աճած մանրէների նույն ակտիվության հետ (Նկ. 3.15 Բ): Ստացված արդյունքները համեմատելի են այլ մանրէների համար ստացված տվյալների հետ (Bibulyan et al., 2011; Poladyan et al., 2013): *G. toebii*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվության, ինչպես նաև այլ մեխանիզմների արգելակումը ԴՑԿԴ-ի կողմից, ցույց է տալիս F_0F_1 -ի չափազանց կարևորությունը այս մանրէի նյութափոխանակային ընդհանուր համատեքստում: Այլ ջերմասեր բակտերիայի *F*-տեսակի ԱԵՖ-ազի համար նույնպես առաջարկվել է նման տեսակետ (Wakai et al., 2013):

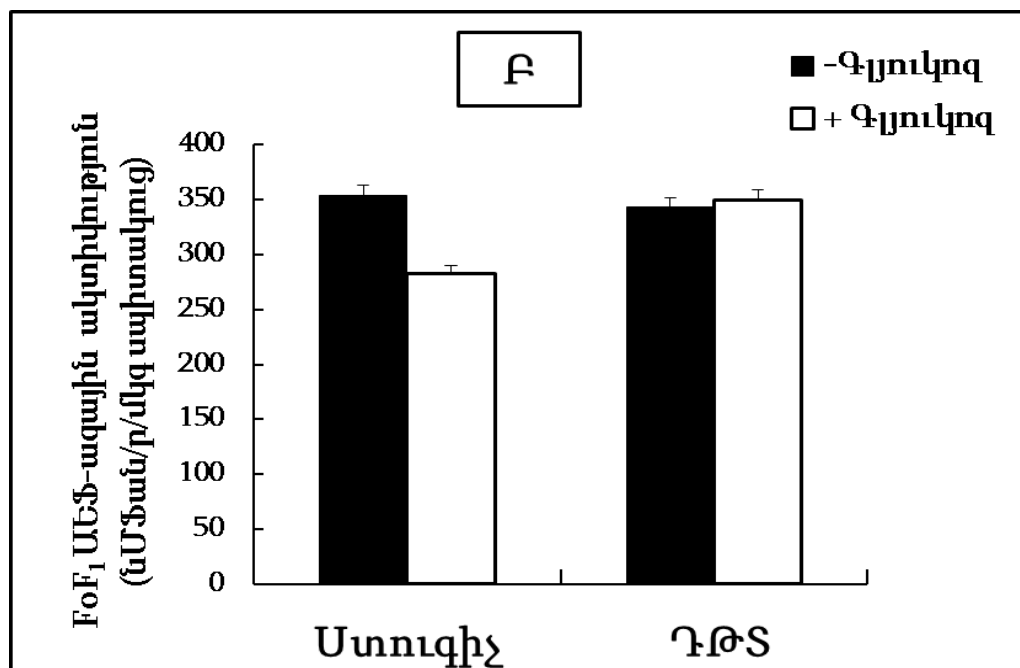
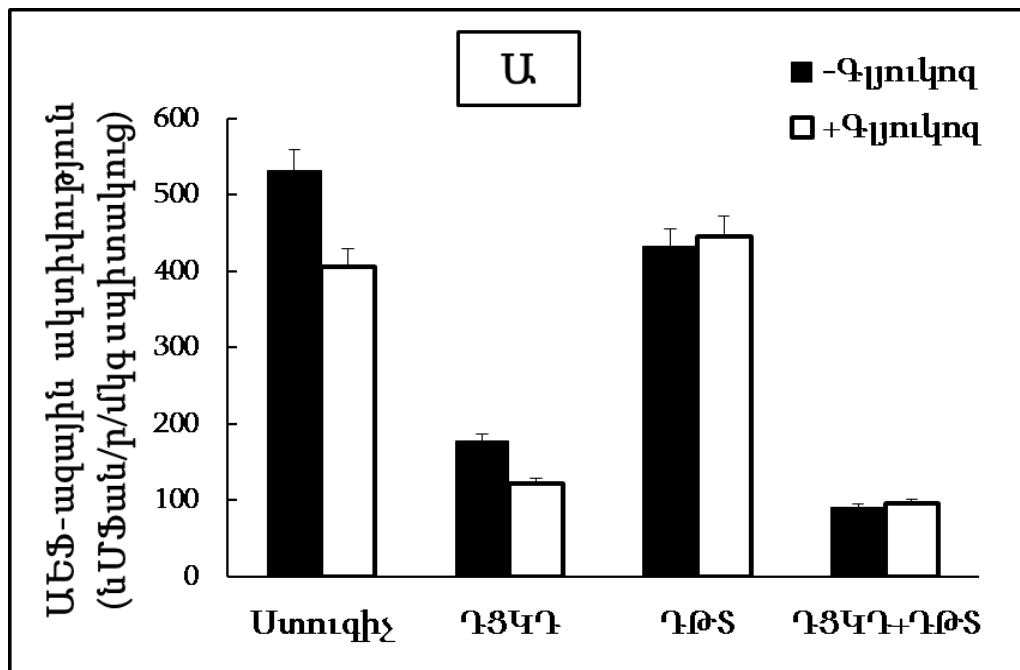
Վերականգնիչ ԴԹՏ-ն (3 մՄ) ընկճել է գլյուկոզի բացակայությամբ աճեցված *G. toebii*-ի ընդհանուր և ԴՑԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունները, համապատասխանաբար, ~ 1.23 անգամ և ~ 5 անգամ ($p < 0.001$)՝ համեմատած ստուգիչի, որում բացակայել է ԴԹՏ-ն (տե՛ս Նկ. 3.15 Ա): Ի հակադրություն այս արդյունքի, ԴԹՏ-ն թերևս

աննշան, բայց խթանել է գլյուկոզի ներկայությամբ աճեցված բակտերիայի ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (~ 1.1 անգամ)՝ համեմատած առանց գլյուկոզի աճեցված բակտերիայի, իսկ ԴՑԿԴ-ն արգելակել է ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը (~ 4 անգամ, $p < 0.001$) (Նկ. 3.15 Ա): Էական է, որ գլյուկոզով աճեցված բջիջների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ԴԹՏ-ի ներկայությամբ խթանվել է ~ 1.24 անգամ՝ համեմատած առանց գլյուկոզի աճեցված ստուգիչի (տե՛ս Նկ. 3.15 Բ): Այսպիսով, այս արդյունքները թույլ են տալիս ասել, որ ԴԹՏ-ի խթանիչ ազդեցությունը պայմանավորված է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազով:

Պետք է նշել, որ օքսիդիչ $K_3[Fe(CN)_6]$ -ը փոխազդում էր փորձարարական խառնուրդի հետ և անհնար դարձնում այս ռեագենտի՝ ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա ունեցած ազդեցության որոշումը:

Գլյուկոզի բացակայությամբ աճեցված *G. toebii*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվության աճը կարող է վերագրվել միջավայրի pH-ին. հնարավոր է F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազի գործելու համար օպտիմալ է հիմնային pH-ը: Գլյուկոզի յուրացման պայմաններում դիտվում էր միջավայրի թթվեցում, ինչն էլ կարող է ազդել ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա:

Ստացված արդյունքները նոր են *G. toebii*-ի համար, առաջին անգամ ուսումնասիրվել են աճի ընթացքում ռեդօքս հատկությունների փոփոխությունները, pH-ի 6.5 և 7.5 արժեքների դեպքում: Ածխածնի աղբյուրի (գլյուկոզ) առկայությունից կախված, ՕՎՊ-ի և pH-ի կինետիկայում ստացվել են զգալի տարբերություններ: Գլյուկոզի ներկայությամբ աճի ընթացքում դիտվում է միջավայրի թթվեցում և ՕՎՊ-ի դրական արժեք, մինչդեռ գլյուկոզի բացակայությամբ, երբ միջավայրը հիմնայնացվում է, գրանցվում են ՕՎՊ-ի ցածր բացասական արժեքներ (տե՛ս Նկ. 3.12-3.14): Այս փոփոխությունները հավանաբար պայմանավորված են pH-ի և ՕՎՊ-ի փոխհարաբերությամբ, ինչի արդյունքում կարող են «մակածվել» այս բակտերիայի ռեդօքս նյութափոխանակային ուղիները: Պետք է նշել, որ *G. toebii*-ի աճի ընթացքում ՕՎՊ-ի կինետիկան կախված չէր արտաքին pH-ի տատանումներից:



Նկ. 3.15. *G. toebii* ArzA-8-ի թաղանթային բշտիկների ընդհանուր (Ա) և F₀F₁-ԱՆՖ ազային (Բ) ակտիվությունները: Բակտերիաներն աճեցվել են առանց գլյուկոզի և գլյուկոզի (11 մՄ) ներկայությամբ, pH 7.5-ում: Թաղանթային բշտիկները 10 րոպե մշակվել են 0.5 մՄ ԴՖԿԴ-ով և 3 մՄ ԴԹՏ-ով: F₀F₁-ԱՆՖ-ազային ակտիվությունը որոշվել է ԴՖԿԴ-ի ներկայությամբ և առանց ԴՖԿԴ-ի ԱՆՖ-ազային ակտիվությունների տարբերությամբ: Ստուգիչը աճեցվել է առանց արգելիչ կամ վերականգնիչի: Մանրամասների համար տես «Գլուխ 2»-ը:

Տարբեր բակտերիաների օպտիմալ ՕՎՊ-ն որոշվել է ռեդօքս սթրեսի պայմաններում աճի կարգավորմամբ: Այն փաստը, որ գլյուկոզի ներկայության և բացակայության պայմաններում՝ օքսիդիչի կամ վերականգնիչի ավելացումը խթանում է բակտերիայի աճը նախնական փուլում, առաջ է բերում համալիր հարցադրումներ, որոնք կարելի է բացատրել ՕՎՊ-ի փոփոխությամբ կամ այլ ուղիներով, ինչպես ցույց է տրվել *E. coli* և *E. hirae* բակտերիաների համար (Poladyan et al., 2013):

Հարկ է նշել, որ ԴՑԿԴ-զգայուն H^+ -ի հոսքն ու ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գեոբացիլ ներում ուսումնասիրվել է առաջին անգամ: *G. toebii*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը բավականին բարձր էր:

Հետաքրքրական է, որ կախված գլյուկոզի առկայությունից՝ դիտվել են ԱԵՖ-ազային ակտիվության տարբեր մակարդակներ. վերականգնված պայմաններում ընկճվել է ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ բայց ոչ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազայինը (առանց գլյուկոզի):

Գլյուկոզի ներկայությամբ ԴԹՏ-ով պայմանավորված վերականգնված պայմաններում՝ դիտվել է ԱԵՖ-ազային ակտիվության խթանում: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազի դերը այս բակտերիայի ֆիզիոլոգիական և էկոլոգիական գործընթացներում, մասնավորապես ռեդօքս զգայնության մեջ: Հնարավոր է, որ բակտերիայի աճի ընթացքում ռեդօքս ռեագենտների ցուցաբերած այս արդյունքները պայմանավորված են հենց F_0F_1 -ԱԵՖ-սինթազով: Միևնույն ժամանակ էլ ջերմասեր բակտերիաների այս ֆերմենտը դեռևս չավելացնում ուսումնասիրված չէ: Ընդհանուր առմամբ ջերմասեր բակտերիաներում ածխածնի աղբյուրների և ֆոսֆատների նյութափոխանակային ուղիների էներգիային փոխանակությունը խնդրահարույց է, քանի որ այս դասի միացությունների նյութափոխանակությունը ջերմաստիճանից կախված բարդ, բազմաբայլ ռեակցիաների ամբողջությունն է: Հարկ է նշել, որ *G. toebii*-ի համար ստացված այս տվյալները լիովին տարբերվում են *E. coli*-ի համար ստացված տվյալներից (Poladyan et al., 2013):

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

21-րդ դարում մարդկության առջև ծառացած մարտահրավերներից թերևս առաջնայիններից են էներգիայի հիմնախնդիրը և գլոբալ տաքացումը: Այս համատեքստում կարևորվում է նոր, էկոլոգիապես մաքուր էներգիայի աղբյուրների որոնումն ու կիրառումը, ինչպիսին է, օրինակ, կենսավառելիքը, մասնավորապես՝ կենսաջրածինը: Վերջին տարիներին մեծացել է կենսաջրածնի արտադրության տեսանկյունից կիրառելի համարվող մանրէների, օրինակ, աղիքային ցուպիկի կենսաէներգետիկային խնդիրների նկատմամբ հետաքրքրվողները:

Աղիքային ցուպիկում խմորման ընթացքում առաջացած մրջնաթթուն՝ թաղանթակապ մրջնաթթու-ջրածին-լիազ (ՄՋԼ) ֆերմենտային համալիրի միջոցով օքսիդանում է մինչև ածխաթթու գազի (CO_2) և մոլեկուլային ջրածնի (H_2): Վերջինս էլ էկոլոգիապես մաքուր, վերականգնվող, մոտ 140 կՋ/գ էներգիա ունեցող վառելիք է, որի այրումից անջատվում է ջուր (Momirlan and Veziroglu, 2005; Hallenbeck and Ghosh, 2009; Chu and Majumdar, 2012): Այս գործընթացում ընդգրկված հատուկ ֆերմենտների՝ հիդրոգենազների էներգետիկ պահանջների համար անհրաժեշտ է կարևորագույն ֆերմենտի՝ պրոտոնային F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի գործունեությունը (Bagramyan and Trchounian, 2003):

Ներկայացված աշխատանքում ուսումնասիրվել է վառելիքի ստացման ամենատարածված և մատչելի թափոնի՝ գլիցերոլի, խմորման պայմաններում աղիքային ցուպիկի ԱԵՖ-ազային ակտիվության առանձնահատկությունները, ինչպես նաև փորձ է արվել բացատրել պրոտոնային ԱԵՖ-ազի և հիդրոգենազների գործառական կապը խմորման և pH-ի տարբեր արժեքների պայմաններում:

Այս աշխատանքի շրջանակներում ցույց է տրվել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում աճեցված *E. coli*-ի BW25113 նախնու թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը զգալիորեն ճնշվում է 0.2 մՄ ԴՑԿԴ-ի ազդեցությամբ pH 7.5-ում (տե՛ս Գլուխ 3.1): Ընդ որում այս ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝

համեմատած գլյուկոզի խմորում իրականացրած բջիջներից ստացված թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվության հետ, ցածր է գրեթե երկու անգամ (Գլուխ 3.1.):

Ցույց է տրվել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում, թույլ հիմնային pH-ում աճեցված *E.coli*-ի *hyaB* և *hybC* հիդրոգենազային մոլտանտների (բացակայում են, համապատասխանաբար, Յիդ-1-ի և Յիդ-2-ի մեծ ենթամիավորները) թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը համեմատած վայրի տիպի հետ՝ ցածր էր, համապատասխանաբար, մոտավորապես երկու և չորս անգամ (տե՛ս Գլուխ 3.1.): *hyaB* և *hybC* մոլտանտների ընդհանուր և ԴՅԿԴ-զգայուն ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը թույլ է տալիս ենթադրել, որ վերոհիշյալ պայմաններում՝ Յիդ-2-ը ավելին, քան Յիդ-1-ը, ունի ամուր փոխազդեցություն F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի հետ, իսկ *hyaB* *hybC* կրկնակի մոլտանտի բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը կարելի է բացատրել ինչպես տարբեր Յիդ-ների, մասնավորապես, Յիդ-1-ի և Յիդ-2-ի միմյանց, այնպես էլ վերջիններիս և ԱԵՖ-ազի փոխազդեցությամբ (տե՛ս Գլուխ 3.1.):

Վերոհիշյալ բոլոր բակտերիաների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն ուսումնասիրվել է նաև գլիցերոլի խմորման և թույլ թթվային pH-ի (5.5)-ի պայմաններում: *fhIA* մոլտանտը ցուցաբերել է ցածր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը, ինչը ևս մեկ անգամ փաստում է, որ FhIA-ը կողավորող գենն ունի ԱԵՖ-ազային ակտիվություն (Leonhartsberger et al., 2002; Bagramyan and Trchounian, 2003): *hyaB* և *hybC* մոլտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ համեմատած վայրի տիպի հետ, բարձր էր (տե՛ս Գլուխ 3.1.): Ստացված տվյալները վկայում են, թույլ թթվային pH-ի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում, F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի և ՄՁԼ համալիրի գործառական կապի մասին:

Գլիցերոլի խմորման պայմաններում H^+ -ԱԵՖ-ազի և K^+ -ի տեղափոխման TrkA համակարգի փոխազդեցության պարզաբանման համար, ուսումնասիրվել է BW25113 վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը 100 մՄ K^+ -ի ներկայությամբ, pH 7.5-ում, և 5.5-ում. այս ակտիվությունը չի խթանվել K^+ -ի ներկայությամբ և հետաքրքրական է, որ էապես չի ճնշվել ԴՅԿԴ-ի ազդեցությամբ:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ վերոհիշյալ համակարգերը փոխկապակցված չեն գլիցերոլի խմորման պայմաններում:

Ուսումնասիրվել է նաև *E.coli*-ի BW25113 վայրի տիպի բջիջների H^+ -ի և K^+ -ի փոխանակությունը գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում և 5.5-ում: Համեմատած գլյուկոզի՝ գլիցերոլի խմորման դեպքում, և՛ H^+ -ի և՛ K^+ -ի հոսքերը ցածր են եղել (տե՛ս Գլուխ 3.1.):

Ցույց է տրվել նաև, որ K^+ -ի կլանումն գլիցերոլի խմորման պայմաններում նշված մուտանտներում ցածր է կամ ընդհանրապես բացակայում է (տե՛ս Գլուխ 3.1.):

Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ գլիցերոլի խմորման դեպքում, թույլ հիմնային pH-ի դեպքում, Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը ուղղակիորեն փոխազդում են F_0F_1 -ի հետ կամ մասնակցում թաղանթով պրոտոնի տեղափոխմանը, իսկ *fhfA* մուտանտի H^+ -ի արտահոսքի բարձր արժեքը կարող է ցույց տալ, որ գլիցերոլի խմորման դեպքում Յիդ-3-ը և Յիդ-4-ը կարող են գործել H^+ -ի կլանման ուղղությամբ: Այս արդյունքը հաստատում է նախկինում ստացված տվյալներն այն մասին, որ հավանաբար և՛ Յիդ-3-ը և՛ Յիդ-4-ն օժտված են H^+ տեղափոխելու հատկությամբ (Trchounian, 2004; Hakobyan et al., 2005):

Յիդ-ների ազդեցությունը F_0F_1 -ԱՏՖ-ազի ակտիվության վրա գլիցերոլի և գլյուկոզի ու գլիցերոլի խառը խմորման պայմաններում պարզաբանելու համար, ուսումնասիրվել է *E. coli*-ի վայրի տիպի և տարբեր Յիդ-ային մուտանտների աճը pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում: Հարկ է նշել, որ գլիցերոլի ու գլյուկոզի խառնուրդի խմորում իրականացրած բջիջների աճն՝ համեմատած միայն գլիցերոլի խմորման, ավելի ինտենսիվ էր: Պետք է նշել, որ *E. coli*-ի վայրի տիպի և մուտանտների աճման տեսակարար արագությունը գլիցերոլի և գլյուկոզի խառնուրդի խմորման դեպքում pH 5.5-ում զգալիորեն ցածր է՝ համեմատած pH 7.5-ի և 6.5-ի (Գլուխ 3.2.1): Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ Յիդ-ներն ազդում են բակտերիաների աճի վրա ինչպես միայն գլիցերոլի, այնպես էլ գլիցերոլ և գլյուկոզ խառնուրդի խմորման դեպքում՝ կախված pH-ի արժեքից:

Տարբեր Յիդ-ների և F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի փոխհարաբերությունը գլիցերոլի խմորման դեպքում պարզելու համար ուսումնասիրվել է *E. coli*-ի վայրի տիպի և տարբեր Յիդ-ային մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և ընդհանրացնելով ստացված տվյալները՝ կարելի է ասել, որ գլիցերոլի խմորման պայմաններում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության և միջավայրի pH-ի միջև կա ուղիղ հարաբերակցություն. ամենաբարձր ակտիվություն դիտվել է pH 7.5-ում: Յիդ-1-ը Յիդ-2-ն անհրաժեշտ են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար:

Ուսումնասիրվել է *E. coli*-ի վայրի տիպի և Յիդ-ային մուտանտների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ածխածնի խառն աղբյուրների՝ գլյուկոզի և գլիցերոլի, խմորման պայմաններում, pH-ի 7.5, 6.5 և 5.5 արժեքների դեպքում: Բոլոր շտամները խմորման այս պայմաններում և pH-ի վերոհիշյալ արժեքների դեպքում՝ համեմատած միայն գլիցերոլի, ցուցաբերել են ավելի բարձր ԱԵՖ-ազային ակտիվություն:

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները՝ կարելի է ասել, որ *E. coli*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվության և ածխածնի միջավայրի pH-ի միջև կա ուղիղ կապ: Գլիցերոլի խմորման պայմաններում հիմնային pH-ը առավել օպտիմալ է ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվության համար:

Ուսումնասիրվել է F_0F_1 -ի և երկրորդային տեղափոխիչ համակարգի՝ TrkA-ի, գործառական կապը գլյուկոզի տարբեր կոնցենտրացիաների և արտաքին pH-ի տարբեր արժեքների պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ F_0F_1 - TrkA գերհամալիրը ձևավորվում է գլյուկոզի ցածր կոնցենտրացիայի խմորման պայմաններում, հիմնային pH-ում:

Կատարված հետազոտությունները թույլ են տալիս պարզաբանել F_0F_1 -ի և Յիդ-ների, ինչպես նաև երկրորդային տեղափոխիչ համակարգերի գործառական կապը, փոխազդեցությունը, վերջինիս բնույթը տարբեր սուբստրատների խմորման պայմաններում և pH-ի տարբեր արժեքներում: Ստացված տվյալները կխորացնեն վերոհիշյալ համակարգերի մասին ունեցած պատկերացումները:

Հայտնի է, որ բնության մեջ, որտեղ սահմանափակ են մանրէների աճի պայմանները, ջերմասերները իրենց մենահատուկ ֆերմենտներով ցուցաբերում են տարբեր նյութափոխանակային ուղիներ և իրականացնում նավթամթերքի ածխաջրածինների յուրացում: Աշխատանքում առաջին անգամ ուսումնասիրվել է ջերմասեր *G. toebii* ArzA-8 տեսակի աճը, ՕՎՊ-ի կինետիկան և pH-ի փոփոխությունները, ինչպես նաև պրոտոնի տեղափոխությունն ամբողջական բջիջներում և թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ օքսիդիչի և վերականգնիչի առկայության պայմաններում: Այդ համատեքստում ջերմասեր *G. Toebii*-ի վերոհիշյալ ֆիզիոլոգիական գործընթացները համեմատվել են մեզոֆիլ *E.coli*-ի հետ: Այս ջերմասեր մանրէները կարող են արդյունավետորեն կիրառվել տաք կեղտաջրերի մշակման, ինչպես նաև անապատային և արևադարձային հողերի կենսահարստացման և կենսամաքման նպատակով: ՕՎՊ-ն կարող է ազդել նյութափոխանակային հոսքերի վրա և հանդիսանալ՝ որպես կարգավորման ֆիզիկաքիմիական ցուցանիշ: Հետևաբար, հաշվի առնելով վերոհիշյալը և կարգավորելով ՕՎՊ-ն, կարելի է մեծացնել ջերմասեր բատերիաների կենսատեխնոլոգիական կիրառելիությունը, ինչպես կենսազանգվածի ստացման, այնպես էլ տարբեր արժեքավոր նյութերի ստացման նպատակով:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒ ԹՅՈՒՆՆԵՐ

Կատարված հետազոտությունների և ստացված արդյունքների հիման վրա արվել են հետևյալ եզրակացությունները.

1. Գլիցերոլի խմորման դեպքում, pH 7.5-ում, *E. coli*-ի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ համեմատած գլյուկոզի, ցածր է. Յիդ-1-ը և Յիդ-2-ը ուղղակիորեն փոխազդում են F_0F_1 -ի հետ և մասնակցում թաղանթով պրոտոնի տեղափոխմանը:
2. Գլիցերոլի խմորման պայմաններում *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության և միջավայրի pH-ի միջև կա ուղիղ հարաբերակցություն. ամենաբարձր ակտիվություն դիտվել է pH 7.5-ում, իսկ ամենացածր՝ pH 5.5-ում: Ընդ որում 0.5 մՄ ԴՑԿԴ-ի արգելակիչ ազդեցությունը առավել զգալի է pH 7.5-ում: Յիդ-1-ը և 2-ը անհրաժեշտ են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի ակտիվության համար:
3. Ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում, pH-ի 7.5-ում ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության մեջ մեծ է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի դերը: Բուրո հիդրոգենազների հեռացումն (*hypF* գեն) էականորեն չի ազդում ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա, բայց մեծացնում է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ ինչն էլ փաստում է, որ ածխածնի խառն աղբյուրների խմորման պայմաններում Յիդ-ներն ազդում են F_0F_1 -ԱԵՖ-ազի վրա: Ընդ որում, կրկին դիվել է այս ակտիվությունների՝ pH-ից կախված բնույթ:
4. Գլյուկոզի բարձր կոնցենտրացիան (0.8%) խթանում է *E. coli*-ի F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը և ազդում Յիդ-4-ի, ինչպես նաև երկրորդային տեղափոխիչների, օրինակ, TrkA-ի հետ դրա փոխգործակցության վրա:
5. 100 մՄ K^+ -ը խթանում է վայրի տիպի ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը գլյուկոզի ցածր կոնցենտրացիայի (0.2%) խմորման պայմաններում, pH 7.5-ում և 6.5-ում: Ընդ որում F_0F_1 -ի և TrkA-ի գործառնական կապը կախված է գլյուկոզի կոնցենտրացիայից և արտաքին pH-ից:
6. *G. toebii* ArzA-8-ի ածի առավելագույն էլք (ՕԽ~0.9) գրանցվել է գլյուկոզի բացակայությամբ աճելիս, ընդ որում դիտվել է միջավայրի pH-ի հիմնայնացում: Նաև pH-ի ածին զուգընթաց

դիտվել է ՕՎՊ-ի անկում դեպի բացասական արժեքների, մինչդեռ pH-ի ավելի ցածր արժեքի դեպքում և գլյուկոզի ներկայությամբ դիտվել է ՕՎՊ-ի աճ դեպի դրական արժեքների:

7. Միջավայրում գլյուկոզի բացակայության պայմաններում և՛ 1 կամ 2 մՄ K-ի երկաթացիանիդը և՛ 3 մՄ ԴԹՏ-ն ընկճել են *G. toebii*-ի աճը: Գրանցվել է ՕՎՊ-ի անկում դեպի ավելի բացասական արժեքների, քան ստուգիչում: ԴԹՏ-ն (վերականգնված պայմաններ) ընկճել է *G. toebii*-ի ընդհանուր ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը՝ բայց ոչ F_0F_1 -ԱԵՖ-ազինը: Մինչդեռ գլյուկոզի առկայությամբ միջավայրում, ԴԹՏ-ն խթանել է F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը:
8. Բակտերիաներում F_0F_1 -ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը բնութագրվում է Յիդ-ների հետ փոխազդեցությամբ, գլիցերոլի և գլյուկոզի օքսիդացման ձևից կախվածությամբ, և օքսիդիչի ու վերականգնիչի միջոցով կարգավորմամբ:

Գրականության ցանկ

1. Թռչունյան Ա. Կենսաբանական թաղանթներ, Չանգակ-97, Երևան, 2001, 176 էջ
2. Թռչունյան Ա., Բաղրամյան Կ., Փոլարյան Ա., Գաբրիելյան Լ. Կենսաբանական թաղանթների կենսաաֆիզիկա, կենսաէներգետիկա և կենսաքիմիա, ԵՊՀ հրատարակչություն, Երևան, 2012.
3. Սեֆերյան Թ. Էլեկտրաինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը մոդելային և բնական թաղանթների լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վրա, Հայաստանի կենսաբանական հանդես, 61:1, 34-39.
4. Лакин Б. Биометрия. М.: Высшая школа, 1992, 293 с.
5. Potassium transport by bacteria: electrochemical approach, energetics and mechanisms, 2009, Chapter of book: In Bacterial Membranes. A. Trchounian (ed.). Res. Signpost: Kerala (India), pp. 65-111
6. Abrahams, J.P., Buchanan, S.K., Van Raaij, M.J., Fearnley, I.M., Leslie, A.G., Walker, J.E., 1996. The structure of bovine F₁-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 9420–4.
7. Andrews, S.C., Berks, B.C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M.A., Golby, P., Guest, J.R., 1997. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (hyf) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. Microbiology 143, 3633–3647. doi: 10.1099/00221287-143-11-3633
8. Araki, M., Hoshi, K., Fujiwara, M., Sasaki, Y., Yonezawa, H., Senpuku, H., Iwamoto-Kihara, A., Maeda, M., 2013. Complementation of the Fo c subunit of *Escherichia coli* with that of *Streptococcus mutans* and properties of the hybrid FoF₁ ATP synthase. J. Bacteriol. 195, 4873–8. doi: 10.1128/JB.00542-13
9. Arikado, E., Ishihara, H., Ehara, T., Shibata, C., Saito, H., Kakegawa, T., Igarashi, K., Kobayashi, H., 1999. Enzyme level of enterococcal F₁ Fo-ATPase is regulated by pH at the step of assembly. Eur. J. Biochem. 259, 262–268. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00031.x
10. Axley, M.J., Grahame, D.A., Stadtman, T.C., 1990. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. J. Biol. Chem. 265, 18213–8.
11. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-

- frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050
12. Bader, M.W., Bardwell, J.C., 2001. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in *Escherichia coli*. *Adv. Protein Chem.* 59, 283–301.
 13. Bagramyan, K., Mnatsakanyan, N., Poladian, A., Vassilian, A., Trchounian, A., 2002. The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F_0F_1 -ATPase, in H_2 production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. *FEBS Lett.* 516, 172–178. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02555-3
 14. Bagramyan, K., Trchounian, A., 2003. Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. *Biochemistry. (Mosc).* 68, 1159–70.
 15. Beyer, L., Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B., Sawers, R.G., 2013. Coordination of FocA and Pyruvate Formate-Lyase Synthesis in *Escherichia coli* Demonstrates Preferential Translocation of Formate over Other Mixed-Acid Fermentation Products. *J. Bacteriol.* 195, 1428–1435. doi: 10.1128/JB.02166-12
 16. Bilyard, T., Nakanishi-Matsui, M., Steel, B.C., Pilizota, T., Nord, A.L., Hosokawa, H., Futai, M., Berry, R.M., 2013. High-resolution single-molecule characterization of the enzymatic states in *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20120023. doi: 10.1098/rstb.2012.0023
 17. Blbulyan, S., Avagyan, A., Poladyan, A., Trchounian, A., 2011. Role of different *Escherichia coli* hydrogenases in H^+ efflux and $F_1 F_0$ -ATPase activity during glycerol fermentation at different pH values. *Biosci. Rep.* 31, 179–84. doi: 10.1042/BSR20100053
 18. Blbulyan, S., Trchounian, A., 2015. Impact of membrane-associated hydrogenases on the F_0F_1 -ATPase in *Escherichia coli* during glycerol and mixed carbon fermentation: ATPase activity and its inhibition by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in the mutants lacking hydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 579, 67–72. doi: 10.1016/j.abb.2015.05.015
 19. Blbulyan, S.S., 2016. Glucose concentration dependent ATP-ase activity in *Escherichia coli* during fermentation and the role of hydrogenase 4. *Biol. J. Armen.* 4 (68), 85-91.
 20. Blokesch, M., Albracht, S.P.J., Matzanke, B.F., Drapal, N.M., Jacobi, A., Böck, A., 2004. The Complex Between Hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an Intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-

- hydrogenases. *J. Mol. Biol.* 344, 155–167. doi: 10.1016/j.jmb.2004.09.040
21. Blokesch, M., Magalon, A., Böck, A., 2001. Interplay between the specific chaperone-like proteins HybG and HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, and 3 from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 2817–22. doi: 10.1128/JB.183.9.2817-2822.2001
 22. Boekema, E.J., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J.S., Brisson, A., Konings, W.N., 1997. Visualization of a peripheral stalk in V-type ATPase: evidence for the stator structure essential to rotational catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14291–3.
 23. Booth, I.R., 2007. The regulation of intracellular pH in bacteria. Wiley-Blackwell, pp. 19–37. doi: 10.1002/9780470515631.ch3
 24. Booth, I.R., 2005. Glycerol and methylglyoxal metabolism. *EcoSal Plus* 1. doi: 10.1128/ecosalplus.3.4.3
 25. Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2006. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8646–9. doi: 10.1073/pnas.0602915103
 26. Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717–749. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717
 27. Brown, S. V, Hosking, P., Li, J., Williams, N., 2006. ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* 5, 45–53. doi: 10.1128/EC.5.1.45-53.2006
 28. Canonico, L., Ashoor, S., Taccari, M., Comitini, F., Antonucci, M., Truzzi, C., Scarponi, G., Ciani, M., 2016. Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. *Ann. Microbiol.* 66, 1409–1418. doi: 10.1007/s13213-016-1228-0
 29. Capaldi, R.A., Aggeler, R., 2002. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* 27, 154–60.
 30. Chan Chung, K.C., Zamble, D.B., 2011. The *Escherichia coli* metal-binding chaperone SlyD interacts with the large subunit of [NiFe]-hydrogenase 3. *FEBS Lett.* 585, 291–294. doi: 10.1016/j.febslet.2010.12.024
 31. Chaudhary, N., 2011. Biosynthesis of ethanol and hydrogen by glycerol fermentation using *Escherichia coli*. *Adv. Chem. Eng. Sci.* 1, 83–89. doi: 10.4236/aces.2011.13014
 32. Chen, G.F., Fang, L., Inouye, M., 1993. Effect of the relative position of the UGA codon to the unique secondary structure in the fdhF mRNA on its decoding by selenocysteinyl tRNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268, 23128–31.

33. Chu, S., Majumdar, A., 2012. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature* 488, 294–303. doi: 10.1038/nature11475
34. Cingolani, G., Duncan, T.M., 2011. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 701–7. doi: 10.1038/nsmb.2058
35. Cox, G.B., Fimmel, A.L., Gibson, F., Hatch, L., 1986. The mechanism of ATP synthase: A reassessment of the functions of the b and a subunits. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 849, 62–69. doi: 10.1016/0005-2728(86)90096-4
36. Cross, R.L., Müller, V., 2004. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* 576, 1–4. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2004.08.065
37. da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27, 30–39. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.006
38. Dadi, P.K., Ahmad, M., Ahmad, Z., 2009. Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 45, 72–79. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2009.04.004
39. Datiles, M.J., Johnson, E.A., McCarty, R.E., 2008. Inhibition of the ATPase activity of the catalytic portion of ATP synthases by cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 362–368. doi: 10.1016/J.BBABIO.2008.01.010
40. Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K., 1996. The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 791–824. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.791
41. Dharmadi, Y., Murarka, A., Gonzalez, R., 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 821–829. doi: 10.1002/bit.21025
42. Dimroth, P., Schink, B., 1998. Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Arch. Microbiol.* 170, 69–77. doi: 10.1007/s002030050616
43. Dimroth, P., von Ballmoos, C., Meier, T., 2006. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. *EMBO Rep.* 7, 276–82. doi: 10.1038/sj.embor.7400646
44. Drory, O., Frolov, F., Nelson, N., 2004. Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep.* 5, 1148–52. doi: 10.1038/sj.embor.7400294

45. Dubini, A., Pye, R.L., Jack, R.L., Palmer, T., Sargent, F., 2002. How bacteria get energy from hydrogen: a genetic analysis of periplasmic hydrogen oxidation in *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1413–1420. doi: 10.1016/S0360-3199(02)00112-X
46. Duskova, M., Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A., Sychrova, H., 2015. The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–8. doi: 10.1093/femsle/fnu041
47. Feniouk, B.A., Junge, W., 2009. Proton translocation and ATP synthesis by the F_0F_1 -ATPase of purple bacteria. Springer, Dordrecht, pp. 475–493. doi:10.1007/978-1-4020-8815-5_24
48. Feniouk, B.A., Suzuki, T., Yoshida, M., 2006. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of F_0F_1 -ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 326–338. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.03.022
49. Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., Brandt, A., 2005. A Member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 16, 2068–2076. doi: 10.1091/mbc.E04-10-0884
50. Fillingame, R.H., Angevine, C.M., Dmitriev, O.Y., 2003. Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *FEBS Lett.* 555, 29–34.
51. Förster, A.H., Gescher, J., 2014. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2, 16. doi: 10.3389/fbioe.2014.00016
52. Forzi, L., Sawers, R.G., 2007. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *BioMetals* 20, 565–578. doi: 10.1007/s10534-006-9048-5
53. Gabrielyan, L., Sargsyan, H., Trchounian, A., 2015. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microb. Cell Fact.* 14, 131. doi: 10.1186/s12934-015-0324-3
54. Garlapati, V.K., Shankar, U., Budhiraja, A., 2016. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol. reports* 9, 9–14. doi: 10.1016/j.btre.2015.11.002
55. Ghazaryan, A., Ilbulyan, S., Poladyan, A., Trchounian, A., 2015. Redox stress in geobacilli from geothermal springs: Phenomenon and membrane-associated response mechanisms. *Bioelectrochemistry* 105, 1–6. doi:

10.1016/j.bioelechem.2015.04.007

56. Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L., Fillingame, R.H., 1998. Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₁F_o ATP synthase. *Biochemistry* 37, 8817–8824. doi: 10.1021/bi980511m
57. Gledhill, J.R., Walker, J.E., 2005. Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 386, 591–8. doi: 10.1042/BJ20041513
58. Gogol, E.P., Johnston, E., Aggeler, R., Capaldi, R.A., 1990. Ligand-dependent structural variations in *Escherichia coli* F₁ ATPase revealed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9585–9.
59. Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S.S., 2008. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 10, 234–245. doi: 10.1016/j.ymben.2008.05.001
60. Groth, G., Hisabori, T., Lill, H., Bald, D., 2002. Substitution of a single amino acid switches the tentoxin-resistant thermophilic F₁-ATPase into a tentoxin-sensitive Enzyme. *J. Biol. Chem.* 277, 20117–20119. doi: 10.1074/jbc.C200168200
61. Guo, H., Bueler, S.A., Rubinstein, J.L., 2017. Atomic model for the dimeric FOregion of mitochondrial ATP synthase. *Science* 358, 936–940. doi: 10.1126/science.aao4815
62. Guo, H., Suzuki, T., Rubinstein, J.L., 2019. Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife* 8. doi:10.7554/eLife.43128
63. Hakobyan, L., Gabrielyan, L., Trchounian, A., 2012. Relationship of proton motive force and the FoF₁-ATPase with bio-hydrogen production activity of *Rhodobacter sphaeroides*: effects of diphenylene iodonium, hydrogenase inhibitor, and its solvent dimethylsulphoxide. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 495–502. doi: 10.1007/s10863-012-9450-3
64. Hakobyan, M., Sargsyan, H., Bagramyan, K., 2005. Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli*. *Biophys. Chem.* 115, 55–61. doi: 10.1016/J.BPC.2005.01.002
65. Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol.* 27, 287–297. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.004
66. Hallenbeck, P.C., Liu, Y., 2016. Recent advances in hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 4446–4454. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2015.11.090

67. Hastati, D.Y., Hambali, E., Syamsu, K., Warsiki, E., 2017. Potential lactic acid production from crude glycerol as the precursor of polylactic acid analog : literature review. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 65, 12037. doi:10.1088/1755-1315/65/1/012037
68. Hatahet, F., Boyd, D., Beckwith, J., 2014. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. Biochim. Biophys. Acta 1844, 1402–14. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.014
69. Hénin, J., Tajkhorshid, E., Schulten, K., Chipot, C., 2008. Diffusion of glycerol through *Escherichia coli* aquaglyceroporin GlpF. Biophys. J. 94, 832–9. doi: 10.1529/biophysj.107.115105
70. Hidalgo, M., Puerta-Fernández, E., 2017. Fermentation of glycerol by a newly discovered anaerobic bacterium: adding value to biodiesel production. Microb. Biotechnol. 10, 528–530. doi:10.1111/1751-7915.12709
71. Hirono-Hara, Y., Ishizuka, K., Kinoshita, K., Yoshida, M., Noji, H., 2005. Activation of pausing F1 motor by external force. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 4288–93. doi:10.1073/pnas.0406486102
72. Hirono-Hara, Y., Noji, H., Nishiura, M., Muneyuki, E., Hara, K.Y., Yasuda, R., Kinoshita, K., Yoshida, M., Yoshida, M., 2001. Pause and rotation of F(1)-ATPase during catalysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 13649–54. doi: 10.1073/pnas.241365698
73. Hisabori, T., Sunamura, E.-I., Kim, Y., Konno, H., 2013. The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. Antioxid. Redox Signal. 19, 1846–54. doi: 10.1089/ars.2012.5044
74. Hisabori, T., Ueoka-Nakanishi, H., Konno, H., Koyama, F., 2003. Molecular evolution of the modulator of chloroplast ATP synthase: origin of the conformational change dependent regulation. FEBS Lett. 545, 71–5.
75. Ho, K.K., Weiner, H., 2005. Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 187, 1067–73. doi: 10.1128/JB.187.3.1067-1073.2005
76. Hong, S., Pedersen, P.L., 2008. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 590–641, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00016-08
77. Hube, M., Blokesch, M., Böck, A., 2002. Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. J. Bacteriol. 184, 3879–

85. doi: 10.1128/JB.184.14.3879-3885.2002
78. Hussein, A.H., Lisowska, B.K., Leak, D.J., 2015. The Genus *Geobacillus* and Their Biotechnological Potential, in: *Advances in Applied Microbiology*. pp. 1–48.
doi:10.1016/bs.aambs.2015.03.001
79. Jo, B.H., Cha, H.J., 2015. Activation of formate hydrogen-lyase via expression of uptake [NiFe]-hydrogenase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Microb. Cell Fact.* 14, 151.
doi: 10.1186/s12934-015-0343-0
80. Junge, W., Nelson, N., 2015. ATP Synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 631–657.
doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034124
81. Junge, W., Sielaff, H., Engelbrecht, S., 2009. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F_0F_1 -ATPase. *Nature* 459, 364–370. doi: 10.1038/nature08145
82. Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J., 2003. Protein Disulfide Bond Formation in Prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 111–135. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161459
83. Keis, S., Stocker, A., Dimroth, P., Cook, G.M., 2006. Inhibition of ATP hydrolysis by thermoalkaliphilic F_1F_0 -ATP synthase is controlled by the C terminus of the epsilon subunit. *J. Bacteriol.* 188, 3796–804. doi: 10.1128/JB.00040-06
84. Kim, D.-H., Lee, J.-H., Kang, S., Hallenbeck, P.C., Kim, E.-J., Lee, J.K., Kim, M.-S., 2014. Enhanced photo-fermentative H_2 production using *Rhodobacter sphaeroides* by ethanol addition and analysis of soluble microbial products. *Biotechnol. Biofuels* 7, 79. doi: 10.1186/1754-6834-7-79
85. Koningst, W.N., Kaback, H.R., 1973. Anaerobic Transport in *Escherichia coli* Membrane Vesicles (fl-galactosides/D-lactate dehydrogenase/a-glycerol phosphate dehydrogenase/fumarate reductase/ formate dehydrogenase/nitrate reductase) 70, 3376–3381.
86. Koumandou, V.L., Kossida, S., 2014. Evolution of the F_0F_1 ATP synthase complex in light of the patchy distribution of different bioenergetic pathways across prokaryotes. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003821. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003821
87. Krah, A., Zarco-Zavala, M., McMillan, D.G.G., 2018. Insights into the regulatory function of the ϵ subunit from bacterial F-type ATP synthases: a comparison of structural, biochemical and biophysical data. *Open Biol.* 8. doi:10.1098/RSOB.170275
88. Lages, F., Lucas, C., 1997. Contribution to the physiological characterization of

- glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1322,8–18.
89. Lamont, C.M., an Kelly, C.L., Pinske, C., Buchanan, G., Palmer, T., Sargent, F., n.d. Expanding the substrates for a bacterial hydrogenlyase reaction. doi: 10.1099/mic.0.000471
 90. Laurinavichene, T., Zorin, N., Tsygankov, A., 2002. Effect of redox potential on activity of hydrogenase 1 and hydrogenase 2 in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 178, 437–442. doi: 10.1007/s00203-002-0471-x
 91. Leonhartsberger, S., Korsa, I., Bö, A., n.d. The Molecular Biology of Formate Metabolism in Enterobacteria.
 92. Li, C., Lesnik, K.L., Liu, H., 2013. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies* 6, 4739–4768. doi: 10.3390/en6094739
 93. Li, Y., Hu, Y., Zhang, X., Xu, H., Lescop, E., Xia, B., Jin, C., 2007. Conformational fluctuations coupled to the thiol-disulfide transfer between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 282, 11078–83. doi:10.1074/jbc.M700970200
 94. Lindenstrauß, U., Skorupa, P., McDowall, J.S., Sargent, F., Pinske, C., 2017. The dual-function chaperone HycH improves assembly of the formate hydrogenlyase complex. *Biochem. J.* 474, 2937–2950. doi:10.1042/BCJ20170431
 95. Liu, Y., Zhang, Y.-G., Zhang, R.-B., Zhang, F., Zhu, J., 2011. Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium acidipropionici*. *Curr. Microbiol.* 62, 152–158. doi: 10.1007/s00284-010-9683-5
 96. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–75.
 97. Lu, P., Lill, H., Bald, D., 2014. ATP synthase in mycobacteria: Special features and implications for a function as drug target. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 1208–1218. doi: 10.1016/J.BBABIO.2014.01.022
 98. Lukey, M.J., Parkin, A., Roessler, M.M., Murphy, B.J., Harmer, J., Palmer, T., Sargent, F., Armstrong, F.A., 2010. How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J. Biol. Chem.* 285, 3928–3938. doi: 10.1074/jbc.M109.067751
 99. Maeda, T., Sanchez-Torres, V., Wood, T.K., 2012. Hydrogen production by

- recombinant *Escherichia coli* strains. Microb. Biotechnol. 5, 214–25. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00282.x
100. Marchesini, N., Docampo, R., 2002. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol. Biochem. Parasitol. 119, 225–36.
 101. Margaryan A., Shahinyan G., Hovhannisyan P., Panosyan H., Birkeland NK., Trchounian A., 2018. *Geobacillus* and *Anoxybacillus* spp. from terrestrial geothermal springs worldwide: Diversity and biotechnological applications, in: Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Diversity and applications, Microorganisms for Sustainability 8, Springer Nature Singapore Pte Ltd., pp.119-166, doi: 10.1007/978-981-13-0329-6_5
 102. Martinez, A., Rodríguez-Alegría, M.E., Fernandes, M.C., Gosset, G., Vargas-Tah, A., 2017. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for lactic acid production from renewable resources, in: Engineering of microorganisms for the production of chemicals and biofuels from renewable resources. Springer International Publishing, Cham, pp. 125–145. doi: 10.1007/978-3-319-51729-2_5
 103. Mazumdar, S., Clomburg, J.M., Gonzalez, R., 2010. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4327–36. doi:10.1128/AEM.00664-10
 104. McCarty, R.E., 2005. ATP synthase of chloroplast thylakoid membranes: a more in depth characterization of its ATPase activity. J. Bioenerg. Biomembr. 37, 289–299. doi:10.1007/s10863-005-8640-7
 105. McGuire, C., Cotter, K., Stransky, L., Forgac, M., 2016. Regulation of V-ATPase assembly and function of V-ATPases in tumor cell invasiveness. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1857, 1213–1218. doi:10.1016/J.BBABIO.2016.02.010
 106. Minamino, T., González-Pedrajo, B., Kihara, M., Namba, K., Macnab, R.M., 2003. The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. J. Bacteriol. 185, 3983–8. doi:10.1128/JB.185.13.3983-3988.2003
 107. Mitchell, P., 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1807, 1507–1538. doi: 10.1016/J.BBABIO.2011.09.018
 108. Mitchell, P., Moyle, J., 1968. Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 4, 530–539. doi:10.1111/j.1432-1033.1968.tb00245.x

109. Mnatsakanyan, N., Bagramyan, K., Trchounian, A., 2004. Hydrogenase 3 but not hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate. *Cell Biochem. Biophys.* 41, 357–66. doi: 10.1385/CBB:41:3:357
110. Momirlan, M., Veziroglu, T.N., 2005. The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 795–802. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2004.10.011
111. Morales-Ríos, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., García-Trejo, J.J., Walker, J.E., 2015. Structure of a catalytic dimer of the α - and β -subunits of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans* at 2.3 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 71, 1309–1317. doi: 10.1107/S2053230X15016076
112. Mulder, D.W., Shepard, E.M., Meuser, J.E., Joshi, N., King, P.W., Posewitz, M.C., Broderick, J.B., Peters, J.W., 2011. Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. *Structure* 19, 1038–1052. doi: 10.1016/J.STR.2011.06.008
113. Muller, V., 2008. Bacterial Fermentation, in: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2
114. Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S.S., Gonzalez, R., 2008. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1124–1135. doi: 10.1128/AEM.02192-07
115. Nakamoto, R.K., Baylis Scanlon, J.A., Al-Shawi, M.K., 2008. The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 43–50. doi: 10.1016/j.abb.2008.05.004
116. Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., Futai, M., 2016. ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 129–140. doi: 10.1016/J.BBABIO.2015.11.005
117. Nelson, N., 1992. The vacuolar H⁺-ATPase -one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. exp. Biol* 172, 19–27.
118. Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2013. Index, in: *Bioenergetics*. pp. 407–419. doi: 10.1016/B978-0-12-388425-1.00026-9
119. Noji, H., Ueno, H., McMillan, D.G.G., 2017. Catalytic robustness and torque generation of the F1-ATPase. *Biophys. Rev.* 9, 103. doi: 10.1007/S12551-017-0262-

120. Nwachukwu, R.E.S., Shahbazi, A., Wang, L., Worku, M., Ibrahim, S., Schimmel, K., 2013. Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by *Enterobacter aerogenes* S012. *AMB Express* 3, 12. doi: 10.1186/2191-0855-3-12
121. Oberfeld, B., Brunner, J., Dimroth, P., 2006. Phospholipids occupy the internal lumen of the c ring of the ATP synthase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 45, 1841–1851. doi: 10.1021/bi052304+
122. Ogata, H., Lubitz, W., Higuchi, Y., 2016. Structure and function of [NiFe] hydrogenases. *J. Biochem.* 160, 251–258. doi: 10.1093/jb/mvw048
123. Okuno, D., Iino, R., Noji, H., 2011. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *J. Biochem.* 149, 655–664. doi: 10.1093/jb/mvr049
124. Panosyan, H., Di Donato, P., Poli, A., Nicolaus, B., 2018. Production and characterization of exopolysaccharides by *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 and *Geobacillus toebii* ArzA-8 strains isolated from an Armenian geothermal spring. *Extremophiles* 22, 725–737. doi: 10.1007/s00792-018-1032-9
125. Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E., Böck, A., 2002. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J. Biol. Chem.* 277, 49945–49951. doi: 10.1074/jbc.M204601200
126. Penniston, J., Gueguim Kana, E.B., 2018. Impact of medium pH regulation on biohydrogen production in dark fermentation process using suspended and immobilized microbial cells. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 32, 204–212. doi: 10.1080/13102818.2017.1408430
127. Peters, J.W., Schut, G.J., Boyd, E.S., Mulder, D.W., Shepard, E.M., King, P.W., Adams, M.W.W., 2015. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 1350–1369. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2014.11.021
128. Petkun, S., Shi, R., Li, Y., Asinas, A., Munger, C., Zhang, L., Waclawek, M., Soboh, B., Sawers, R.G., Cygler, M., 2011. Structure of hydrogenase maturation protein HypF with reaction intermediates shows two active sites. *Structure* 19, 1773–1783. doi: 10.1016/J.STR.2011.09.023
129. Pinske, C., Jaroschinsky, M., Linek, S., Kelly, C.L., Sargent, F., Sawers, R.G., 2015. Physiology and bioenergetics of [NiFe]-hydrogenase 2-catalyzed H₂-consuming and H₂-producing reactions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 197, 296–306. doi: 10.1128/JB.02335-14

130. Pinske, C., Sargent, F., 2016. Exploring the directionality of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase: a membrane-bound enzyme capable of fixing carbon dioxide to organic acid. *Microbiologyopen* 5, 721–737. doi: 10.1002/mbo3.365
131. Pinske, C., Sawers, R.G., 2016. Anaerobic formate and hydrogen metabolism. *EcoSal Plus* 7. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0011-2016
132. Pogoryelov, D., Klyszejko, A.L., Krasnoselska, G.O., Heller, E.-M., Leone, V., Langer, J.D., Vonck, J., Müller, D.J., Faraldo-Gómez, J.D., Meier, T., 2012. Engineering rotor ring stoichiometries in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E1599–608. doi: 10.1073/pnas.1120027109
133. Poladyan, A., Avagyan, A., Vassilian, A., Trchounian, A., 2013. Oxidative and reductive routes of glycerol and glucose fermentation by *Escherichia coli* batch cultures and their regulation by oxidizing and reducing reagents at different pHs. *Curr. Microbiol.* 66, 49–55. doi: 10.1007/s00284-012-0240-2
134. Poladyan, A., Trchounian, K., Sawers, R.G., Trchounian, A., 2013. Hydrogen-oxidizing hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli* regulate the onset of hydrogen evolution and ATPase activity, respectively, during glucose fermentation at alkaline pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 143–148. doi:10.1111/1574-6968.12281
135. Preiss, L., Langer, J.D., Hicks, D.B., Liu, J., Yildiz, O., Krulwich, T.A., Meier, T., 2014. The c-ring ion binding site of the ATP synthase from *Bacillus pseudofirmus* OF4 is adapted to alkaliphilic lifestyle. *Mol. Microbiol.* 92, 973–84. doi:10.1111/mmi.12605
136. Reenstra, W.W., Forte, J.G., 1990. Characterization of K⁺ and Cl⁻ conductances in apical membrane vesicles from stimulated rabbit oxyntic cells. *Am. J. Physiol.* 259, G850–8. doi:10.1152/ajpgi.1990.259.5.G850
137. Richard, D.J., Sargent, F., Sawers, G., McWalter, L., Boxer, D.H., 1999. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiology* 145, 2903–2912. doi:10.1099/00221287-145-10-2903
138. Ritz, D., Beckwith, J., 2001. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 21–48. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.21
139. Sakaki, N., Shimo-Kon, R., Adachi, K., Itoh, H., Furuie, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr., 2005. One rotary mechanism for F1-ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar. *Biophys. J.* 88, 2047–56. doi:10.1529/biophysj.104.054668
140. Samul, D., Leja, K., Grajek, W., 2014. Impurities of crude glycerol and their effect on

- metabolite production. *Ann. Microbiol.* 64, 891–898. doi:10.1007/s13213-013-0767-x
141. Sanchez-Torres, V., Mohd Yusoff, M.Z., Nakano, C., Maeda, T., Ogawa, H.I., Wood, T.K., 2013. Influence of *Escherichia coli* hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 3905–3912. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2013.01.031
 142. Sargent, F., 2016. The Model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* 68, 433–507. doi: 10.1016/bs.ampbs.2016.02.008
 143. Sawers, G., 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 57–88.
 144. Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E., Bock, A., 1991. Expression and operon structure of the sel genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J. Bacteriol.* 173, 4983–4993. doi: 10.1128/jb.173.16.4983-4993.1991
 145. Sawers, R.G., 2005. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 33, 42–46. doi: 10.1042/BST0330042
 146. Self, W.T., Hasona, A., Shanmugam, K.T., 2004. Expression and regulation of a silent operon, hyf, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 580–7. doi: 10.1128/JB.186.2.580-587.2004
 147. Shomura, Y., Higuchi, Y., 2012. Structural basis for the reaction mechanism of S - carbamoylation of HypE by HypF in the maturation of [NiFe]-hydrogenases. *J. Biol. Chem.* 287, 28409–28419. doi: 10.1074/jbc.M112.387134
 148. Sielaff, H., Duncan, T.M., Börsch, M., 2018. The regulatory subunit ϵ in *Escherichia coli* FoF1-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1859, 775–788. doi: 10.1016/J.BBABIO.2018.06.013
 149. Skibinski, D.A.G., Golby, P., Chang, Y.-S., Sargent, F., Hoffman, R., Harper, R., Guest, J.R., Attwood, M.M., Berks, B.C., Andrews, S.C., 2002. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *J. Bacteriol.* 184, 6642–53. doi: 10.1128/JB.184.23.6642-6653.2002
 150. Skulachev, V.P., Bogachev, A. V., Kasparinsky, F.O., 2013. Principles of Bioenergetics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-33430-6
 151. Sobti, M., Smits, C., Wong, A.S., Ishmukhametov, R., Stock, D., Sandin, S., Stewart, A.G., 2016. Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three

rotational states. Elife 5. doi:10.7554/eLife.21598

152. Spetzler, D., Ishmukhametov, R., Hornung, T., Day, L.J., Martin, J., Frasch, W.D., 2009. Single molecule measurements of F₁-ATPase reveal an interdependence between the power stroke and the dwell duration. Biochemistry 48, 7979–85. doi:10.1021/bi9008215
153. Stewart, A.G., Sobti, M., Harvey, R.P., Stock, D., 2013. Rotary ATPases: models, machine elements and technical specifications. Bioarchitecture 3, 2–12. doi:10.4161/bioa.23301
154. Swinnen, S., Klein, M., Carrillo, M., McInnes, J., Nguyen, H.T.T., Nevoigt, E., 2013. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. Biotechnol. Biofuels 6, 157. doi: 10.1186/1754-6834-6-157
155. Taussky, H.H., Shorr, E., 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphate. J of Biol. Chem., 202, 675-685.
156. Thapa, L.P., Lee, S.J., Yang, X.G., Yoo, H.Y., Kim, S.B., Park, C., Kim, S.W., 2014. Co-fermentation of carbon sources by *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007 to enhance the production of bioethanol. Bioprocess Biosyst. Eng. 37, 1073–1084. doi: 10.1007/s00449-013-1079-z
157. Toei, M., Noji, H., 2013. Single-molecule analysis of F₀F₁-ATP synthase inhibited by N,N-Dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem. 288, 25717–25726. doi: 10.1074/jbc.M113.482455
158. Tominaga, T., Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., Miki, K., 2012. Structure of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypF from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 68, 1153–7. doi: 10.1107/S1744309112036421
159. Trchounian, A., 2015. Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photo-fermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol. 35, 103–113. doi:10.3109/07388551.2013.809047
160. Trchounian, A., 2004. *Escherichia coli* proton-translocating FoF₁-ATP synthase and its association with solute secondary transporters and/or enzymes of anaerobic oxidation–reduction under fermentation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 315, 1051–1057. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.005
161. Trchounian, A., 1997. Ion exchange in facultative anaerobes: does a proton-

- potassium pump exist in anaerobic *Escherichia Coli*? *Anaerobe* 3, 355–371. doi: 10.1006/anae.1997.0122
162. Trchounian, A.A., Vassilian, A. V., 1994. Relationship between the FoF₁-ATPase and the K⁺-transport system within the membrane of anaerobically grown *Escherichia coli*. N,N-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase activity in mutants with defects in K⁺-transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 563–571. doi: 10.1007/BF00762741
 163. Trchounian, A., Bagramyan, K., Poladian, A., 1997. Formate hydrogenlyase is needed for proton-potassium exchange through the F₀F₁-ATPase and the TrkA system in anaerobically grown and glycolysing *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 35, 201–6.
 164. Trchounian, A., Gary Sawers, R., 2014. Novel insights into the bioenergetics of mixed-acid fermentation: Can hydrogen and proton cycles combine to help maintain a proton motive force? *IUBMB Life* 66, 1–7. doi: 10.1002/iub.1236
 165. Trchounian, A., Ohanjanyan, Y., Bagramyan, K., Vardanian, V., Zakharyan, E., Vassilian, A., Davtian, M., 1998. Relationship of the *Escherichia coli* TrkA system of potassium ion uptake with the F₀F₁-ATPase under growth conditions without anaerobic or aerobic respiration. *Biosci. Rep.* 18, 143–54. doi: 10.1023/A:1020144628839
 166. Trchounian, K., Pinske, C., Sawers, R.G., Trchounian, A., 2011. Dependence on the F₀F₁-ATP synthase for the activities of the hydrogen-oxidizing hydrogenases 1 and 2 during glucose and glycerol fermentation at high and low pH in *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 645–650. doi: 10.1007/s10863-011-9397-9
 167. Trchounian, K., Poladyan, A., Trchounian, A., 2009. Relation of potassium uptake to proton transport and activity of hydrogenases in *Escherichia coli* grown at low pH. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 3, 144–150. doi: 10.1134/S1990747809020068
 168. Trchounian, K., Poladyan, A., Vassilian, A., Trchounian, A., 2012. Multiple and reversible hydrogenases for hydrogen production by *Escherichia coli*: dependence on fermentation substrate, pH and the F₀F₁-ATPase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 236–249. doi: 10.3109/10409238.2012.655375
 169. Trchounian, K., Sargsyan, H., Trchounian, A., 2015. H₂ production by *Escherichia coli* batch cultures during utilization of acetate and mixture of glycerol and acetate. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 12187–12192. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.07.057
 170. Trchounian, K., Sargsyan, H., Trchounian, A., 2014. Hydrogen production by

- Escherichia coli* depends on glucose concentration and its combination with glycerol at different pHs. Int. J. Hydrogen Energy 39, 6419–6423. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.050
171. Trchounian, K., Trchounian, A., 2014. Hydrogen producing activity by *Escherichia coli* hydrogenase 4 (hyf) depends on glucose concentration. Int. J. Hydrogen Energy 39, 16914–16918. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.059
 172. Trchounian, K., Trchounian, A., 2013. *Escherichia coli* hydrogenase 4 (hyf) and hydrogenase 2 (hyb) contribution in H₂ production during mixed carbon (glucose and glycerol) fermentation at pH 7.5 and pH 5.5. Int. J. Hydrogen Energy 38, 3921–3929. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.01.138
 173. Trchounian, K., Trchounian, A., 2009. Hydrogenase 2 is most and hydrogenase 1 is less responsible for H₂ production by *Escherichia coli* under glycerol fermentation at neutral and slightly alkaline pH. Int. J. Hydrogen Energy 34, 8839–8845. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.08.056
 174. Ueoka-Nakanishi, H., Nakanishi, Y., Konno, H., Motohashi, K., Bald, D., Hisabori, T., 2004. Inverse regulation of rotation of F₁-ATPase by the mutation at the regulatory region on the γ subunit of chloroplast ATP synthase. J. Biol. Chem. 279, 16272–16277. doi: 10.1074/jbc.M400607200
 175. Volbeda, A., Amara, P., Iannello, M., De Lacey, A.L., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J.C., 2013. Structural foundations for the O₂ resistance of *Desulfomicrobium baculatum* [NiFeSe]-hydrogenase. Chem. Commun. 49, 7061. doi: 10.1039/c3cc43619e
 176. Volker, M. and L.-M., 2001. Bacterial fermentation. Encycl. Life Sci. 1–7. doi: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2
 177. Wakai, S., Masanari, M., Ikeda, T., Yamaguchi, N., Ueshima, S., Watanabe, K., Nishihara, H., Sambongi, Y., 2013. Oxidative phosphorylation in a thermophilic, facultative chemoautotroph, *Hydrogenophilus thermoluteolus*, living prevalently in geothermal niches. Environ. Microbiol. Rep. 5, 235–242. doi:10.1111/1758-2229.12005
 178. Wang, Q., Cen, Z., Zhao, J., 2015. The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: An Angle of Omics. Physiology 30, 97–106. doi: 10.1152/physiol.00066.2013
 179. Watanabe, R., Minagawa, Y., Noji, H., 2014. Thermodynamic analysis of F₁-ATPase rotary catalysis using high-speed imaging. Protein Sci. 23, 1773–9. doi:

180. Williams, N., 1994. The mitochondrial ATP synthase of *Trypanosoma brucei*: Structure and regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 173–178. doi: 10.1007/BF00763066
181. Williams, R.J.P., 1978. The history and the hypotheses concerning ATP-formation by energised protons. *FEBS Lett.* 85, 9–19. doi: 10.1016/0014-5793(78)81238-1
182. Wulff, P., Thomas, C., Sargent, F., Armstrong, F.A., 2016. How the oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase depends on quaternary structure. *J. Biol. Inorg. Chem.* 21, 121–34. doi: 10.1007/s00775-015-1327-6
183. Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K., Itoh, H., 2001. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature* 410, 898–904. doi: 10.1038/35073513
184. Zakharyan, E., Trchounian, A., 2001. K⁺ influx by Kup in *Escherichia coli* is accompanied by a decrease in H⁺ efflux. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 61–4.
185. Zhong, X., Guidotti, G., 1999. A yeast Golgi E-type ATPase with an unusual membrane topology. *J. Biol. Chem.* 274, 32704–11. doi:10.1074/JBC.274.46.32704