

**ՀՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ**

**«ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՊԱԿ**

**ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ԲԱՂԻՇ ԱՇՈՏԻ**

**ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ  
5-ԱՄԻՆԱԼ ԵՎՈՒԼ ԻՆԱՊՏԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

**ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅՈՒՆ**

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի համար

Գիտական ղեկավար՝  
ան.գ.թ. Վ.Բ. Գոգինյան

Երևան - 2018

**ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ**

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ .....	5
ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ .....	13
1.1. Ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների տարածվածությունը .....	13

1.2. <i>Rhodobacter</i> -ի կարգաբանական դիրքը .....	15
1.3. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ընդհանուր բնութագիրը և ֆիզիոլոգիան .....	16
1.4. Աճը և սպարոթման տակ անաերոբ պայմաններում .....	21
1.5. Աճը մթոնթյան մեջ անաերոբ և անաերոբ պայմաններում .....	22
1.6. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ֆոտոսինթետիկ ապարատի բնութագիրը .....	24
1.7. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ածխածնային նյութափոխանակությունը .....	27
1.7.1. Յետերոտրոֆ նյութափոխանակություն .....	27
1.7.2. CO <sub>2</sub> -ի ավտոտրոֆ ֆիքսումը .....	28
1.8. Ծիրանագույն ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի առանձնահատկությունները .....	29
1.8.1. Ածխածնի և ազոտի աղբյուրներ .....	34
1.8.2. 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի միջանկյալ միացություններ .....	35
1.8.3. Լույսի ինտենսիվության, օդի հոսքի, pH-ի, վիտամինների և այլ գործոնների ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա ..	36
1.8.4. 5-ԱԼԹ-ի կիրառությունը բժշկության, գյուղատնտեսության և այլ բնագավառներում .....	38
1.9. Հայ գիտնականների ներդրումը ֆոտոսինթեզող բակտերիաների ուսումնասիրման գործում .....	41
ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ, ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ .....	43
2.1. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրությունը .....	43
2.2. Մուտագենեզ և 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ շտամների ընտրություն ...	45
2.3. 5-ԱԼԹ-ի որոշումը կոլլտուրալ հեղուկում նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով .....	47
2.4. Կոլլտուրալ հեղուկում 5-ԱԼԹ-ի քանակի որոշումը՝ բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով	48
2.5. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կոլլտիվացումը կենսաառեակտորի մեջ .....	49

2.6. 5-ԱԼԹ-ի, լևուլի նաթթվի, գլիցինի, գլուտամատի, մալատի և սուկցինատի քանակների որոշումը կուլտուրալ հեղուկներում՝ գազ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով .....	51
2.7. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների 16S ռՌՆԹ գեների ամպլիֆիկացում պոլիմերազի շղթայական ռեակցիայով և 16S ռՌՆԹ գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզ .....	52
ԳԼՈՒԽ 3. ԾԻՐԱՆԱԳՈՒՅՆ ՈՉ ԾՃՄԲԱՅԻՆ ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԱՅԴ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ 5-ԱԼԹ ԱՐՏԱԴՐԻՉ ՅԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ .....	56
3.1. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճը և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը Օրմերոդի սենդամիջավայրում .....	56
3.2. Բակտերիաների աճը ածխածնի տարբեր աղբյուրներ պարունակող սենդամիջավայրերում .....	59
ԳԼՈՒԽ 4. ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՍՈՒՏԱԳԵՆԵՉ ԵՎ 5-ԱԼԹ-Ի ԼԱԿԱԳՈՒՅՆ ԱՐՏԱԴՐԻՉ ՇՏԱՄԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆ .....	62
ԳԼՈՒԽ 5. ԾԻՐԱՆԱԳՈՒՅՆ ՈՉ ԾՃՄԲԱՅԻՆ ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՍՈՒՏԿՈՒԼ ԱՅԻՆ-ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄ .....	66
ԳԼՈՒԽ 6. 5-ԱԼԹ-Ի ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄԱԼ ԱՑՈՒՄ .....	73
6.1. E-10 շտամի աճի և 5-ԱԼԹ-ի ելքի գնահատումը լուսավորության, մթնոլորտի, միկրոատերոբ և աերոբ պայմաններում .....	73
6.2. Լույսի ինտենսիվության, ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունները 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա .....	78
6.3. Մալատի կոնցենտրացիայի ազդեցությունը բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա .....	81
6.4. Գլիցինի, սուկցինատի, լևուլի նաթթվի և գլուտամատի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի և բակտերիաների աճի վրա	
83	
6.4.1. Կենսազանգվածի և 5-ԱԼԹ-ի ելքերը՝ կախված գլուտամատի կոնցենտրացիայից .....	87
6.4.2. GM արհեստական սենդամիջավայրի մեջ միկրոատերոբ և լուսավորության պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ	

հանդիսացող E-10 շտամի կողմից սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի արտադրական ծախսի հաշվարկ .....	91
6.5. E-10 շտամի կուլտիվացումը կենսառեակտորների մեջ՝ մթնոլթյան և լուսավորության պայմաններում .....	94
6.5.1. E-10 շտամի կուլտիվացումը կենսառեակտորի մեջ՝ միկրոաերոբ և լուսավորության պայմաններում .....	99
ԵՃՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ .....	101
ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ .....	103
ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ .....	120
<i>Հավելված 1</i> .....	121
<i>Հավելված 2</i> .....	123

## ՆԵՐԱՃՈՒԹՅՈՒՆ

### Արեւախոսության թեմայի արդիականությունը

5-ամինալ կոլլինաթթուն ( $\delta$ -ամինալ կոլլինաթթուն,  $C_5H_9NO_3$ ) օրգանական թթուն է: Այն էնդոգեն միացությունն է, որը հանդիսանում է պորֆիրինի կենսաբանական նախորդը՝ բուլյսերի և կենդանիների օրգանիզմներում:

Հայտնի են 5-ամինալ կոլլինաթթվի (5-ԱԼԹ) կենսասինթեզի երկու եղանակներ: Ֆոտոսինթեզ չիրականացնող օրգանիզմների մոտ (կենդանիներ, սնկեր, պարզագույն միաբջջ օրգանիզմներ) 5-ԱԼԹ-ն առաջանում է գլիցինից և սուկցինիլ-CoA-ից՝ պիրիդոքսալ ֆոսֆատկախ 5-ամինալ կոլլինատ սինթետազ ֆերմենտի ազդեցությամբ: Այս ռեակցիան հայտնի է Շեմինի ուղի անվանումով [186]:

Բուլյսերի, ջրիմուռների, բակտերիաների (բացի  $\alpha$ -պրոտեոբակտերիաներից) և արխեաների մոտ 5-ԱԼԹ-ն առաջանում է գլուտամինաթթվից՝ միջանկյալ գլուտամիլ-փոՆԹ-ի և գլուտամատ-1-կիսաալդեհիդի միջոցով: Սինթեզին մասնակցում են գլուտամիլ-փոՆԹ-սինթետազ և գլուտամատ-1-կիսաալդեհիդ ամինատրանսֆերազ ֆերմենտները: Ռեակցիաները հայտնի են  $C_5$ -ուղի, կամ Բիլի ուղի անվանումով [29]:

5-ԱԼԹ-ն ունի կիրառման լայն հեռանկարներ, որով էլ պայմանավորված է աշխարհի մի շարք երկրներում արտահայտված հետաքրքրությունը վերջինիս նկատմամբ: Այսպես օրինակ, 5-ԱԼԹ-ն առաջարկվել է կիրառել որպես բուլյսերի աճի խթանիչ և հերբիցիդ միջոց [6]: Բացի այդ, 5-ԱԼԹ-ն օժտված է ուռուցքային բջիջներում կուտակվելու ընդունակությամբ և տեսանելի լույսով ճառագայթման դեպքում փոխարկվում է պրոտոպորֆիրին IX-ի, որը լուսազգայուն միացությունն է: Այդ պատճառով 5-ԱԼԹ-ն առաջարկվել է կիրառել տարբեր տեղակայման չարորակ նորագոյացությունների, ինչպես նաև ոչ ուռուցքային բնույթի մաշկային հիվանդությունների ֆոտոախտորոշման և ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար [128]:

Հատուկ հետաքրքրություն է ներկայացնում 5-ԱԼԹ-ինդուկցված ֆլուորեսցենցիայի օգտագործման հնարավորությունը չարորակ ուռուցքային պրոցեսի տեղային տարածվածության ախտորոշման համար, ինչպես նաև սպեցիֆիկ բուժման արդյունավետության հետազոտության սկզբնական տեսանկյունից:

Հայտնի են այս միացության ստացման մի շարք սինթետիկ մեթոդներ: Հաշվի առնելով ևս և լինաթթվի մատչելիությունը՝ առավել հաճախորդես 5-ԱԼԹ-ի քիմիական սինթեզի ելանյութ հանդես է գալիս 5-բրոմլևուլինաթթվի եթերը: Չնայած բրոմտեղակալված միացությունների ստացման դժվարություններին, այս մեթոդը մինչ այժմ չի կորցրել իր արդիականությունը և նույնիսկ ստացել է հետազոտարգանքում [177, 178]:

5-ԱԼԹ-ի ստացման կենսաբանական եղանակը հանդիսանում է այլընտրանքային, քանի որ այն, համեմատած քիմիական սինթեզի հետ, քիչ ծախսատար է և տնտեսապես արդյունավետ: Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների որոշ ցեղեր, մասնավորապես *Rhodobacter (Rba.)*, *Rhodopseudomonas (Rps.)*, *Rhodospirillum (Rsp.)*, ինչպես նաև մի շարք այլ մանրէներ, ընդունակ են կուտակել և տնտեսական տեսանկյունից շահավետ քանակներով սննդամիջավայրի մեջ արտազատել 5-ԱԼԹ:

Ներկայումս 5-ԱԼԹ-ի արդյունավետ արտադրիչներից մեկը համարվում է *Rba.sphaeroides* տեսակը, որի մոտ նպատակային նյութի կենսասինթեզի ելքը կազմում է 33.8 մգ/լ -ից մինչև 260 մգ/լ [151]:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների հանդեպ հատուկ հետաքրքրությունը պայմանավորված է դրանց լայն նյութափոխանակային հնարավորություններով: *Rhodospirillaceae* ընտանիքի ներկայացուցիչներն ընդունակ են հինգ տարբեր տեսակի ածխ. (I) արևային լույսի էներգիայի հաշվին ֆոտոլիտոավտոտրոֆ ած` որպես էլեկտրոնների դոնոր օգտագործվում է  $H_2$ , որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր և ածխածնի աղբյուր`  $CO_2$ , (II) անաերոբ պայմաններում ֆոտոհետերոտրոֆ ած` որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր օգտագործվում են տարբեր օրգանական միացություններ, (III) մթության մեջ անաերոբ ած` որպես էլեկտրոնների դոնոր և էներգիայի միակ աղբյուր օգտագործվում են տարբեր շաքարներ, (IV)

մթուղյան մեջ աերոբ քեմոպոտոտրոֆ աճ՝ որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր կիրառվում է  $O_2$ -ը [103]: Այդ պատճառով ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ներկայացուցիչները կիրառվում են որպես մոդելային օբյեկտներ՝ ֆոտոսինթեզի, մեմբրանների բիոգենեզի,  $CO_2$ -ի և  $N_2$ -ի ֆիքսման մի շարք հիմնարար պրոցեսների ուսումնասիրության համար:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների լայն նյութափոխանակային հնարավորությունները թույլ են տալիս գենետիկական վերահսկողության մակարդակով հետազոտել այդ պրոցեսների փոխազդեցություններն այն դեպքում, երբ այլ կենսաբանական համակարգերում դրանք տարանջատված են: Դրա հետ միաժամանակ, ծիրանագույն ֆոտոսինթեզող բակտերիաների հսկայական կենսաբանական բազմազանությունը թույլ է տալիս իրականացնել ցանկալի հատկություններով օժտված ակտիվ շտամ-արտադրիչների նպատակային լայն ընտրություն, ինչպես նաև իրականացնել տարբեր գեն-ինժեներային միջամտություններ՝ դրանց արտադրական ցուցանիշների բարձրացման նպատակով:

Ելնելով վերը շարադրվածից՝ խնդիր է դրվել ուսումնասիրել 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ:

### **Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները**

Հետազոտությունն ուղղված է ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կողմից 5-ամինալևուլինաթթվի կենսասինթեզի ուսումնասիրմանը: Այդ նպատակով ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսաառեխնոլոգիա» գիտաարտադրական կենտրոնի (ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսաառեխնոլոգիա» ԳԱԿ) այլ ընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի մանրէների հավաքածուից ընտրվել են *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* և *Rhodospirillum* ցեղերին պատկանող չորս ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներ, կատարվել է դրանց ուսումնասիրում և բնութագրում՝ որպես 5-ԱԼԹ-ի հեռանկարային շտամ-արտադրիչներ:

Նպատակն իրագործելու համար առաջադրվել և լուծվել են հետևյալ խնդիրները.

- *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* և *Rhodospirillum* ցեղերի ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաներից 5-ԱԼԹ-ի արտենցիալ շտամ-արտադրիչների ընտրություն և համեմատական բնութագրում:
- Ժամանակակից մոլեկուլային գենետիկական մեթոդների կիրառմամբ 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող շտամների նույնականացում:
- 5-ԱԼԹ-ի ելքի բարձրացման նպատակով ընտրված բակտերիաների ինդուկցված քիմիական մուտագենեզի իրականացում և առավել ակտիվ մուտանտների մեկուսացում:
- Ընտրված մուտանտ շտամի մոտ կենսազանգվածի առաջացման և 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի վրա սենդամիջավայրի տարբեր բաղադրիչների ու կենսասինթեզի առանցքային գործոնների (ջերմաստիճան, լուսավորության ռեժիմ, pH) ազդեցության ուսումնասիրում: 5-ԱԼԹ-ի ելքի օպտիմալացում՝ լաբորատոր պայմաններում և կենսաառեակտորում:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը**

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ *Rhodobacter (Rba.) azotoformans* ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիան ընդունակ է սինթեզել ու 5-ԱԼԹ: Բարձր ելքով 5-ԱԼԹ-ի ստացման նպատակով ուսումնասիրվել և օպտիմալացվել են 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի պայմանները:

Մասնավորապես,

1. 16S ռԲՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծության հիման վրա իրականացվել է 5-ԱԼԹ սինթեզող՝ հավաքածուում որպես «*Rba. capsulatus*» ավանդադրված շտամի մոլեկուլային-գենետիկական նույնականացում, որի արդյունքում այն վերադասակարգվել է որպես *Rba. azotoformans*:
2. Առաջին անգամ ինդուկցված մուտացիաների արդյունքում ստացվել է *Rba. azotoformans*-ի՝ 5-ԱԼԹ-ի բարձրարդյունավետ արտադրիչ հանդիսացող E-10 շտամը:
3. Պարզվել է որոշ հավելումների (գլիցին, գլուտամատ, մալատ, սուկցինատ, լևուլինաթթու) և շրջապատող միջավայրի



գործոնների (ջերմաստիճան, լուսավորություն, pH) ազդեցությունը տարբեր սննդամիջավայրերում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի ելքի վրա:

4. Առաջին անգամ ցույց է տրվել մանրէաբանական ճանապարհով ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կողմից 5-ԱԼԹ-ի ստացման տնտեսական արդյունավետությունը:

### **Աշխատանքի գործնական նշանակությունը**

1. Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս իրականացնել ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների՝ որպես 5-ԱԼԹ-ի հեռանկարային շտամ-արտադրիչների նպատակային ընտրություն:
2. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների տարբեր տեսակների մոտ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի օրինաչափությունները կարող են օգտագործվել նշված բակտերիաների արդյունաբերական կուլտիվացման՝ 5-ԱԼԹ և մի շարք այլ կենսաբանորեն ակտիվ միացություններ ստանալու նպատակով գիտական հիմքերի մշակման համար:
3. Հետազոտությունների արդյունքները կարող են գործնականում հիմք հանդիսանալ մանրէաբանական ճանապարհով 5-ԱԼԹ-ի արտադրության համար:
4. Աշխատանքի ընթացքում *Rba. azotoformans*-ի ֆիլոգենետիկ առանձնահատկությունների վերաբերյալ ստացված նոր տվյալները կարող են վկայել ազոտային և ածխածնային նյութափոխանակային ուղիների գենետիկական մակարդակով փոխկապակցվածության մասին, ինչը նորովի է լուսաբանում ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ նշված հիմնարար կենսաբանական պրոցեսների համակարգման խնդիրը:

### **Պատասխանների կայացվող հիմնական դրույթները**

1. ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի այլ ընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի կուլտուրաների հավաքածուում ընդգրկված *Rhodobacteraceae* ընտանիքին պատկանող *Rba. capsulatus* MDC 6508 շտամը, համաձայն 16S ռՌՆԹ

գենի սեքվենավորման տվյալների և ֆիլոգենետիկ անալիզի, նույնականացվել է որպես *Rba. azotoformans*:

2. *Rba. azotoformans* (նախկին նույնականացված որպես *Rba. capsulatus* MDC 6508), *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505 և *Rps. palustris* MDC 6506 վայրի շտամները Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում կուլտիվացման ստանդարտ պայմաններում սինթեզում են 5-ԱԼԹ-ի ոչ էական քանակներ, մինչդեռ *Rba. azotoformans*-ի E-10 մուտանտը, որը ստացվել է ինդուկցված մուտացիաների եղանակով, հանդիսանում է 5-ԱԼԹ-ի բարձր ակտիվությամբ արտադրիչ:
3. Շրջապատող միջավայրի գործոնները (pH, լուսավորություն, ջերմաստիճան), ինչպես նաև սննդամիջավայրի որոշ բաղադրիչները (գլիցին, գլուտամատ, մալատ, սուկցինատ, լևուլինաթթու), կախված կոնցենտրացիայից, ազդում են հեղուկ սննդամիջավայրերում 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի վրա:
4. *Rba. azotoformans*-ի E-10 մուտանտ շտամի անընդհատ կուլտիվացման պայմաններում հեղուկ սննդամիջավայրում գլիցինի, սուկցինատի, լևուլինաթթվի և գլուտամատի օպտիմալ կոնցենտրացիաները նպաստում են 5-ԱԼԹ-ի առավելագույն ելքին:
5. Հեղուկ սննդամիջավայրում մալատի՝ որպես ածխածնի հիմնական աղբյուրի ավելացումը զգալիորեն բարձրացնում է 5-ԱԼԹ-ի ելքը:
6. Մանրէաբանական ճանապարհով 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի տնտեսական շահավետությունը:

### **Ատենախոսական աշխատանքի կապր գիտական թեմաների հետ**

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսաառեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում, «Հետազոտություններ կենսաառեխնոլոգիայի և մանրէաբանության բնագավառներում» բազային ծրագրի՝ «Ֆոտոսինթեզող մանրէների կենսաբանական առանձնահատկությունների ուսումնասիրումը և դրանց հեռանկարային կիրառումը կենսաառեխնոլոգիայում» աշխատանքի, ինչպես նաև ՀՀ ԿԳՆ ԳՊԿ-ի №16A-1f37 ծածկագրով «Ֆոտոսինթեզող

բակտերիաների

միջոցով

5-ամիսալևուլի նախաքվի կենսասինթեզի առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունը» գիտական նախագծի և HORIZON 2020 ծրագրի Մարիա Սկլարովսկայա Կյուրի դրամաշնորհի Phoenix նախագծի միջոցներով (դրամաշնորհ՝ 690925-Phoenix, MSCA): Ատենախոսական աշխատանքի արդյունքները մասնակիորեն ներկայացվել են նշված ծրագրերի ընթացիկ և տարեկան հաշվետվություններում:

**Աշխատանքի իրականացման վայրը**

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսաառեխնուկագիտական» ԳԱԿ-ի այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների և աբորատորիայում, Չագրեբի համալսարանի սենդի տեխնոլոգիայի և կենսաառեխնուկագիտականի ֆակուլտետի կենսաքիմիական ճարտարագիտության ամբիոնի կենսաքիմիական ճարտարագիտության և արդյունաբերական մանրէաբանությունը և աբորատորիայում (Խորվաթիա): 16S ռՌՆԹ-ի գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության վերծանումը իրականացվել է «Macrogen» ընկերության (Հարավային Կորեա) կողմից:

**Ատենախոսի անձնական ներդրումը**

Բաղիշ Աշոտի Հարությունյանը, գիտական ղեկավար ան.գ.թ. Վ.Բ. Գոգինյանի գլխավորությամբ իրականացրել է հետազոտությունների խնդրի ձևակերպումը, հետազոտությունների ուղղությունների ընտրությունը, նպատակների և առաջադրանքների որոշումը, փորձարարական մոտեցումների մշակումն ու արդյունքների վերլուծությունը:

Հետազոտության բոլոր փուլերում հայցորդն ունեցել է իր անձնական մասնակցությունը:

Համահեղինակությամբ իրականացված աշխատանքներում հայցորդը մասնակցել է փորձարարական աշխատանքների իրականացմանը, ստացված արդյունքների ամփոփմանը և մեկնաբանմանը, գիտական հոդվածների պատրաստմանը, ինչպես նաև հանդես է եկել գիտական գեկոլյցով:

### **Ատենախոսական աշխատանքի ասորոբացիան**

Յետազոտող թյան արդյունքները ներկայացվել են «Կենսաառեխնոլոգիա. գիտություն և արակտիկա» երիտասարդ գիտնականների 4-րդ միջազգային գիտաժողովում (Յայաստան, Երևան, 2017) և զեկուցվել են ՅՅ ԳԱԱ «Յայկենսաառեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում:

### **Յրատրակված աշխատություններ**

Ատենախոսող թյան հիմնադրույթներն ու արդյունքներն ամփոփված են 8 գիտական աշխատություններում՝ 6 հոդվածներում և միջազգային գիտաժողովի 2 թեզիսներում:

### **Աշխատանքի կառուցվածք և ծավալ**

Ատենախոսական աշխատանքը շարադրված է համակարգչային շարվածքով՝ 126 էջի վրա և ներառում է 44 նկար և 15 աղյուսակ:

Ատենախոսող ունը կազմված է հետույալ բաժիններից՝ «Բովանդակություն», «Ներածություն», «Գրական ակնարկ», «Նյութեր և մեթոդներ», «Փորձարարական մաս», «Եզրակացություններ», 194 հղում պարունակող «Գրականության ցանկ», «Յապավումների ցանկ» և երկու հավելվածներ:

## **ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ**

Տարբեր օրգանիզմների մոտ ֆոտոսինթեզի պրոցեսի ուսումնասիրումն արձանագրել է նշանակալի հաջողություններ: Հատկապես վերջին տարիներին, բարձրակարգ բույսերի և ջրիմուռների հետ մեկտեղ, ուսումնասիրման մշտական օբյեկտներ են դարձել ֆոտոսինթեզող բակտերիաները:

Ֆոտոսինթեզի համեմատումը տարբեր կարգաբանական դիրք գբադեցնող օրգանիզմների մոտ թույլ է տալիս սահմանել այդ պրոցեսի հիմնական, ընդհանուր օրինաչափությունները և բացահայտել էվոլյուցիայի իրականացման ուղղությունը:

Ներկայումս գոյություն ունեցող ֆոտոսինթեզող ձևերի մեջ ամենապարզունակները համարվում են ֆոտոսինթեզող բակտերիաները: Ուստի նրանց ուսումնասիրությունը հատկապես կարևոր է ֆոտոսինթեզի և այլ կենսաքիմիական պրոցեսների հետ այս օրգանիզմների կապը հասկանալու համար:

Բացի այդ, ի տարբերություն բույսերի, ֆոտոսինթեզող բակտերիաների հետ աշխատելը մեթոդաբանական տեսանկյունից ունի որոշակի առավելություններ, քանի որ այս դեպքում ֆոտոսինթեզը չի ուղեկցվում միաժամանակ տեղի ունեցող շնչառությամբ:

Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների հետազոտումը կարևոր է, քանի որ կապված է մոլեկուլյար ազոտի ֆիքսման, միկրոօրգանիզմների կողմից ծծմբի միացությունների օգտագործման և բնության մեջ նրա շրջապատում խնդրի հետ [10]:

### **1.1. Ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների տարածվածությունը**

Ֆոտոսինթեզող բակտերիաները հիմնականում համարվում են ջրային օրգանիզմներ: Օրգանական նյութեր պարունակող ջրամբարներում, հատկապես այնտեղ, որտեղ ինտենսիվ կերպով տեղի են ունենում նեխման պրոցեսներ, ծիրանագույն ծծմբային բակտերիաների հետ մեկտեղ հանդիպում են նաև ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների տարբեր տեսակներ [37]: Այդ միկրոօրգանիզմները քիչ քանակով պարունակվում են նաև տարբեր

հողերում, որոնց ջրածածկման դեպքում նրանք սկսում են արագ  
 գարգանալ [38]: նրանց քանակությունը հատկապես շատ է  
 արհեստական լճակներում, ջրանցքներում և այլ ջրամբարներում,  
 որտեղ թափվում են օրգանական մնացորդներ պարունակող  
 կեղտաջրերը [179]:



**ա**



**բ**



**գ**



**դ**

**Նկար 1. Ֆոտոսինթեզող մանրէների տարածվածությունը  
Հայաստանի ջրային պլազաններում  
(ա– Հանքավանի, բ – Արզականի, գ – Արզնիի, դ – Ջերմուկի հանքային  
աղբյուրներ)**

Կոլիկոզը ցույց է տվել, որ ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաները կարող են մեծ քանակությամբ պարունակվել որոշ լճերի խորություններում, որտեղ կա թթվածին և առաջացնել վարդագույն շերտ, մինչդեռ ծիրանագույն ծծմբային բակտերիաները զարգանում են ջրի շերտերի ստորին մասերում, որտեղ չկա թթվածին [46] (նկար 1):

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների (*Rhodopseudomonas*) կուտակումները դիտվել են նաև Մլետկղզու վրագտնվող լճում՝ 20 մ խորության վրա [48]:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաները հայտնաբերվել են ոչ միայն քաղցրահամ ջրամբարներում, այլ նաև աղի ջրերում: 1994թ.-ին վան Նիլը 30 % աղեր պարունակող ջրից անջատել է *Rhodospirillum* տեսակը [179]:

Սովորաբար ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներն աճում են ոչ շատ խորություններում, որտեղ թափանցում է լույսը: Այս ուսումնասիրություններով, ըստ էության, սպառվում են բնության մեջ ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների տարածվածության և աճի պայմանների մասին տեղեկությունները: Այս բակտերիաների վերաբերյալ տվյալներն անհամեմատավելի քիչ են, քան ծիրանագույն ծծմբային բակտերիաներինը, չնայած լաբորատոր պայմաններում *Athiorhodaceae*-ներն ավելի լավ են ուսումնասիրված, քան մնացած ֆոտոսինթեզող բակտերիաները:

**1.2. Rhodobacter-ի կարգաբանական դիրքը**

Ժամանակակից դասակարգման համաձայն, *Bacteria* դոմենը բաժանվում է մի քանի բաժինների: Ֆոտոսինթեզող ներկայացուցիչներն առկա են նրանցից մի քանիսում: Ծիրանագույն և աերոբ բակտերիոքլորոֆիլ *a* առաջացնող ֆոտոսինթեզող բակտերիաներն ընդգրկված են *Proteobacteria* ֆիլումում (<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>):

Անօքսիդեն ֆոտոսինթեզ իրականացնող ծիրանագույն բակտերիաներն՝ ըստիրենց ծծմբաջրածին օքսիդացնելու և ծծումբ

կուտակելու ընդունակության, ստորաբաժանված են եղել «ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներ»-ի և «ծիրանագույն ծծմբային բակտերիաներ»-ի:

Յետագայում ծիրանագույն բակտերիաները ստորաբաժանվել են երեք ընտանիքների՝ *Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae* և *Ectothiorhodospiraceae*: Բոլոր ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներն ընդգրկվում են առաջին ընտանիքի մեջ:

*Proteobacteria* բաժինը ստորաբաժանվում է 7 դասերի՝ *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Oligoflexia* և *Zetaproteobacteria*: Ուսումնասիրված ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների մեծամասնությունը ներառված է *Alphaproteobacteria* դասի մեջ՝ կարգ *Rhizobiales* (ընտանիքներ *Bradyrhizobiaceae* և *Rhodobiaceae*), կարգ *Rhodobacterales* (ընտանիք *Rhodobacteraceae*), կարգ *Rhodospirillales* (ընտանիք *Rhodospirillaceae*) և միայն ներկայացուցիչների մի մասն են դասվում *Betaproteobacteria*-ին՝ կարգ *Burkholderiales* և կարգ *Rhodocyclales* (ընտանիք *Rhodocyclaceae*):

Ծիրանագույն ծծմբային բակտերիաների ներկայացուցիչները ներառված են *Gammaproteobacteria* դասի մեջ: Սույն դասակարգմանը համապատասխան, *Rhodobacter (Rba.) azotoformans* տեսակի կարգաբանական դիրքը հետևյալն է. թագավորություն *Bacteria*, բաժին *Proteobacteria*, դաս *Alphaproteobacteria*, կարգ *Rhodobacterales*, ընտանիք *Rhodobacteraceae*, ցեղ *Rhodobacter*, տեսակներ *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulatus* և այլն:

### **1.3. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ընդհանուր բնութագիրը և ֆիզիոլոգիան**

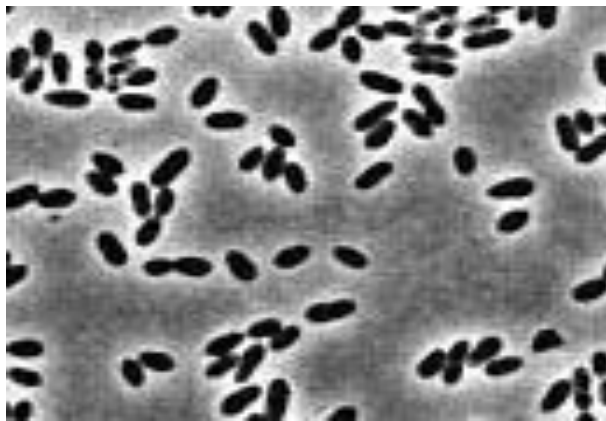
Ծիրանագույն բակտերիաների ներկայացուցիչները միաբջջ գրամբացասական օրգանիզմներ են, որոնց երկարությունը 1,0-20 մկմ, իսկ լայնությունը՝ 0,3-6,0 մկմ է: Նրանց բազմացման հիմնական ձևը բինար բաժանումն է, իսկ որոշ տեսակներ բազմանում են բողբոջմամբ:

*Rhodobacter* ցեղի ներկայացուցիչներին բնորոշ են 0,5-1,2 մկմ տրամագծով ձվաձև կամ ձողաձև բջիջները: Նրանց մեջ հանդիպում

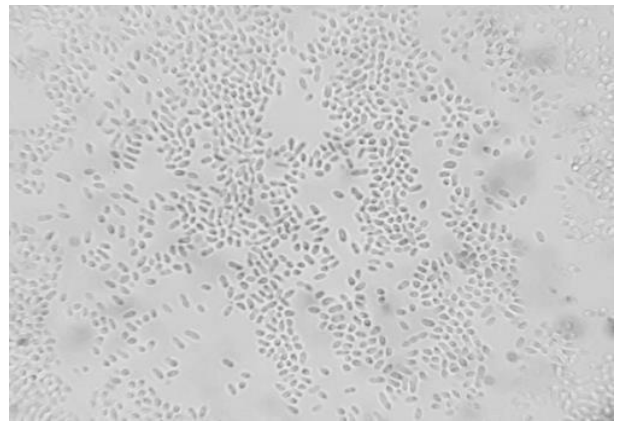


են ինչպես շարժուն (*Rba. azotoformans*, *Rba. capsulatus*, *Rba. sphaeroides*), այնպես էլ անշարժ ձևեր:

Շարժուն ձևերն ունեն բևեռային մտրակներ: Տվյալ ցեղի բակտերիաները կարող են առաջացնել պարկուճներ և լորձ: *Rhodobacter* ցեղի որոշ տեսակների բջիջները բաժանումից հետո կարող են իրարից չհեռանալ՝ առաջացնելով բջիջների շղթաներ կամ ագրեգատներ, որոնք միավորված են շրջապատող միջավայր արտազատված լորձով [11]: Որպես կանոն, սա նկատվում է աճի անբարենպաստ գործոնների ազդեցության պայմաններում (միջավայրի pH, բջիջների լուսավորման ավելցուկ, միջավայրում օրգանական թթուների բարձր կոնցենտրացիաների առկայություն և այլն) (նկար 2, 3, 4):



ա

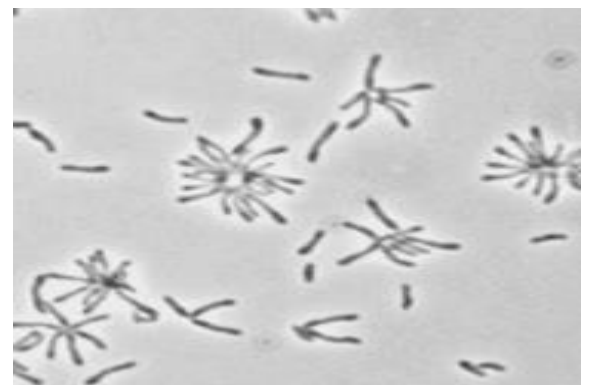


բ

**Նկար 2. *Rba. sphaeroides* (ա) և *Rba. azotoformans* (բ) տեսակների ն պարկանող ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մորֆոլոգիան (մանրադիտակային խոշորացում՝ (ա) x 1500, (բ) x 1000)**



ա



բ

**Նկար 3. *Rsp. rubrum* (ա) և *Rps. palustris* (բ) տեսակների ն պարկանող ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մորֆոլոգիան**

(մանրադիտակայ ին խոշորացում՝ x 1500)



ա



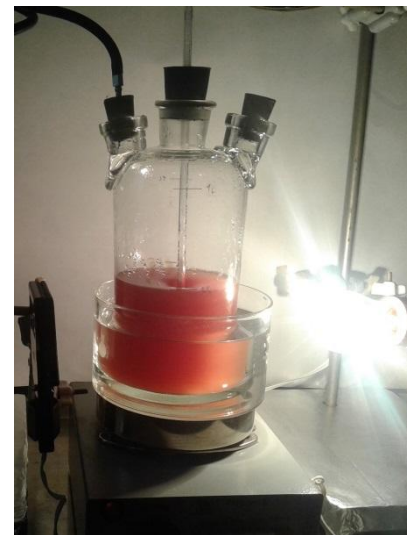
բ



գ



դ



ե

**Նկար 4. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթետիկ բակտերիաների աճը տարբեր սննդամիջավայրերում (ա, դ, ե – հեղուկ սննդամիջավայր; բ, գ – սինդ սննդամիջավայրեր)**

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների մեծամասնության աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը  $30-32^{\circ}\text{C}$  է: Բացառությամբ են կազմում տաք աղբյուրներից և  $40-50^{\circ}\text{C}$  օպտիմալ ջերմաստիճան ունեցող [5, 166, 140], ինչպես նաև հարավաբևեռային միկրոբային շերտերից անջատված տեսակները, որոնց աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը  $18^{\circ}\text{C}$  է [159]: *Rhodobacter* ցեղի ներկայացուցիչների աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը  $25-35^{\circ}\text{C}$  է [11] (աղյուսակ 1, 2):

**Աղյուսակ 1**

***Rba. sphaeroides* և *Rba. azotoformans* տեսակներին պատկանող ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկությունները (ըստԲերգիի, 1997թ.)**

Հատկանիշները	<i>Rba. sphaeroides</i>	<i>Rba. azotoformans</i>
Բջջի ձևերի ձևը	օվալ աձև	կլորավուն
Չափերը	1.2-1.4 x 1.9-2.3	1.1-1.2 x 1.5-1.8
Բազմացումը	կիսման ճանապարհով	
Մտրակները	բևեռային դասավորված մտրակներ	
Լորձի առաջացումը	առատ լորձարտադրողությամբ	առատ, չկա
Ֆոտոսինթետիկ ապարատը	վեգիկոլլյար տիպի	
Աճի ջերմաստիճանը	28 - 32°C	28 - 35°C
Աճի pH-ը	6.8 – 7.0	5.8 -10.0
NaCl-ի պահանջը	հալոտոլերանտ, 3 %	հալոտոլերանտ, 1.5-2 %
Վիտամինների պահանջը	թիամին, բիոտին, նիկոտինաթթու	թիամին, բիոտին
Կարոտինոիդային խումբը	II խումբ (գնդաձև)	
Աերոբ աճը	աճում են մթնոլորտային մեջ՝ աերոբ պայմաններում	
Սուլֆիդների օքսիդացումը	օքսիդացնում են քիչ քանակով սուլֆիդներ	
Էլեկտրոնի դոնորները	օրգանական թթուներ, շաքարներ	
NaNO <sub>3</sub> -ի յուրացումը	ասիմիլացնում են նիտրատները	
N <sub>2</sub> -ի ֆիքսումը	ֆիքսում են N <sub>2</sub> -ը	

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների մեծամասնությունը ունի աճի օպտիմում չեզոք pH-ի միջակայքում՝ 6.8-7.2: Միայն 3 միկրոօրգանիզմներ, որոնք պատկանում են ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների 2 ցեղերին, ունեն աճի օպտիմում pH-ի ցածր արժեքներում: *Rhodoblastus acidophilus*-ի

(նախկինում *Rhodopseudomonas acidophila*) pH-ի օպտիմումը 5.8 միավոր է, *Rhodoblastus sphagnolica*-ը՝ մոտ 5.2-5.5 [88, 109]:

*Rhodopila globiformis*-ի pH-ի օպտիմումը 4.8-5.6 արժեքների միջակայքում է և կախված է ածխածնի սուլբատրատից [130, 101]: Միջակայրի pH-ի միջակայքը, որի դեպքում պահպանվում է *Rba. capsulatus*-ի աճի առավելագույն արագությունը, կազմում է 6.6-7.6 միավոր [20]:

**Աղյուսակ 2**  
***Rsp. rubrum* և *Rps. palustris* տեսակներին պարլանոդ ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կենսաբանական ստանձնահատկությունները (ըստԲերգհի, 1997թ.)**

Չափանիշները	<i>Rsp. rubrum</i>	<i>Rps. palustris</i>
Բջջի ձևերի ձևը	պարուրած և	ցուլի կաձև
Չափերը	1.6-2.3 x 8.0-10.0 մկմ	0.5-0.7 x 2.4-4.2 մկմ
Բազմացումը	կիսման ճանապարհով	բևեռային աճ և բողբոջում
Մտրակները	բևեռային դասավորված մտրակներ	
Լորձի առաջացումը	լորձ չի առաջացնում	առաջացնում է լորձ
Ֆոտոսինթետիկ ապարատը	վեզիկուլյար տիպի	լամելյար տիպի
Աճի ջերմաստիճանը	28-35°C	30-32°C
Աճի pH-ը	6.8-7.2	6.8-7.5
NaCl-ի պահանջը	NaCl-ի կարիք չունեն	
Վիտամինների պահանջը	բիոտին	ո-ամինաբենզոգոաթթու
Կարոտինոիդային խումբը	Ի խումբ (սպիրիլլոքսանտին)	
Աերոբ աճը	աճում են աերոբ մթնոլայան մեջ	
Սուլֆիդների օքսիդացումը	սուլֆիդներ չի օքսիդացնում	օքսիդացնում է քիչ քանակով սուլֆիդներ
Էլեկտրոնի դոնորները	S <sub>2</sub> , Էթանոլ, օրգանական թթուներ	օրգանական թթուներ, շաքարներ, թիոսուլֆատ
NaNO <sub>3</sub> -ի յուրացումը	նիտրատ չի	ասիմիլացնում է

	յ ու ը ր ա ճ ն ու մ	ն ի տր ա տ
N <sub>2</sub> -ի \$ի ք ս ու մ ը	\$ի ք ս ու մ ե ն N <sub>2</sub>	

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաները նախընտրում են օրգանական նյութերով հարուստ ջրեր և ճահճային հողեր՝ հազվադեպ առաջացնելով ջրին գուևավորում տվող կուտակումներ: Նրանք երբեմն զարգանում են ծովի ջրերի ափերին: Մի շարք ներկայացուցիչներ աճում են մինչև 20 % աղի պարունակությամբ միջավայրերում, ինչպես նաև քաղցրահամ ջրերում [72], օրինակ, *Rba. capsulatus*-ի մոտ բացակայում է միջավայրում աղի առկայության պահանջարկը [11]:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներն ունեն լայն նյութափոխանակային հնարավորություններ. նրանք ընդունակ են աճել լուսավորության և մթության, աերոբ և անաերոբ պայմաններում՝ իրականացնելով տարբեր էներգետիկ գործընթացներ (\$ոտոսինթեզ, աերոբ և անաերոբ շնչառություն): Նրանք կարող են հանդես գալ որպես ավտոտրոֆներ և հետերոտրոֆներ՝ իրականացնելով մոլեկուլյար ազոտի \$ի ք ս ու մ՝ ազոտի կապած ձևերի բացակայության պայմաններում:

#### 1.4. Աճը լ ու ս ա վ ո թ ու թ յ ա ն տ ա կ ան ա եր ո բ պ ա յ մ ա ն ն եր ու մ

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաները երկրորդ տիպի \$ոտոհամակարգի առկայության հաշվին ընդունակ են անօքսիդեն՝ առանց O<sub>2</sub>-ի անջատման ընթացող \$ոտոսինթեզի: Այս պրոցեսի արդյունքում տեղի է ունենում լույսի էներգիայի պահեստավորում և փոխակերպում ԱԵՖ-ի մոլեկուլի քիմիական կապի էներգիայի:

1. \$ոտոհետերոտրոֆ աճի դեպքում օրգանական միացությունները հանդիսանում են ինչպես էլեկտրոնների \$ոտոսինթետիկ փոխադրման դոնորներ, այնպես էլ ածխածնի աղբյուրներ:
2. \$ոտոավտոտրոֆ աճը հնարավոր է մոլեկուլյար ջրածնի (CO<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>→(CH<sub>2</sub>O)+H<sub>2</sub>O) [4], երբեմն էլ մետաղների՝ որպես էլեկտրոնների դոնորների կիրառման դեպքում [51]:

3. Ֆոտոավտոտրոֆ աճը հնարավոր է սուլֆիդի քիչ կոնցենտրացիաների առկայության դեպքում: *Rba. azotoformans*-ը, *Rba. sphaeroides*-ը, *Rsp. rubrum*-ն օգտագործում են սուլֆիդ, որն օքսիդանում է մինչև մոլեկուլյար ծծմբի, որի հայտնվելը միջավայրում համարվում է այդ տեսակի բակտերիաների մոտ սուլֆիդի օքսիդացման եզրափակիչ փուլ [62, 63]: Չարկ է նաև նշել, որ տվյալ բակտերիան ընդունակությունն չունի օքսիդացնել թիոսուլֆատը մինչև սուլֆատի [11]:

*Rba. sulfidophilus*-ի, *Rps. palustris*-ի և *Rps. sulfoviridis*-ի մոտ սուլֆիդն օքսիդանում է մինչև սուլֆատի՝ առանց էլեմենտար ծծմբի՝ որպես միջանկյալ պրոդուկտի առաջացման [63, 113]:

Բացի այդ, արտաքային էլեմենտար ծծումբը կարող է համարվել թիոսուլֆատի օքսիդացման միջանկյալ պրոդուկտ, ինչպես դանկատվում է *Rba. veldkampii*-ի, *Rba. adriaticus*-ի մոտ [62, 113, 36; 59]:

### **1.5. Աճը մթնոլորտային մեջ աերոբ և անաերոբ պայմաններում**

Ծիրանագույն բակտերիաների մոտ մթնոլորտային պայմաններում գլխավոր էներգետիկ պրոցես է համարվում մոլեկուլյար թթվածնի առկայությամբ աերոբ շնչառությունը [8]: Որպես օքսիդացվող սուբստրատներ և ածխածնի հիմնական աղբյուրներ օգտագործվում են օրգանական նյութերը: Օրգանական միացությունների օքսիդացումը բակտերիաներին թույլ է տալիս սինթեզել ԱԵՖ՝ մեմբրանային ֆոսֆորիլացման արդյունքում, որը կապված է էլեկտրոն-փոխադրող համակարգի գործունեության հետ [190]:

Աերոբ մթնոլորտային պայմաններում աճի ընթացքում ծիրանագույն բակտերիաների կողմից որոշ օրգանական նյութերի օքսիդացման ժամանակ կարող է տեղի ունենալ սուբստրատային ֆոսֆորիլացում, բայց նրա դերն այդպիսի պայմաններում սովորաբար նկատելիորեն ավելի քիչ է, քան խմորման ժամանակ:

1) Աճն անաերոբ պայմաններում:

Առանձին շաքարների կամ պիրոխաղողաթվի խմորման պրոցեսի հաշվին (որը կապված է էլեկտրոնփոխադրող ֆոսֆորիլացման հետ), ապահովվում է էներգիայի ստացումը սուբստրատային

Ֆոսֆորիլացման ժամանակ: Սակայն խմորման արդյունքում աճը նշանակալի դանդաղ է և ուղեկցվում է ոչ մեծ քանակությամբ կենսազանգվածի առաջացմամբ [102, 162]:

Ացետատ, սուկցինատ և որոշ այլ օրգանական միացություններ պարունակող և խմորման չենթարկվող միջավայրերում աճը հնարավոր է անաերոբ շնչառության ժամանակ այդ սուբստրատների օքսիդացման դեպքում, երբ  $O_2$ -ի փոխարեն օգտագործվում են էլեկտրոնների՝ անօրգանական կամ օրգանական այլ ակցեպտորներ [190]:

Որպես էլեկտրոնների ակցեպտորներ կարող են ծառայել տրիմեթիլ-N-օքսիդը կամ դիմեթիլսուլֆօքսիդը, նիտրատը (այդ դեպքում պրոցեսն անվանում են նիտրատային շնչառություն) և  $CO_2$ -ը: Նիտրատային շնչառություն կարող են իրականացնել որոշ շտամներ, ընդ որում նրանք ընդունակ չեն նիտրատներն օգտագործել որպես ազոտի աղբյուր: *Rba. azotoformans*, *Rba. capsulatus* շտամները, վերականգնելով նիտրատները մինչև  $N_2$ , միաժամանակ կարող են այն ֆիքսել և այդիպով ապահովել իրենց պահանջմունքն ազոտի նկատմամբ [50]:

2) Աճը միկրոատրոբ պայմաններում:

*Rba. azotoformans*-ը, *Rba. capsulatus*-ը և *Rba. sphaeroides*-ն ընդունակ են ֆոտոսինթեզից անցնել մթնոլորտի մեջ՝ աճի քեմոլիտոպոտրոֆ պայմաններում օքսիդացնելով մոլեկուլյար ջրածինը՝ գազային ֆազում մոլեկուլյար թթվածնի ոչ մեծ քանակների (10-15 %-ից ոչ ավելի) դեպքում [103]:

Միևնույն ժամանակ, միջավայրում նկատվում է աննշան քանակությամբ թթվածին, ինչը կապված է այն բանի հետ, որ թթվածինն արգելակում է մոլեկուլյար ջրածնի օքսիդացումը կատալիզող հիդրոգենազի, ինչպես նաև ռիբուլոզոբիֆոսֆատկարբոքսիլազի ակտիվությունն ու սինթեզը [164]:

Հաստատվել է, որ ծիրանագույն ծծմբային և ոչ ծծմբային բակտերիաներն առաջացնում են սուլֆերօքսիդոհիսմոլտազ և կատալազ ֆերմենտներ, որոնք կարևոր դեր են խաղում մոլեկուլյար

թթվածնի առկայությունը առաջացող նյութերի թունավոր ազդեցությունն իջեցնելու պաշտպանման գործում [9]:

### 1.6. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ֆոտոսինթետիկ ապարատի բնութագիրը

Ֆոտոսինթետիկ լուսային փուլի կարևոր մասը տեղի է ունենում ռեակցիոն կենտրոններում (ՌԿ), որտեղ լիցքերի բաժանման պրոցեսում ճառագայթման էներգիան փոխակերպվում է քիմիականի: Լիցքերի բաժանումն իրականանում է ՌԿ-ում էներգիայի որոշակի քվանտի կլանման ժամանակ՝ բակտերիոթլորոֆիլի գրգռման արդյունքում: Պրոցեսի արդյունավետության բարձրացումն ապահովում են լրացուցիչ կառուցվածքները՝ լուսաալեհավաքները (պիգմենտ-սպիտակուլոցային կոմպլեքսները), որոնք, իլեկտրոն տարբերակիչների երկարության ֆոտոնները, ուղղորդում են գրգռման էներգիան ՌԿ-ում:

Ծիրանագույն բակտերիաների ֆոտոսինթետիկ ապարատը տեղադրված է տարբեր ձևեր (վեզիկուլներ կամ խողովակներ) ունեցող ներցիտոպլազմատիկ մեմբրաններում, ինչը համարվում է կարգաբանական հատկանիշ: Ֆոտոսինթետիկ ապարատը կազմված է ՌԿ-ից, երկու տեսակի լուսաալեհավաքներից և էլեկտրոնների փոխադրիչներից, որոնք առաջացնում են ֆոտոսինթետիկ էլեկտրոնփոխադրիչ շղթա: ՌԿ-ների մոտակայքում տեղադրված է LH1 ալեհավաքը, որը ՌԿ-ների շուրջն առաջացնում է բաց օղակ [49]: Ծայրերում տեղադրված են LH2 ծայրային ալեհավաքները:

Ներկայումս ծիրանագույն բակտերիաների ներկայացուցիչների մոտ հայտնաբերվել են 3 տիպի ֆոտոսինթետիկ ապարատներ [44]: *Rba. sphaeroides*-ի ՌԿ-ն երկու ՌԿ-LH1-ից կազմված դիմեր է, որի մոնոմերներից յուրաքանչյուրը պարունակում է PufX սպիտակուլոց [135]: PufX սպիտակուլոցի առկայությունն անհրաժեշտ է ակտիվ դիմերային կոմպլեքսի հավաքման համար. մուտանտների մոտ նրա կոդավորող գենի դելեցիայից ձևավորվում է փակ LH1-օղակ, ինչպես նաև ՌԿ-LH1 կոմպլեքս՝ մոնոմերի տեսքով: Նկարագրված մուտանտները զրկված են ֆոտոսինթետիկ աճ իրականացնելու ընդունակությունից [139]: Հեղինակները ենթադրում են, որ LH1



օղակում անցքերն անհրաժեշտ են ուբիլիկոնի ներթափանցման համար, որն ապահովում է ռեակցիոն կենտրոնի և ցիտոքրոմ *bc1*-կոմպլեքսի միջև կապը:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային *Rps. palustris* բակտերիայի մոտ ՌԿ-ը մոնոմեր ՌԿ-LH1-ի ձևով է և պարունակում է W սպիտակուլց, որը հանդիսանում է PufX սպիտակուլցի նմանօրինակը (երկրորդ տիպի \$ոտոսինթետիկ ապարատ) ՌԿ [144, 145]: Տվյալ բակտերիայի, ինչպես նաև *Rba. sphaeroides*-ի մոտ LH1 օղակը փակ է:

\$ոտոսինթետիկ ապարատի երրորդ տիպը ներկայացված է *Thermochromatium tepidum* ծիրանագույն ծծմբային բակտերիայի մոտ [120]: Նրա ՌԿ-ն ունի ՌԿ-LH1 մոնոմերի ձև և չի պարունակում W կամ PufX սպիտակուլցներին նմանօրինակ ոչ մի սպիտակուլց (սակայն LH1 օղակում առկա են անցքեր և այն փակ է):

Լուսապլեհավաքների կազմում կան կարոտինոիդների և բակտերիոքլորոֆիլի մոլեկուլներ: Ընդ որում, LH2 արտաքին կոմպլեքսներին բնորոշ են պիգմենտների կարճալիքային (800-850 նմ), իսկ LH1 արտաքին կոմպլեքսին՝ ավելի երկարալիքային ձևերը (մոտ 880 նմ):

ՌԿ-ի բակտերիոքլորոֆիլն ունի ավելի երկարալիք կլանման մաքսիմում: Նման կառուցվածքն ապահովում է \$ոտոսինթետիկ կլանումը LH2-ում և դեպի ՌԿ ուղորդված միգրացիան՝ LH1-ի միջոցով:

Ծիրանագույն բակտերիաների հիմնական \$ոտոսինթետիկ պիգմենտը՝ բակտերիոքլորոֆիլ *a*-ն է, իսկ *Blastochloris viridis*-ն ունի բակտերիոքլորոֆիլ *b* [146]: Ծիրանագույն բակտերիաների կարոտինոիդներից առավել հաճախ հանդիպում են սպիրիլլոքսանտինը, ռոդոպինը, ռոդոպինալը, սֆերոֆլեթինը և օկենոնը [31]:

Ծիրանագույն բակտերիաների ՌԿ-ները զետեղված են ցիանոբակտերիաների երկրորդ \$ոտոհամակարգի ՌԿ-ների նման, որոնցում էլեկտրոնների ակցեպտորներ են համարվում \$եոֆետինը և իփնոնները [172]:

Անօքսիգեն \$ոտոսինթետիկ պրոցեսում տեղի է ունենում էլեկտրոնների՝ լույսից կախված ցիկլիկ հոսք ՌԿ-ների և *bc1*

կոմպլեքսների միջև՝ ուլթիփիտոնների և ցիտոքրոմ c2-ի միավորումների միջոցով: Արդյունքում լուսային էներգիան պահեստավորվում է պրոտոնների տրանսմեմբրանային գրադիենտի տեսքով, որը հետագայում կարող է ԱԵՖ-սինթետազի օգնությամբ փոխակերպվել ԱԵՖ-ի:

ՆԱԴԻ/ՆԱԴՖԻ Էներգետիկ համարժեքների սինթեզն իրականանում է ԱԵՖ-ի ծախսով ուղեկցվող ԷԼ Եկտրոնների հետադարձ փոխադրման, օրգանական միացությունների օքսիդացման օգնությամբ կամ Կրեբսի ցիկլում [9]: Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների մոտ \$L\$ ավիտները \$L\$ ավիտմոնոնուկլեոտիդի և \$L\$ ավիտադենսինդինուկլեոտիդի տեսքով են: Բջջներում առկա են նաև ֆերրեդոքսիններ [28]:

Չնայած ֆոտոսինթեզի ցիկլիկ լինելուն, նրա իրականացման համար ահնրաժեշտ է ԷԼ Եկտրոնների մշտական գծային հոսք, որն ապահովվում է միջավայրում առկա ԷԼ Եկտրոնային դոնորների կողմից [66]: Որպես ԷԼ Եկտրոնների դոնորներ կարող են հանդես գալ օրգանական միացությունները, ջրածինը և ծծմբաջրածինը:

Լույսը մեծ ազդեցություն ունի ֆոտոսինթետիկ ապարատի սինթեզի վրա: Նրա ցածր ինտենսիվության դեպքում բջջում LH2-ի քանակությունն աճում է [117], ինչպես նաև ավելանում է ՌԿ-ների քանակը [61]:

*Rba. sphaeroides* մուտանտ շտամներն առանց LH2-ի ընդունակ են աճել միայն լույսի շատ բարձր ինտենսիվության դեպքում [43]: Լույսն ազդում է բակտերիոթլորոֆիլ *a*-ի սինթեզի կարգավորման վրա: Այն անհրաժեշտ է նրա սինթեզի համար, բայց լույսի բարձր ինտենսիվությունը նշանակալի ձևով ճնշում է վերջինիս սինթեզը [18]:

Վերջերս կատարված հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ծայրային լրացուցիչ ալեհավաքի սինթեզի կապն անհատական բջջի կողմից էներգիայի ստացման հետայնքան ԷԼ ակնհայտ է: Ցույց է տրվել, որ լույսի ցածր ինտենսիվության դեպքում առաջանում են ավելի շատ ներցիտոպլազմատիկ մեմբրաններ՝ LH2-ի բարձր պարունակությամբ: Բայց, սրա հետ մեկտեղ, գոյություն ունեն մեմբրանների առանձին տեղամասեր, որոնցում կամիայն LH2, բայց

չկան ՌԿ-ներ, այսինքն այս կոմպլեքսները չեն կարող փոխանցել գրգռման էներգիան՝ լիցքերի բաժանման և նյութափոխանակության մեջ հետագա օգտագործման համար [27]:

Բացի այդ, *Rba. sphaeroides*-ի մոտ լույսի բարձր և ցածր ինտենսիվությունների դեպքում սինթեզվում են LH2 տարբեր կոմպլեքսներ [187]:

Յիմնական արտաքին ազդանշանը, որը ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների մոտ առաջացնում է բակտերիոքլորոֆիլի սինթեզի ճնշում, համարվում է թթվածինը [193]:

## **1.7. Ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ածխածնային նյութափոխանակությունը**

### **1.7.1. Յետերոտրոֆ նյութափոխանակություն**

Քեմոտրոֆ, աերոբ և ֆակուլտատիվ անաերոբ բակտերիաների մեծամասնության մոտ գլիկոլիզը (Էմբդեն-Մայերգոֆ-Պառնասի ուղի) և եռկարբոնաթթուների ցիկլը (ԵԿՑ) կենտրոնական նյութափոխանակության հիմնական ուղիներն են: Առաջին երկուսը հանդիսանում են ածխաջրերի՝ մինչև ֆոսֆոենոլ պիրուվատ, խաղողոթթու և ացետիլ CoA ճեղքման հիմնական ուղիներ: Բջջն ապահովվում է բջջային բաղադրիչների սինթեզի համար անհրաժեշտ էներգիայով և ստանդարտ կառուցվածքային բլոկներով:

Ացետիլ CoA-ի միջոցով յուրացվող օրգանական թթուները և սուբստրատներն (օրինակ՝ ացետատ, ճարպաթթուներ, էթանոլ) ասիմիլացվում են ԵԿՑ-ի միջոցով: Վերջինս իրականացնում է նաև երկու ֆունկցիաներ՝ կատաբոլիզմ և անաբոլիզմ՝ կատալիզելով ացետիլ CoA-ի ամբողջական օքսիդացումը մինչև CO<sub>2</sub>, տալիս է վերականգնող համարժեքներ՝ շնչառության պրոցեսում ԱԵՖ-ի ձևավորման համար, միևնույն ժամանակ ապահովելով ՆԱԴՖԻ-ի և ածխածնային մետաբոլիտների նախորդների կենսասինթետիկ պրոցեսները:

*Rhodobacter*-ի ածխածնային սուբստրատներ են հանդիսանում գլյուկոզը, ֆրուկտոզը, սախարոզը, ռիբոզը, մաննիտը, սորբիտը, պիրոլիպտոլաթթուն, սուկցինատը, ֆումարատը, մալատը, պրոպիոնատը: Աճը հնարավոր է նաև գալակտոզի, պրոպանոլի, բայց ոչ մաննոզի,

ցիտրատի, գլյուկոնատի, գլիցերինի, էթանոլի, տարտրատի, պելարգոնատի առկայության դեպքում [184]:

*Rba. capsulatus*-ի մոտ գլյուկոզը յուրացվում է էնտերոդոմոլի [53], իսկ ֆրուկտոզը՝ էմբոն-Մայերիոֆ-Պառնասի ուղիով [53]: Այս բակտերիան ընդունակ է որպես ածխածնի միակ աղբյուր օգտագործել կարճաշղթա [53, 111, 184] և երկարաշղթա ճարպաթթուները: Ընդ որում *Rba. capsulatus*-ի ածի արագությունը հակադարձ համեմատական է որպես սուբստրատ օգտագործվող միահիմն ճարպաթթվի ածխածնային շղթայի երկարությանը: Սուբստրատի թույլատրելի կոնցենտրացիան ավելանում է ածխածնային շղթայի երկարության նվազմանը զուգահեռ [86]: Բացառություն են կազմում այնպիսի թունավոր միացությունները, ինչպիսին է, օրինակ, ֆորմիադը:

Միջավայրում երկհիմն ճարպաթթուների՝ մալատի և սուկցինատի (որոնք համարվում են ԵԿՑ-ի միջանկյալ օղակներ) առկայության դեպքում ածի արագությունն ավելի բարձր է [19], քան սցետատի առկայության պայմաններում: Ընդ որում, ցույց է տրվել, որ միջավայրում որոշ օրգանական թթուների (ացետատ, պրոպիոնատ, լակտատ, բութիրատ և իզոբութիրատ) առկայության դեպքում *Rba. capsulatus* B-10-ը բոլոր թթուներն օգտագործում է ոչ թե միաժամանակ, այլ աստիճանաբար [92, 52]:

### 1.7.2. CO<sub>2</sub>-ի ավտոտրոֆ ֆիքսումը

Ավտոտրոֆ պայմաններում ածխաթթվի յուրացման հիմնական ուղին՝ վերկանգնող պենտոզոֆոսֆատային (Կալվին-Բենսոնի ցիկլ) ցիկլն է: Այդ ցիկլում տեղի է ունենում ածխածնի երկօքսիդի ֆիքսում՝ C6 միացությունների առաջացմամբ: Այդ նյութափոխանակային ուղին իրականացնող ֆերմենտներից են ռիբուլոզոբիսֆոսֆատկարբօսիլազը, ֆոսֆոռիբուլոկինազը և սեդոհեպտուլոզոբիսֆոսֆատը [107]:

Կալվին-Բենսոն-Ռուբիսկոյի ցիկլում միայն մեկ ֆերմենտ է իրականացնում CO<sub>2</sub>-ի ֆիքսման ռեակցիան: Ներկայումս մեկրոօրգանիզմների մոտ հայտնաբերվել են ֆերմենտներ, որոնք

տարբերվում են ռուբիսկո բույսի դասական ձևերից: Առանձնացնում են ռուբիսկոյի 4 հիմնական ձևեր [168]:

Ռուբիսկո I, II և III ձևերը ցուցաբերում են կարբոքսիլազային և օքսիդենազային ակտիվություններ՝ տարբեր ֆիզիոլոգիական նպատակներով: III ձևը մտնում է առանձին խմբի մեջ, քանի որ հայտնաբերվել է միայն եզակի էվոլյուցիոն պատմություն ունեցող արխեաների մոտ: IV ձևի սպիտակուցներին են դասվում ռուբիսկոյանման սպիտակուցները, որոնք կառավարվում են ծծմբի նյութափոխանակության համար կարևոր ռեակցիաներ:

Շատ օրգանիզմներում ռուբիսկոյանման սպիտակուցների դերն անհայտ է: Կալվին-Բենսոնի ցիկլում ֆերմենտների ակտիվության մակարդակը տարբեր է բակտերիաների աճման տարբեր պայմաններում և իջնում է օրգանական սուբստրատների առկայության մեջ [10, 23]: Բայց առանձին դեպքերում, քննարկվող ցիկլում ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաներն, անկախ օրգանական միացությունների առկայությունից, ֆիքսում են զգալի քանակով ածխաթթու:

Օրինակ, 22 % ացետատային ածխածնի առկայության միջավայրում *Rps. palustris*-ի ֆոտոհետերոտրոֆ աճի դեպքում առաջանում է CO<sub>2</sub>, որի 67 %-ը ռիբուլոզոքարբոքսիլազի միջոցով ֆիքսվում է բջջանյութում [108]: Ցույց է տրվել նաև, որ *Rba. sphaeroides*-ի [183] և *Rba. capsulatus*-ի [165] մոտ ձևի ֆերմենտների մակարդակը զգալիորեն բարձրանում է ֆոտոավտոտրոֆ կամ խիստ վերականգնված սուբստրատի, ինչպիսին բութիրատն է, առկայության մեջ աճի դեպքում [183]:

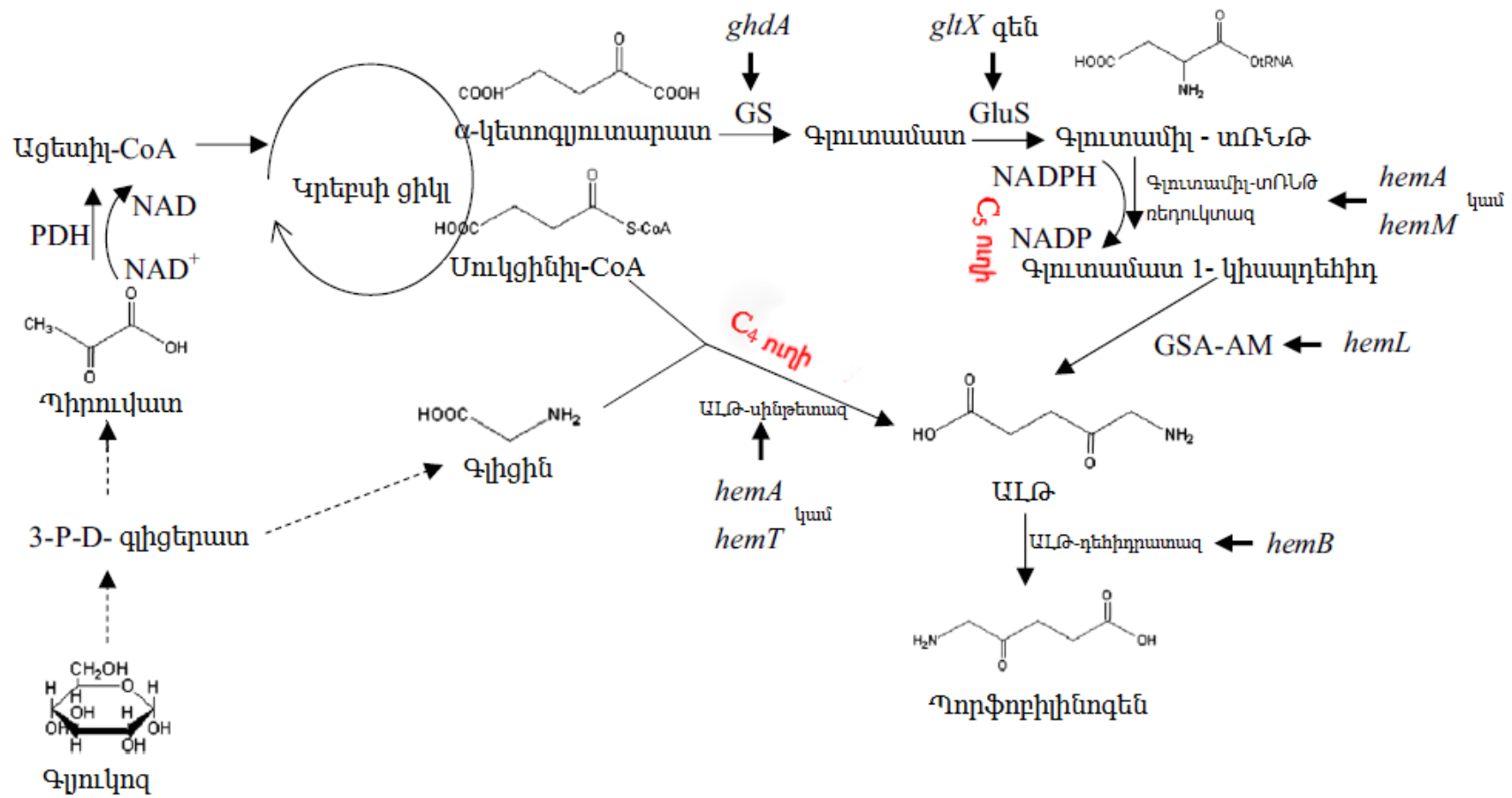
### **1.8. Ծիրանագույն ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի առանձնահատկությունները**

5-ամինալևուլինաթթուն (ձ-ամինալևուլինաթթու, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>) օրգանական թթու է: Այն էնդոգեն միացություն է, որը հանդիսանում է պրոֆիրինի կենսաբանական նախորդը՝ բույսերի և կենդանիների օրգանիզմներում:

Բնության մեջ գոյություն ունեն 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի C<sub>4</sub> և C<sub>5</sub> նյութափոխանակային ուղիներ [112] (նկար 5):

Որոշ միկրօօրգանիզմներ, ինչպես օրինակ *Euglena gracilis*-ն ունեն  $C_4$  և  $C_5$  տարբեր նյութափոխանակային ուղիներ [185]:  $C_4$  նյութափոխանակային ուղին (Շեմինսի ուղի) առաջին անգամ հայտնաբերվել է ոչ բուսական էուկարիոտ օրգանիզմներում՝ կենդանիների և սնկերի մոտ [87]: Այս նյութափոխանակային ուղին հայտնաբերվել է նաև կաթնասունների, թռչունների, խմորասնկերի, նախակենդանիների, որոշ քեմոտրոֆ օրգանիզմների, ինչպես նաև ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների՝ հատկապես *Rhodobacter* և *Rhodopseudomonas* ցեղերի բակտերիաների օրգանիզմներում: 5-ԱԼԹ-ի ձևավորումը  $C_4$  նյութափոխանակային ուղիով տեղի է ունենում 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի միջոցով, որը կատալիզում է սուկցինիլ CoA-ի և գլիցինի կոնդենսացիան:

5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտը կոդավորվում է *hemA* և *hemT* գեների կոդմից [116]: 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտը հանդիսանում է  $C_4$  նյութափոխանակային ուղու հիմնական ֆերմենտ և օժտված է ուրույն հատկանիշներով: Այն հայտնաբերել են Շեմինը [82] և Նյուբերգերը [58]: Գոյություն ունեն այս ֆերմենտի 2 ձևեր. առաջինը համարվում է հիմնական և պատասխանատու է վիտամին  $B_{12}$ -ի կենսասինթեզի համար, իսկ երկրորդը *Rba. sphaeroides*-ի օրգանիզմում կարևոր դեր է խաղում բակտերիոքլորոֆիլի կենսասինթեզի գործընթացում:



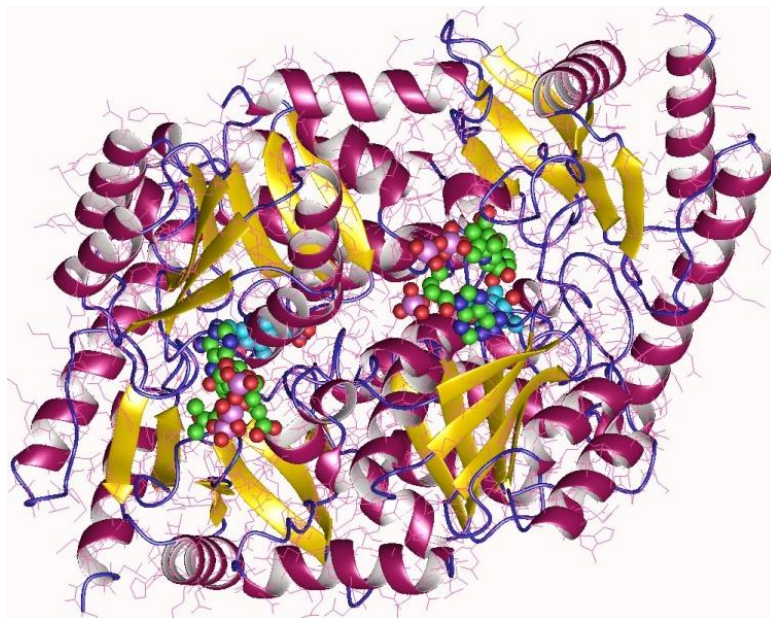
Նկար 5. 5-ՍԼԹի կենսասինթեզի C<sub>4</sub> և C<sub>5</sub> նյութափոխանակային ուղիները [99]

Մոլեկուլային մակարդակով 5-ամինալևուլինաթթու սինթետազ ֆերմենտը համարվում է պիրիդոքսալ 5-ֆոսֆատից կախված հոմոդիմեր և կազմված է 44~65 կիլոդալտոն (կԴա) մոնոմերներից: Այն պատկանում է պիրիդոքսալ 5-ֆոսֆատկախյալ  $\alpha$ -տիպի ֆերմենտների ենթախմբին [129]:

5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի հաջորդականության նմանությունը 40-80 %-ով պահպանվել է  $\alpha$ -պրոտեոբակտերիաների և մարդկանց օրգանիզմներում: Մինչդեռ մարդկանց և *Rba. capsulatus*-ի 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտների նմանությունը կազմում է 49% [26]:

5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի կենսասինթեզի համար պատասխանատու գեներ հայտնաբերվել են *Rba. capsulatus*, *Agrobacterium radiobacter*, *Rhizobium meliloti*, *Bradyzobium japonikum*, *Rba. sphaeroides* և *Paracoccus denitrificans* տեսակի միկրոօրգանիզմներում [112]:

Բացահայտվել է հոմոդիմերային 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի բյուրեղային կառուցվածքն իր կոֆակտոր՝ պիրիդոքսալ 5-ֆոսֆատի հետ կապված վիճակում: Բացահայտվել է նաև 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի կառուցվածքը գլիցինի և սուկցինիլ CoA-ի հետ կոմպլեքսում [26] □նկար 6□:



**Նկար 6. 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի բյուրեղային կառուցվածքը Protein Data Bank (PDB), 2BWO [26]**



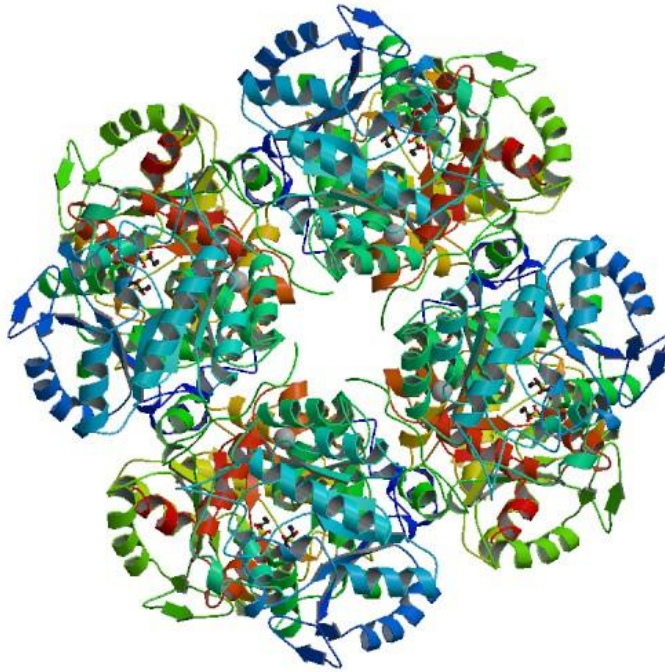
Բարձրակարգ բույսերի, ջրիմուռների, որոշ բակտերիաների՝ *Escherichia coli*-ի և *Salmonella typhimurium*-ի, ինչպես նաև կանաչ ծծմբային բակտերիաների օրգանիզմներում C<sub>5</sub> նյութափոխանակային ուղիով 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը գլուտամատ-փոխադրող ՌՆԹ-ի (գլուտամատ-փՌՆԹ) միջոցով տեղի է ունենում երեք Ֆերմենտային փուլերով [155]:

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի պրոցեսում ներգրավված 3 Ֆերմենտներ՝ գլուտամիլ փՌՆԹ սինթետազը (ԳԼՈՒՌՍ), նիկոտինամիդադենիլնուկլեոտիդֆոսֆատկախ գլուտամիլ փՌՆԹ ռեդուկտազը (ԳԼՈՒՌՌ) և գլուտամատ-1-սեմիալդեհիդրամինատրանսֆերազը (ԳՍԱ-ԱՍ), կողմորվում են, համապատասխանաբար *gltX* [67], *hemA* [160] և *hemL* [75] գեների կողմից:

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի 3 Ֆերմենտային ռեակցիաներից առաջինը գլուտամիլ փՌՆԹ-ի ձևավորումն է, որտեղ գլուտամատը ձևափոխվում է գլուտամիլ ադենիլատի, որը այնուհետև տեղափոխվում է սպեցիֆիկ փՌՆԹ-ի վրա, ձևավորելով գլուտամիլ փՌՆԹ-ն [161]: *E. coli*-ի օրգանիզմում ԳԼՈՒՌՍ-ը ուղղորդում է գլուտամիլ-փՌՆԹ-ն դեպի սպիտակուցի կամ 5-ԱԼԹ-ի սինթեզ: ԳԼՈՒՌՍ-ը, որի ակտիվություն կարգավորումը վերահսկվում է *hem* գենի կողմից, կարող է լինել կարևոր կարգավորող գործոն *hem*-ի սինթեզի համար [79]:

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի երկրորդ ռեակցիայի ընթացքում տեղի է ունենում գլուտամիլ փՌՆԹ-ի վերականգնում և խիստ ակտիվ միջանկյալ միացություն՝ գլուտամատ-1-սեմիալդեհիդի (ԳՍԱ) ձևավորում, որը կատալիզում է ԳԼՈՒՌՌ-ը: 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի երրորդ ռեակցիայի ընթացքում ԳՍԱ-ԱՍ-ի միջոցով ԳՍԱ-ն արագ վերածվում է 5-ԱԼԹ-ի:

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի C<sub>5</sub> նյութափոխանակային ուղիում ԳԼՈՒՌՍ-ը համարվում է հիմնական Ֆերմենտ, որի ակտիվություն կարգավորումն իրականացվում է հետորանսկրիպցիոն և սպիտակուցային մակարդակներում [182] □ նկար 7□:



**Նկար 7. 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ ֆերմենտի բյուրեղային կառուցվածքը Protein Data Bank (PDB) 1B4K**

C<sub>4</sub> և C<sub>5</sub> նյութափոխանակային ուղիներում *hemB* գենի կոդմից կոդավորված 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ (5-ԱԼԹ) ֆերմենտը կառավիգում է արթոթրիլիսնոգենի սինթեզը 5-ԱԼԹ-ի երկու մոլեկուլներից:

### **1.8.1. Ածխածնի և ազոտի աղբյուրներ**

Բազմաթիվ բակտերիաների օրգանիզմներում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար գլոտամատը հանդիսանում է ածխածնի և ազոտի աղբյուր, սակայն այդ միկրոօրգանիզմները կարող են սինթեզել 5-ԱԼԹ՝ օգտագործելով այլ ածխածնի աղբյուրներ [157]:

Մի շարք հետազոտություններ վկայում են այն մասին, որ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար որպես ածխածնի աղբյուր գլյուկոզի օգտագործումը գնային տեսանկյունից նպատակահարմար է [118, 119]:

*Rba. sphaeroides* տեսակը՝ որպես էլեկտրոնի դոնոր և էներգիայի աղբյուր կարող է յուրացնել քացախաթթու, պրոպիոնաթթու և բութիրաթթու [152]: *Rba. sphaeroides*-ի միջոցով 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար որպես ածխածնի աղբյուր օգտագործվում են նաև անատրոփ ֆերմենտացիայի ընթացքում արտադրված ցնդող ճարպաթթուները:

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար ցնդող ճարպաթթուների հետ մեկտեղ կուլտուրալ հեղուկին պարբերաբար ավելացվում են գլիցին և գլուտամինաթթու, որոնք հանդիսանում են ազոտի օրգանական աղբյուրներ [154]:

Ոչ ծծմբային ծիրանագույն բակտերիաների միջոցով 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի ուսումնասիրման համար որպես ածխածնի և ազոտի աղբյուր օգտագործվում են նաև տարբեր սննդային թափոններ [150]:

### **1.8.2. 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի միջանկյալ միացություններ**

Բազմաթիվ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ *Rba. sphaeroides*-ի կուլտուրալ հեղուկին 20-60 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով սուկցինատի և գլիցինի ավելացումն ունենում է դրական ազդեցություն 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա, սակայն 80 մմոլ/լ-ից բարձր կոնցենտրացիայով գլիցինի և սուկցինատի ավելացումը բերում է բացասական ազդեցության: Պարզվել է նաև, որ սուկցինատի ավելացումը կուլտուրալ հեղուկին համարվում է արդյունավետ, սակայն գլիցինի որոշակի քանակը սահմանափակում է 5-ԱԼԹ-ի սինթեզը [154]: 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի միջանկյալ միացությունների միաժամանակյա ավելացումը կուլտուրալ հեղուկի մեջ չի ազդում 5-ԱԼԹ սինթետազ և 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ ֆերմենտների ակտիվության վրա, սակայն գլիցինի ազդեցությունից դանդաղում է բակտերիաների աճը [151]:

Լևուլինաթթուն համարվում է 5-ԱԼԹ-ի համանմանը և հանդիսանում է 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ ֆերմենտի արգելակիչ, որի շնորհիվ խթանում 5-ԱԼԹ-ի արտաբջջային սինթեզը [149]: *Rba. sphaeroides*-ի ֆոտոհետերոտրոֆ աճի ժամանակ կուլտուրալ հեղուկի մեջ լևուլինաթթվի պարբերաբար ավելացումը հանգեցնում է բջիջների աճի չափավոր դանդաղեցմանը: Ի տարբերություն գլիցինի և սուկցինատի, լևուլինաթթուն համարվում է թանկարժեք քիմիական նյութ, այդ իսկ պատճառով տնտեսական տեսանկյունից նրա մեծ քանակներով օգտագործումը նպատակահարմար չէ: Բազմաթիվ հետազոտությունները վկայում են այն մասին, որ 30 մմոլ/լ լևուլինաթթվի քանակությունը համարվում է օպտիմալ, իսկ

նրա՝ 50 մմոլ/լ-ից բարձր կոնցենտրացիան ամբողջովին դադարեցնում է բջիջների աճը [149, 152]:

*Rba. sphaeroides* տեսակի մոտ տեսորապիրոլի կենսասինթեզի համար կարևոր նշանակություն ունեն մետաղի իոնները՝ հատկապես  $Fe^{2+}$ -ը և  $Co^{2+}$ -ը: 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվության կարգավորումն իոնի բավարար քանակության առկայության պայմաններում տեղի է ունենում հեմի միացության կողմից հետադարձ արգելակման կամ ճնշման միջոցով: Այդ իսկ պատճառով 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի խթանման համար սննդամիջավայրը պետք է պարունակի կոբալտ կամ երկաթ [154]:

### **1.8.3. Լույսի ինտենսիվության, օդի հոսքի, pH-ի, վիտամինների և այլ գործոնների ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի խթանման համար լույսի ինտենսիվությունը համարվում է կարևոր գործոն: Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճը 1000-5000 լյուքս լուսավորության պայմաններում տեղի է ունենում գրեթե անփոփոխ կերպով: 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը հասնում է իր առավելագույն մակարդակին 2000-3000 լյուքս լուսավորության պայմաններում: Բակտերիաների աճի, և հետևաբար, 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի համար 5000 լյուքսից բարձր և 1000 լյուքսից ցածր լուսավորությունը համարվում է ոչ արդյունավետ [149]:

Թթվածնի մուտքը կուլտուրալ հեղուկի մեջ համարվում է 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվության վրա ազդող գործոններից մեկը: Պիգմենտացիայի կորուստը պայմանավորված է 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվատորի, ցիստեինի եռսուլֆիդի և գլուտաթիոնի եռսուլֆիդի քանակների կրճատմամբ:

Չետազոտությունները ցույց են տվել, որ կուլտիվացման ատրոբ պայմանները միկրոատրոբի փոփոխելիս 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվությունը բարձրացնում է 2-4 անգամ: Լուսավորության պայմաններում թթվածնի ազդեցությունից ընկճվում է 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի կենսասինթեզը, իսկ անատրոբ պայմանների վերականգնումը դրականորեն է ազդում այդ պրոցեսի վրա [180]:

*Rba. sphaeroides* տեսակի մոտ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը ուսումնասիրվել է դրանց՝ ցնդող ճարպաթուղեր պարունակող սննդամիջավայրում աճեցնելիս: pH-ի 6.8-7.0 տիրույթում արտաքջային սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 16 մմոլ /լ :

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ սննդամիջավայրի մեջ լևուլինաթթու ավելացնելու դեպքում, pH-ի 6.8-ի արժեքում ներքջային 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվությունը նշանակալի բարձրանում է, սակայն նվազում է 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ ֆերմենտի ակտիվությունը, իսկ pH-ի 8.0 արժեքի դեպքում՝ դիտվում է հակառակ պատկերը [150]:

GM սննդամիջավայրի մեջ լևուլինաթթվի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա կախված է միջավայրի pH-ից: pH-ի 5.5 արժեքի դեպքում 5 մմոլ /լ կոնցենտրացիայով լևուլինաթթուն 85 %-ով արգելակում է 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ ֆերմենտի ակտիվությունը, իսկ 100 մմոլ /լ կոնցենտրացիայի և pH-ի 7.5 արժեքի դեպքում՝ 45 %-ով [153]:

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի պրոցեսում 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվության համար անհրաժեշտ է նաև բիոտին: Թիամինը հանդիսանում է հիմնանյութ կոֆերմենտ թիամին պիրոֆոսֆատի համար, որը Շեմիսի նյութափոխանակային ուղիում  $\alpha$ -օքսազլուտարատը վերափոխում է  $C_4$  միջանկյալ միացության [91]:

Կենդանի օրգանիզմներում 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվությունը կարգավորվում է նաև ցիստեինի կամ գլուտամինի ցածր մոլեկուլային կշիռ ունեցող ծծմբային միացությունների (CySSSCy), գլուտաթիոնի եռսուլֆիդի (GSSSG), գլուտաթիոնի և ցիստեինի եռսուլֆիդների (GSSSCy), ինչպես նաև եռսուլֆանդիսուլֆոնատի ( $S_5O_6^{2-}$ ) կողմից: Բացահայտվել է որ, բազմա- (սուլֆան) երկսուլֆոնատը ( $-O_3S_n-SO_3$ ), ինչպես նաև R-S<sub>n</sub>-R'-ը հանդիսանում են 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի խթանիչներ: Լևուլինաթթվի կատալիտիկ ակտիվության պահպանման համար անհրաժեշտ է 2-մերկապտոթանոլ կամ դիթիոէրիթրիտոլ այն դեպքում, երբ սննդամիջավայրում նիտրիտն արգելակում է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը [157]:

**1.8.4. 5-ԱԼԹ-ի կիրառությունը բժշկության, գյուղատնտեսության և այլ բնագավառներում**

5-ԱԼԹ-ն կիրառվում է գյուղատնտեսության մեջ որպես ֆոտոդինամիկ հերբիցիդ միջոց: Բույսերի վրա 5-ԱԼԹ ցողարկելուց անմիջապես հետո բուսական բջիջներում մթնոլորտային պայմաններում սինթեզվում և կուտակվում է տետրապիրոլ:

Տետրապիրոլի ձևավորման համար 5-ԱԼԹ-ն հանդիսանում է կառուցվածքային տարր, իսկ Օ-ֆենանտրոլինը, էթիլ նիկոտինատը և 2,2'-դեպիրիդիլը (DP) նպաստում են տետրապիրոլի կուտակմանը: Դեպիրիդիլը հանդիսանում է էժան քիմիական նյութ և շատ հաճախ 5-ԱԼԹ-ի հետ միասին օգտագործվում է տետրապիրոլի սինթեզը խթանելու նպատակով: Կուտակված մեծ քանակությամբ տետրապիրոլը լույսի ազդեցության տակ անջատում է սինգլետ թթվածին, որն օքսիդացնում է բջիջների մակերեսի չհագեցած ճարպաթթուները (լիպոպրոտեինային միացությունները)՝ հանգեցնելով ազատ ռադիկալների շղթայական ռեակցիայի գործունեության խանգարման: Բջջի մեմբրանի վնասման հետևանքով տեղի է ունենում դեհիդրատացիա, տերևների և հիպոկոտիլային հյուսվածքի կազմալուծում և քայքայում [136]: 24 ժամվա ընթացքում կանաչ տերևները գունազրկվում են և քայքայվում [138]:

Բույսերի տերևներում տետրապիրոլի կուտակումն առաջացնում է բջջային հյուսվածքների ֆոտոդինամիկ քայքայում, սակայն կոտիլիդոնները և ցողունը մնում են անվնաս: Երկշաքիլ մոլախտերը, որոնցից են ամարանտը և դանդուռը, խիստ զգայուն են տետրապիրոլի միջոցով ֆոտոդինամիկ քայքայման նկատմամբ: Միաշաքիլ բույսերը, որոնցից են եգիպտացորենը, ցորենը, վարսակը և գարին, ցուցաբերել են ցածր զգայունություն [136]: Բույսի զգայունությունը կախված է տվյալ բույսի տեսակից, տարիքից, օգտագործվող 5-ԱԼԹ-ի կոնցենտրացիայից, խթանիչի տեսակից, 5-ԱԼԹ-ի և խթանիչի գործակցից և լույսի ինտենսիվությունից [84]:

1988թ.-ին Ռեբրիզնի ռախատակիցների հետ միասին ստեղծել է նոր պորֆիրինային միջատասպան, որն իր մեջ պարունակում է պորֆիրինի խթանիչ, 3 մմոլ/լ 5-ԱԼԹ և 30 մմոլ/լ 2,2'-դեպիրիդիլ: Նշված պորֆիրինային միջատասպանը *Trichoplusia ni* տեսակի միջատի

թրթուրի վրա ցողարկելիս 5-ԱԼԹ-ի ազդեցության հետևանքով թրթուրների օրգանիզմում կուտակված մեծ քանակությամբ պրոտոպորֆիրին IX-ը լույսի առկայության պայմաններում սինգլետ թթվածնի անջատման շնորհիվ առաջացնում է թրթուրների մահ: 5-ԱԼԹ-ի առավելություններից մեկն էլ այն է, որ նա համարվում է անվնաս ոչ թիրախային օրգանիզմների՝ մարդկանց, կենդանիների և մշակովի բույսերի համար: Յետազոտությունները ցույց են տվել, որ միջատների օրգանիզմում 5-ԱԼԹ-ի նկատմամբ կայունություն չի ձևավորվում [137]:

Բացի միջատասպան ազդեցությունից, ցածր կոնցենտրացիայով օգտագործելու դեպքում 5-ԱԼԹ-ն ցուցաբերում է նաև բազմաթիվ մշակաբույսերի և բանջարեղենների աճը խթանելու և բերքատվությունը բարձրացնելու հատկություն [155]: Սա պայմանավորված է ֆոտոսինթեզի պրոցեսին նպաստելու և լույսի պայմաններում CO<sub>2</sub>-ի ֆիքսումը խթանելու հատկությամբ: 5-ԱԼԹ-ն նպաստում է նաև նյութափոխանակությանը և մթնոլորտային պայմաններում CO<sub>2</sub>-ի անջատմանը: Յամապատասխան քանակությամբ կիրառման դեպքում 5-ԱԼԹ-ն ունենում է 10-60 % նպաստավոր ազդեցություն բողկի, լոբու, գարու, կարտոֆիլի, սխտորի, բրնձի և եգիպտացորենի աճի և բերքատվության համար [157]:

Բացահայտվել է նաև, որ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի նպաստակով *Rba. spaeroides*-ի կուլտիվացումից ստացված կուլտուրալ հեղուկը կարող է բույսերի համար օգտագործվել որպես պարարտանյութ, որը միաժամանակ ունի նաև մոլախտասպան հատկություն [152]:

5-ԱԼԹ-ն հայտնի է որպես տետրապիրոլների (պորֆիրին, հեմ և վիտամին B<sub>12</sub>) կենսասինթեզի միջանկյալ միացություն: 5-ԱԼԹ-ի կիրառությունը բժշկության բնագավառում արժանացել է մեծ ուշադրության, քանի որ այն հանդիսանում է շատ կարևոր լուսազգայուն միացություն: Այն կիրառվում է մաշկի, բերանի խռոչի, կերակրափողի, աղիների, ենթաստամոքսային գեղձի, միզապարկի քաղցկեղների ֆոտոդինամիկ ախտորոշման և թերապիայի համար [80]:

5-ԱԼԹ-ն օգտագործվում է գլխուղեղի քաղցկեղի ախտորոշման և վիրահատության ժամանակ՝ նրա հստակ տեղորոշման համար:

Ներերակային եղանակով 5-ԱԼԹ ներարկելուց հետո, լույսի 390-410 նմ ալիքի երկարության տակ գլխուղեղի քաղցկեղի բջիջները, ի տարբերություն առողջ բջիջների, լուսարձակում են մանուշակագույն գույն:

Պարզվել է, որ 5-ԱԼԹ-ի ներարկման դեպքում, ի տարբերություն առողջ բջիջների, քաղցկեղային հյուսվածքի բջիջներում կուտակվում է պրոտոպորֆիրին IX: 5-ԱԼԹ-ի կիրառման շնորհիվ գլխուղեղի քաղցկեղի ախտորոշումը և վիրահատությունը դարձել են ավելի արդյունավետ [30]:

Բժշկության բնագավառում 5-ԱԼԹ-ն կիրառվում է նաև լագերային ճառագայթների միջոցով մաշկային նորագոյացությունների բուժման ժամանակ՝ ցուցաբերելով բավական բարձր արդյունավետություն [73]: 5-ԱԼԹ-ն կիրառվում է նաև զարկերակային հիվանդությունների ֆոտոդինամիկ թերապիայի ժամանակ [77, 148]: Յետագոտությունները ցույց են տվել, որ 5-ԱԼԹ-ն կարող է օգտագործվել կենդանիների, ինչպես նաև մարդկանց մոտ հայտնաբերված դոքսոռուբիցինի նկատմամբ կայուն քաղցկեղի ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար: 5-ԱԼԹ-ն կիրառություն է գտել նաև շագանակագեղձի քաղցկեղի և մելանոմայի բուժման մեջ [34]:

Բազմաթիվ փորձերի արդյունքում բացահայտվել է, որ 5-ԱԼԹ-ն կարող է կանխարգելել մազաթափությունը և վերականգնել մազերի աճը [154]:

5-ԱԼԹ-ն կիրառվում է նաև ծանր մետաղներով թունավորումներն ախտորոշելու համար: Պարզվել է, որ այդ դեպքերում մարդկանց մեզի մեջ կուտակվում է 5-ԱԼԹ, որը հայտնաբերմամբ էլ ախտորոշվում են ծանր մետաղներով թունավորումները [154]:

5-ԱԼԹ-ն կենսատեխնոլոգիայում օգտագործվում է հեմ պարունակող ֆերմենտների [70], պորֆիրինի [94], վիտամին B<sub>12</sub>-ի [40], բուսական [105] և կենդանական բջիջների կուլտուրաների [39] արտադրության մեջ:



### 1.9. Հայ գիտնականների ներդրումը ֆոտոսինթեզող բակտերիաների ու սուլֆատախիթման գործում

Հայ աստանում բազմաթիվ հետազոտութայ ունենեղ՝ ուղղված ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կենսաբազմազանութայն [15], մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և գենետիկական հատկութայ ունենեղի ու սուլֆատախիթմանը, կենսաբանորեն ակտիվ միացութայ ունենեղի ստացմանը և կիրառմանը (վիտամիններ, օրգանական թթուներ, ֆերմենտներ, ամինաթթուներ, բազմաշաքարներ, սպիտակուց-վիտամինային խտանյութեր) կատարվել են ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում (ներկայումս՝ ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):

Մասնավորապես, հետազոտվել է և և սուլֆատախիթման պայմաններում աճի դեպքում «B» խմբի վիտամինների ազդեցութայ ունը *Rba. sphaeroides* D-4 ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիայի մոտկարոտինոիդների պարունակութայն վրա: Պարզվել է, որ սննդամիջավայրին 10-20 մկգ/լ վիտամին B<sub>12</sub> ավելացնելիս մեծանում է կենսազանգվածի ելքը, ինչպես նաև կարոտինոիդների ընդհանուր պարունակութայ ունը բջիջներում: Բացահայտվել է, որ B<sub>12</sub>-ը բարենպաստ ազդեցութայ ուն է թողնում սֆերոիդենոնի կենսասինթեզի վրա: Ցույց է տրվել, որ B<sub>12</sub>-ի 30 մկգ/լ-ից ավելի կոնցենտրացիան ճնշում է կուլտուրայի աճը [17]:

Արզնի հանքային աղբյուրներից անջատված *Rba. sphaeroides* A-1 ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիայի մոտցույց է տրվել ածխածնի որոշ օրգանական աղբյուրների ազդեցութայ ունը կարոտինոիդների կենսասինթեզի և աճի վրա: Պարզվել է, որ ածխածնի տարբեր աղբյուրների օգտագործման դեպքում փոխվում են ինչպես առանձին պիգմենտների քանակական և որակական պարունակութայ ունենեղը, այնպես էլ կարոտինոիդների ընդհանուր ելքը: Հաստատվել է, որ կարոտինոիդների կենսասինթեզը ոչ միշտ է համահարաբերակցում կենսազանգվածի ելքի հետ [13]:

Ուսուլմնասիթվել է Արզնի հանքային աղբյուրներից անջատված *Rba. sphaeroides* MDC 6521 ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիայի օքսիդալերակնաման պոտենցիալի և այս բակտերիայի կողմից ջրածնի սինթեզի վրա մետրոնիդազոլի ազդեցութայ ունը: Ցույց է

տրվել, որ մետրոնիդազոլը ճնշում է \$երրեդոքսին-կապած ռեակցիաները՝ հանդես գալով որպես էլեկտրոնների այլընտրանքային ակցեպտոր նիտրոգենազի փոխարեն [3]: Չայտնաբերվել են *Rba. sphaeroides* ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիայի կողմից ջրածնի կենսասինթեզի առանձնահատկությունները՝ ցածր հաճախությամբ էլեկտրամագնիսական ալիքների ազդեցության տակ [57]:

Որոշ տեսակների ծիրանագույն ոչ ծծմբային \$ոտոսինթեզող բակտերիաների մոտ ցույց է տրվել ամինոացիլազային ակտիվության առկայությունը: Ընտրվել են սինթեզի օպտիմալ պայմանները և մշակվել են ացիլազային ակտիվության բարձրացման մեթոդներ [12]:

Մորֆոլոգիական և \$իզիոլոգիական յուրահատկությունների համեմատական անալիզի հիման վրա հաստատվել են անջատված կուլտուրայի և *Rps. palustris* տիպային շտամի տարբերությունները՝ կապված, ազոտի, ածխածնի, վիտամինային պահանջների և թերմո- և ադակայությունների հետ: Ապացուցվել է *Rps. palustris* բակտերիայի մշտական առկայությունը Ջերմուկի հանքային աղբյուրներում [16]:

Չետագոտվել են *Thiospirillum* ծիրանագույն ծծմբային բակտերիայի առանձնահատկությունները: Ցույց է տրվել, որ տվյալ կուլտուրան զգալիորեն տարբերվում է տիպայինից աճի պայմաններով, հատկապես սննդամիջավայրի pH-ի արժեքներով, միջավայրում հիմքի ու աղի բարձր կոնցենտրացիաների հանդեպ կայունության և թիոսուլֆատն օքսիդացնելու հատկությամբ [12, 14]:

Ներկայումս ակտիվ կերպով շարունակվում են \$ոտոսինթեզող բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկությունների բազմակողմանի ուսումնասիրությունները: Այդ հետազոտությունների բաժիններից մեկի տրամաբանական ավարտը մեր կողմից ներկայացված թեկնածուական թեզն է [122, 121, 64, 65, 2]:

## ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱՉՈՏՈՒ ԹՅԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ, ՆՅՈՒ ԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

### 2.1. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրությունը

Հետազոտության համար օգտագործվել են «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի մանրէների հավաքածուի մեջ ընդգրկված հետևյալ բակտերիաները՝ *Rsp. rubrum* MDC-6505, *Rps. palustris* MDC-6506, *Rba. capsulatus* MDC-6508 և *Rba. sphaeroides* MDC-6509: Նշված շտամները նախկինում մեկուսացվել են Հայաստանի տարբեր հանքային ջրերից [1]:

Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկություններն ուսումնասիրվել են ագարային և հեղուկ սննդամիջավայրերում:

Ուսումնասիրվել են ֆոտոսինթեզող բակտերիաների միկրոմորֆոլոգիական և մակրոմորֆոլոգիական հատկանիշները, աճի պայմանները: Գաղութների աճի ձևը, գույնը, տեսքը, չափը ուսումնասիրելու համար օգտագործվել են MBC-9 և BOECO BM-120 մանրադիտակը՝ հագեցած 100/1,25 խոշորացմամբ իմերսիոն օբյեկտիվով (Գերմանիա) և համակարգչին միացված DC M510 5MP թվային տեսախցիկով:

Բակտերիաների աճը և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզն ուսումնասիրելու նպատակով օգտագործվել են ածխածնի տարբեր աղբյուրներ պարունակող հեղուկ սննդամիջավայրեր: Ինկուբացումն իրականացվել է անոթ, միկրոանոթ և անանոթ պայմաններում: Հետազոտության ընթացքում օգտագործվել են հետևյալ հեղուկ սննդամիջավայրերը՝

Օրմերոդի սննդամիջավայր (գ/լ)՝  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0.2,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  - 0.08,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0.01,  $K_2HPO_4$  - 0.9,  $KH_2PO_4$  - 0.6,  $(NH_4)_2SO_4$  - 1.25, ԷԴՏԱ - 0.02, նատրիումի մալատ - 2.0, խմորասնկային էքստրակտ - 0.1,  $H_3BO_3$  - 0.028,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  - 0.021,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  - 0.075,  $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$  - 0.0024,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$  - 0.01, pH՝ 6.8-7.3 [2]:

GA սննդամիջավայր (գ/լ)՝ խմորասնկային էքստրակտ - 1.5,  $C_2H_3NaO_2$  - 1.64,  $C_5H_8NO_4Na$  - 2.0,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$  - 0.8,  $KH_2PO_4$  - 0.5,  $K_2HPO_4$  - 0.5,

MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0.2, CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O - 0.053, MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 1.2x10<sup>-3</sup>, թիամիև-HCl - 10<sup>-3</sup>, նիկոտինաթթու - 10<sup>-3</sup>, բիոտին - 10<sup>5</sup>, pH` 6.8-7.0 [167]:

GG սննդամիջավայր (գ/լ)` խմորասնկային էքստրակտ - 1.5, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 2.7, C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>4</sub>Na - 2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.5, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0.2, CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O - 0.053, MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 1.2x10<sup>-3</sup>, թիամիև-HCl - 10<sup>-3</sup>, նիկոտինաթթու - 10<sup>-3</sup>, բիոտին - 10<sup>5</sup>, pH` 6.8-7.0 [118]:

GM սննդամիջավայր (գ/լ)` խմորասնկային էքստրակտ - 1.5, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 2.7, C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>4</sub>Na - 2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.5, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O-0.2, CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O - 0.053, MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 1.2x10<sup>-3</sup>, թիամիև-HCl - 10<sup>-3</sup>, նիկոտինաթթու - 10<sup>-3</sup>, բիոտին - 10<sup>5</sup>, pH` 6.8-7.0 [118]:

Քիմիական նյութերը կշռելու համար օգտագործվել է Shimadzu AX-200 W անալիտիկ կշռքը (ճապոնիա): Միջավայրերը ստերիլիզացվել են 1 ամթ. ճնշման, 121<sup>0</sup> C ջերմաստիճանի պայմաններում` 20 րոպե տևողությամբ:

Միջավայրերի pH-ը որոշվել է BOECO PT-70 (Գերմանիա) և Hanna Instruments HI 9024, Woonsocket (ԱՄՆ) pH-մետրերով: pH-ը կարգավորվել է 1M NaOH-ի և 1M HCl-ի և ծույթներով:

Բակտերիաների միկրոմորֆոլոգիական հատկությունները ստուգելու համար օգտագործվել են BOECO BM-120 (Գերմանիա) և Olympus CX21FS1 (ճապոնիա) և սային մանրադիտակները: Նկարների վերլուծությանն իրականացվել է ScopePhoto x 64 3.1.615 և Cell Imaging Systems համակարգչային ծրագրերի միջոցով: Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կուլտուրաների մաքրությունը ստուգելու նպատակով օգտագործվել են Օրմերոդի և GM 2 % ազարային սննդամիջավայրերը: Ազարային սննդամիջավայրերի վրա բակտերիաները ցանվել են հաջորդական նոսրացումներով` օգտագործելով բակտերիոլոգիական օղակ և շպատել [147]:

Անատրոբ բակտերիաների ինկուբացման համար ազարային սննդամիջավայրերով և ցված Պետրիի թասերը տեղադրվել են անատրոբ խցիկի մեջ` 28-30<sup>0</sup> C և 1500-2000 լյուքս և սալորոնային պայմաններում: Լուսավորությունն ապահովվելու համար օգտագործվել են 100 Վտիզորոնայամբ Philips վոլթամային և ամպեր:

Կուլտիվացումից 3-7 օր հետո ազարային սննդամիջավայրերի վրա աճած մեկական մաքուր գաղութները բակտերիոլոգիական օղակի

միջոցով տեղափոխվել են համապատասխան հեղուկ սննդամիջավայրերի մեջ, որտեղ բակտերիաների կուլտիվացման համար օգտագործվել են 100-500 մլ տարողությամբ էրլենմեյերի փորձանոթներ, որոնց մեջ լցվել են համապատասխանաբար 50-250 մլ ծավալով հեղուկ սննդամիջավայրեր և 10 % ինոկուլանտ: Փորձանոթները փակվել են ապակե խցաններով, իսկ ինոկուլացման համար օգտագործվել է թերմոստատ, լաբորատոր թափահարիչ (Elpan-357), լաբորատոր թափահարիչ-ինոկուլատոր (BioSan ES-20) և մազնիսական խառնիչ (Thermo Scientific Cimarec I15, Thermo Scientific, ԱՄՆ): Կուլտիվացման ընթացքում կուլտուրալ հեղուկների խառնումն իրականացվել է մազնիսական խառնիչի միջոցով՝ 130 պտր արագությամբ:

## **2.2. Մուլտագենեզ և 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ շտամների ընտրություն**

Մուլտագենեզն իրականացվել է Նիշիկավայի մեթոդով՝ N-մեթիլ-N-նիտրո-N-նիտրոզոգուանիդին քիմիական մուլտագենի օգտագործմամբ [118]:

Վերոնշյալ բակտերիաների շտամներն ինոկուլացվել են 30°C ջերմաստիճանի և 2000 լյուքս լուսավորության պայմաններում, որից հետո կուլտուրալ հեղուկները ցենտրիֆուգվել են 3000 պտր արագությամբ 20 րոպե և վերնստվածքային հեղուկները հեռացվել են: Կենսազանգվածներին տրիս-մալեինաթթվային (SU, 50 մմոլ/լ, pH-6.0) բուֆեր ավելացնելուց հետո նորից ցենտրիֆուգվել են 3000 պտր արագությամբ: Ցենտրիֆուգելուց հետո վերնստվածքային հեղուկները հեռացվել են և կենսազանգվածները լցվել են SU բուֆերի մեջ, որին նախապես ավելացվել էր N-մեթիլ-N-նիտրո-N-նիտրոզոգուանիդին՝ 100 մգ/լ կոնցենտրացիայով:

Կենսազանգվածները կուլտիվացվել են 1 ժամ սենյակային ջերմաստիճանում, որից հետո նորից ցենտրիֆուգվել են 3000 պտր արագությամբ 20 րոպե: Վերնստվածքային հեղուկները հեռացվել են, կենսազանգվածները նորից լվացվել են SU բուֆերի մեջ և ցենտրիֆուգվել: Վերնստվածքային հեղուկները հեռացնելուց հետո կենսազանգվածները լցվել են 25 մլ GM սննդամիջավայրի մեջ և կուլտիվացվել 24 ժամ 30°C ջերմաստիճանի պայմաններում, որից

հետո կուլտուրաները շաատելի օգնությամբ տարածվել են Պետրիի թասիկների մեջ լցված 2 % ազարային GM միջավայրի մակերեսին և ինկուբացվել 72 ժամ:

Ազարային GM սննդամիջավայրերի վրա աճած բակտերիալ մեկական գաղութները տեղափոխվել են 0.2-ական մլ GM սննդամիջավայր պարունակող միկրոտիտրային պլատաների մեջ (96 գաղութ յուրաքանչյուր պլատայում): Ինկուբացումը միկրոտիտրային պլատաներում իրականացվել է 30°C ջերմաստիճանի պայմաններում 48 ժամ: Այնուհետև յուրաքանչյուր պլատայի մեջ (96 կուլտուրաների վրա) ավելացվել են 30 մմոլ/լ գլիցին, 30 մմոլ/լ սուկցինատ և 15 մմոլ/լ լևուլինաթթու: 24 ժամ ինկուբացումից հետո արտաքջջային սինթեզված 5-ԱԼԹ-ն կուլտուրալ հեղուկում որոշվել է գունաչափական եղանակով:

Միկրոտիտրային պլատաների մեջ կուլտիվացված յուրաքանչյուր կուլտուրայից վերցվել է 0.01-ական մլ կուլտուրալ հեղուկ և տեղափոխվել է նոր միկրոտիտրային պլատայի մեջ: Նոր միկրոտիտրային պլատաների մեջ լցված յուրաքանչյուր կուլտուրալ հեղուկին ավելացվել է 1 % ագետիլ ագետոնի պարունակությամբ 0.1 մլ ագետատային բուֆեր (1 Մ, pH 4.7): Միկրոտիտրային պլատաները փակվել են թափանցիկ ժապավենով և տեղադրվել են 100°C ջերմաստիճանի տակ, 15 րոպե:

Ագետատային բուֆերի մեջ 5-ԱԼԹ-ի և ագետիլ ագետոնի ռեակցիայի արդյունքում սինթեզվում է պիրոլ (2-մեթիլ-3-ագետիլ-4-(3-պրոպիոնաթթու)) [118]: 100°C-ում 15 րոպե պահելուց հետո միկրոտիտրային պլատաները սառեցվել են սառույցի մեջ և յուրաքանչյուր լուծույթին ավելացվել է 0.1 մլ Էրլիխի ռեակտիվ (2 % պարա-դիմեթիլ ամինոբենզալ դեհիդրի և 11.2 % պերքլորաթթվի պարունակությամբ 50 մլ քացախաթթվի լուծույթ):

Էրլիխի ռեակտիվի մեջ պիրոլային միացության և պարա-դիմեթիլ ամինոբենզալ դեհիդրի ռեակցիայի արդյունքում լուծույթները ստանում են մանուշակագույն գունավորվում [106]: Էրլիխի ռեակտիվի ավելացումից 10-20 րոպե հետո այն կուլտուրաները, որոնցից վերցված նմուշները ռեակցիայի արդյունքում ստացել են առավել վառ գունավորում, տեղափոխվել

են 50 մլ հեղուկ GM սննդամիջավայրերի մեջ՝ հետագա ուսումնասիրությունների նպատակով:

### **2.3. 5-ԱԼԹ-ի որոշումը կուլիտուրալ հեղուկում նրբաչերտ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով**

Կուլիտուրալ հեղուկներում սինթեզված արտաքային 5-ԱԼԹ-ի քանակությունները որոշվել են նիրբաչերտ քրոմատոգրաֆիայի (ՆՇՔ) եղանակով: Կուլիտուրալ հեղուկից վերցված 10 մլ նմուշը ցենտրիֆուգվել է և կենսազանգվածը հեռացվել: Վերնստվածքային հեղուկը գոլնագրկելու համար օգտագործվել է ակտիվացված ածուխ: 10 մլ վերնստվածքային հեղուկին ավելացվել է 0.2 գրամ ակտիվացված ածուխ, փորձանոթը տեղադրվել է լաբորատոր թափահարիչի վրա և թափահարվել է 100 պտր արագություն 10 րոպե: Թափահարելուց հետո լուծույթը ֆիլտրվել է ֆիլտրի թղթի միջոցով: Ֆիլտրատն օգտագործվել է 5-ԱԼԹ-ի քանակը որոշելու նպատակով:

ՆՇՔ իրականացնելու նպատակով օգտագործվել են սիլիկատային նրբաչերտալյուսմիսե թիթեղներ (Sorbfil): Նրբաչերտ թիթեղի վրա մատիտի օգնությամբ նշվել են սկզբնագիծը, սկզբնագծի վրաիրարից 1 սմ հեռավորությամբ կետերը՝ ստանդարտի և նմուշների համար և վերջնագիծը:

ՆՇՔ-ի միջոցով 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերման նպատակով նախապես պատրաստվել է 5-ԱԼԹ-ի հիդրոքլորիդի հայտնի քանակությամբ ջրային լուծույթ, որն օգտագործվել է որպես ստանդարտ: ՆՇՔ թիթեղը տեղադրվել է էլեկտրական սալիկի վրա (50°C):

Ավտոմատ պիպետի օգնությամբ վերցվել են 20 մկլ 5-ԱԼԹ-ի հիդրոքլորիդի լուծույթ, 20-ական մկլ նմուշներ և կաթեցվել են ՆՇՔ թիթեղի նախապես համարակալված կետերում: ՆՇՔ թիթեղը տեղադրվել է 12:3:5 հարաբերությամբ համապատասխանաբար բութանոլ:քացախաթթու:ջուր պարունակող հատուկ ապակե տարայի մեջ [174], ընդ որում լուծիչի մակարդակը պետք է ցածր լինի ՆՇՔ թիթեղի վրանշված սկզբնագծից:

ՆՇՔ թիթեղը տեղադրելուց հետո ապակե տարան փակվել է կափարիչով: Լուծիչը ՆՇՔ թիթեղի վերջնագծին հասնելուց հետո

ՆՇՔ թիթեղը չորացվել է 1 րոպե 100°C-ում, այնուհետև ներկվել է 2 % նիսիդրինի պարունակությամբ բուժանոլի լուծույթով և նորից չորացվել է 1 րոպե 100°C-ում: Որոշվել է 5-ԱԼԹ-ի հիդրոբլորիդի  $R_f$ -ը (Retention factor): ՆՇՔ թիթեղը լուսանկարվել է թվային տեսախցիկի միջոցով: Ստացված լուսանկարների վերլուծությունն իրականացվել է ImageJ (Image Processing & Analysis in Java) համակարգչային ծրագրի միջոցով:

#### **2.4. Կոլլտուրալ հեղուկում 5-ԱԼԹ-ի քանակի որոշումը՝ բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով**

Կոլլտուրալ հեղուկներում 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերման նպատակով ուսումնասիրության են ենթարկվել հիմնական և մուտանտ շտամների կոլլտուրաներից վերցված նմուշները: 250 մլ տարողությամբ փորձանոթների մեջ լցվել է 125 մլ GM սննդամիջավայր, որի մեջ ավելացվել է նախապես աճեցված 10 % ինոկուլանտ:

Շտամներն ինկուբացվել են 48 ժամ՝ 30°C և 2000 լյուքս լուսավորության պայմաններում, այնուհետև կոլլտուրաներին ավելացվել է 30 մմոլ/լ գլիցին, 30 մմոլ/լ սուկցինատ, 15 մմոլ/լ լևուլինաթթու և ինկուբացվել են ևս 24 ժամ: Ինկուբացիայից հետո վերցվել են 2-ական մլ նմուշներ և ցենտրիֆուգվել են 20 րոպե 8000 պտր արագությամբ: Կենսազանգվածն օգտագործվել է չոր կենսազանգվածի, իսկ վերնստվածքային հեղուկը՝ 5-ԱԼԹ-ի քանակական որոշման համար:

Բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի (ԲԱՅՔ) եղանակով 5-ԱԼԹ-ի քանակը որոշելու համար իրականացվել է վերցված նմուշների դերիվատիզացիա՝ համաձայն Յանթզի (Hantzsch) ռեակցիայի [167]: Այս մեթոդի համաձայն, ալդեհիդ ալդոզների և 5-ԱԼԹ-ի ամինոխմբի ռեակցիայի արդյունքում ձևավորվում է լուսարձակող միացություն

(3.5-դիալդեհիդ -1.4-դիհիդրոլուտին):

Դերիվատիզացիան իրականացնելու համար վերցվել է 50 մկլ վերնստվածքային հեղուկ, ավելացվել է 0.4 % NaCl և 1.1 % ֆորմալդեհիդ պարունակող 3.5 մլ ալդեհիդ ալդոզների ռեակտիվ



(ացետիլացետոն:էթանոլ :ջուր՝ 15:10:75) և պահվել է 30 րոպե 100°C ջերմաստիճանում, որից հետո դրվել է սառույցի մեջ:

Նախքան ԲԱՅՔ անալիզը նմուշները պահվել են մուխ տեղում: Ջետազոտության համար օգտագործվել է  $\text{SiO}_2$  նուրբ սցենտային ընկալիչով և Armsfer Si C 18 (250x4 մմ, 5-8 մկմ) բաժանիչ աշտարակով հագեցած բարձր արդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆը (նմուշի ներարկման ծավալ՝ 10 մկլ, աշտարակի ջերմաստիճան՝ 25°C, շարժական ֆազ՝ 30 % ացետոնիտրիլ և 0.1 % եռֆտորքացախաթթու պարունակող ջրային լուծույթ, հոսքի արագություն՝ 1 մլ/ր, կլանման և արձակման լույսի ալիքի երկարություններ՝ համապատասխանաբար 350 և 450 նմ) («Waters», ԱՄՆ): ԲԱՅՔ անալիզի արդյունքների վերլուծություններն իրականացվել են Empowerpro համակարգչային ծրագրի միջոցով: Նմուշների մեջ 5-ԱԼԹ-ի քանակը որոշվել է 5-ԱԼԹ հիդրոքլորիդի 3 հայտնի քանակություններով լուծույթների ԲԱՅՔ անալիզի տվյալների հետհամեմատելով:

## **2.5. Ֆոտսիներեզոդ բակտերիաների կուլտիվացումը կենսաառեակտորի մեջ**

Sartorius BIOSTAT Cplus կենսաառեակտորի մեջ կուլտիվացումն իրականացվել է 48 ժամից 96 ժամ տևողությամբ՝ կախված փորձի բնույթից: Կենսաառեակտորի մեջ լցվել է 4.5 լ GM սննդամիջավայր և ստերիլիզացվել կենսաառեակտորի ավտոմատ ստերիլիզացման համակարգի միջոցով: Միջավայրի pH-ն ավտոմատ կերպով կարգավորվել է 2 Մ NaOH-ի և 2 Մ HCl-ի լուծույթների միջոցով □նկար 8□:



**Նկար 8. Sartorius BIostat Cplus կենսառեակտոր**

Կուլտիվացումն իրականացնելու համար բոլոր անհրաժեշտ պայմանները կարգավորվել են կենսառեակտորի կառավարման ծրագրի միջոցով: Բոլոր կարգավորումները մուտքագրվել են սենսորային մոնիտորի միջոցով: Կենսառեակտորի մեջ ավելացվել է 0.5 լ ինոկուլատ (10 %) և իրականացվել է կուլտիվացում՝ օդի հոսքի 2.0 մլ/ր, խառնիչի արագության 400 պտ/ր, կուլտիվացման ջերմաստիճանի 30°C և pH-ի 6.9 պայմաններում: Կուլտիվացումից 24 ժամ անց կենսառեակտորի մեջ ավտոմատ պոմպի միջոցով ավելացվել են 30 մմոլ/լ սուկցինատ և 15 մմոլ/լ լևուլինաթթու:

Կուլտիվացման ընթացքում 2 ժամ պարբերականությամբ վերցվել են 10-ական մլ նմուշներ՝ սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով 520 նմ ալիքի երկարության տակ օպտիկական խտության որոշման և ցենտրիֆուգման (20 րոպե, 7200 g արագացում, 4°C) համար: Ցենտրիֆուգելուց հետո որոշվել է չոր կենսազանգվածի քանակությունը, իսկ վերնստվածքային հեղուկը պահվել է 20°C-ում՝ նախքան գազ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով ուսումնասիրությունը:

**2.6. 5-ԱԼԹ-ի, Լևուլինաթթվի, գլիցինի, գլուտամատի, մալատի և սուկցինատի քանակների որոշումը կուլտուրալ հեղուկներում՝ գազ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով**

Պատրաստվել են 5-ԱԼԹ-ի, Լևուլինաթթվի, գլիցինի, գլուտամատի, մալատի և սուկցինատի 5 մմոլ/լ կոնցենտրացիաներով Լուծույթներ: Վերոնշյալ նյութերը համապատասխան քանակություներով Լուծվել են 10 մլ GM սենդամիջավայրի մեջ (առանց խմորասնկային էքստրակտի, գլուտամատի և վիտամինների):

Գլիցինի, գլուտամատի և սուկցինատի Լուծույթներից վերցվել են 2-ական մլ և պատրաստվել են խառնուրդներ: Նույն եղանակով պատրաստվել է խառնուրդ նաև 5-ԱԼԹ-ի և Լևուլինաթթվի Լուծույթներից՝ վերցնելով 2-ական մլ յուրաքանչյուրից:

Վերոնշյալ Լուծույթները նոսրացվել են թորած ջրով հետևյալ հարաբերակցություներով՝ 10:90, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20: Իրականացվել է նոսրացված Լուծույթների դերիվատիզացիա՝ գազ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով ուսումնասիրման համար: Յուրաքանչյուր Լուծույթից վերցվել է 200 մկլ, ավելացվել 10 մկլ 10 մմոլ նորվալինի Լուծույթ (ներքին ստանդարտ), 172 մկլ 1 մմոլ HCl և 228 մկլ NaOH: Ստացված Լուծույթը 20 վրկ խառնվել է խառնիչի □vortex□ միջոցով: Խառնելուց հետո Լուծույթներին ավելացվել է 200 մկլ պիրիդինի Լուծույթ (թորած ջուր:էթանոլ:պիրիդին՝ 60:32:8 հարաբերակցությամբ) և նորից խառնվել է 20 վրկ: Լուծույթներին ավելացվել է 98 % 10 մկլ էթիլ քլորոֆորմ և խառնվել է ևս 20 վրկ: Այս Լուծույթին ավելացվել է 1 % էթիլ քլորոֆորմի պարունակությամբ 200 մկլ Լուծույթ: Այս Լուծույթների մեջ ջրային և քլորոֆորմային ֆազերի բաժանումից հետո զգուշությամբ վերցվել է քլորոֆորմային ֆազը և օգտագործվել է գազ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով ուսումնասիրման համար [175]:

Կուլտուրալ հեղուկից վերցված բուրո նմուշների դերիվատիզացիան իրականացվել է նույն մեթոդով: Գազ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով ուսումնասիրության ներկայացվել է Shimadzu GC-2010Plus (Shimadzu, Կյոտո, Ճապոնիա) գազ քրոմատոգրաֆի միջոցով, որը հագեցած է բոցային իոնիզացնող ընկալիչով (Rtx®-5ms (30 մլ, 0.25 մմ ID, 0.25 μմ df, ԱՄՆ), մազանոթային

աշտարակով (Shimadzu AOC 20s, Shimadzu, Ճապոնիա), նմուշների ավտոմատ տեղադրման համակարգով և Shimadzu AOC 20i (Shimadzu, Ճապոնիա) ավտոմատ ներարկման համակարգերով: ԳՔ հետազոտության պայմանները հետևյալն են. ներարկիչի ջերմաստիճան՝ 300°C, ներարկման ռեժիմ՝ 1:5 (split), ներարկման ծավալ՝ 2 մկլ, այրվող գազ՝ ջրածին, կրող գազ՝ հելիում (99.999 %, Messer, Խորվաթիա), կրող գազի հոսք՝ 0.7 մլ/ր, ընկալիչի ջերմաստիճան՝ 300°C, անալիզի ժամանակահատված՝ 15 րոպե:

ԳՔ եղանակով կատարված ուսումնասիրությունը և ստացված տվյալների վերլուծությունն իրականացվել է GC Solution ver. 2.3. և MS Excel համակարգչային ծրագրերի միջոցով:

## **2.7. Տոտոսինթեզող բակտերիաների 16S ռՌՆԹ գեների ամալիֆիկացում արևիմերազի շղթայական ռեակցիայով և 16S ռՌՆԹ գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզ**

Տոտոսինթեզող բակտերիաներն աճեցվել են GM սննդամիջավայրում 72 ժամ 2000 լյուքս լուսավորության և 30°C ջերմաստիճանի պայմաններում: Կուլտիվացումից հետո վերցվել են 10-ական մլ նմուշներ և ցենտրիֆուգվել 20 րոպե՝ 7200 g արագացմամբ, վերնստվածքային հեղուկները հեռացվել են, իսկ կենսազանգվածներն օգտագործվել են ԴՆԹ-ի անջատման նպատակով:

ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացվել է բենզիլ քլորիդի մեթոդով [192]. 60 մգ խոնավ կենսազանգվածին ավելացվել է 300 մկլ էքստրակտող բուֆեր (100 մմոլ տրիս-HCl, 40 մմոլ -էԴՏԱ, pH-9.0), 30 մկլ 10 % նատրիումի դոդեցիլ սուլֆատ և 180 մկլ բենզիլ քլորիդ: Փորձանոթները թափահարելուց հետո ինկուբացվել են 30 րոպե 50°C ջերմաստիճանում: Փորձանոթները 5 րոպե պարբերականությամբ թափահարվել են՝ լուծույթի երկու ֆազերը խառնելու նպատակով: Ինկուբացումից հետո լուծույթներին ավելացվել է 180 մկլ Na-ացետատ (3 Մ, pH-5.0), փորձանոթները տեղադրվել են սառույցի մեջ 10 րոպե: Սառեցնելուց հետո լուծույթները ցենտրիֆուգվել են 15 րոպե 11000 g արագացմամբ: Վերցվել է 500 մկլ վերնստվածքային հեղուկ, որին ավելացվել է 280 մկլ իզոպրոպանոլ, այնուհետև լուծույթները 1 ժամ պահվել են -20°C ջերմաստիճանում: Նորից

ցենտրիֆուգվել են 12000 պտր արագությանը, որից հետո վերնստվածքային հեղուկները հեռացվել են, նստվածքներին ավելացվել է 280 մկլ էթանոլ և կրկին 1 ժամ պահվել  $-20^{\circ}\text{C}$  ջերմաստիճանում: Սառեցնելուց հետո ցենտրիֆուգվել են ևս 5 րոպե 12000 պտր արագությանը, հեռացվել է էթանոլը և փորձանոթների մեջ լցվել է 50 մկլ TE բուֆեր (10 մմոլ/լ տրիս-HCl, 1 մմոլ/լ E75Ա, pH-8.0) և 0.5 մկլ ՌՆԹ-ազ (2մգ/մլ): 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացիան իրականացնելու նպատակով օգտագործվել են 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) և 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ունիվերսալ պրայմերները [171]:

Էպենդորֆի սրվակների մեջ լցվել են 0.4 մկլ դեզօքսինուկլեոտիդեռֆոսֆատ,

2 մկլ Taq-պոլիմերազ, 2 մկլ բուֆեր A-Mg<sup>2+</sup>, 2 մկլ MgCl<sub>2</sub>, 0.4-ական մկլ պրայմերներ, 13.8 մկլ թորած ջուր և ավելացվել է 1 մկլ անջատված ԴՆԹ-ի լուծույթ: Որպես Taq-պոլիմերազի դրական ստուգիչ օգտագործվել են *E.coli*-ից անջատված ԴՆԹ և 16S ռՌՆԹ գենի ունիվերսալ պրայմերները: Պոլիմերազի շղթայական ռեակցիան (ՊՇՌ) իրականացվել է BIO-RAD Gene Cycloer™ թերմոցիկլերի միջոցով:

Էպենդորֆի սրվակները տեղադրվել են ջերմացիկլերի մեջ և ՊՇՌ-ի միջոցով 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացումն իրականացվել է հետևյալ ծրագրով՝ 1x(95°C 2 րոպե, 57°C 0.5 րոպե, 72°C 3 րոպե), 30x(95°C 0.58 րոպե, 57°C 0.5 րոպե, 72°C 2 րոպե), 1x(95°C 0.5 րոպե, 57°C 0.5 րոպե, 72°C րոպե): ՊՇՌ պրոդուկտների ստուգումը կատարվել է հորիզոնական գել էլեկտրոֆորեզի համակարգով 40մմոլ/լ տրիս-ացետատ, 2մմոլ E75Ա, pH 8.0 բուֆերային լուծույթի վրա պատրաստված 1% ազարոզում: Գել էլեկտրոֆորեզի արդյունքները գնահատվել են UV-տրանսիլլումինատորի օգնությամբ:

ՊՇՌ-ի միջոցով ամպլիֆիկացված 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդների հաջորդականության որոշումն իրականացվել է MacroGen ընկերության նոնում (MacroGen, Սենդլի, Յարավային Կորեա): 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության համեմատությունն իրականացվել է BLAST ալգորիթմի կիրառմամբ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [191]:

### **Օգտագործված սարքավորումների ցանկը**

1. Սպեկտրոֆոտոմետրեր CՓ-26, ՌԴ, Cary 13E Varian, ԱՄՆ;
2. Բարձր արդյունավետությամբ հեղուկային քրոմատոգրաֆ «Waters», ԱՄՆ;
3. Գազ քրոմատոգրաֆ Shimadzu GC-2010Plus, Shimadzu, Ճապոնիա;
4. Թերմոստատ KBC G16/255, Լեհաստան;
5. Անալիտիկ կշեռք Shimadzu AX-200 W, Ճապոնիա;
6. Տեխնիկական կշեռք Libra ET-1211 Libra, Սլովենիա;
7. pH մետր -744, Hanna Instruments HI 9024, Hanna Instruments, Woonsocket, ԱՄՆ և BOECO PT-70, Գերմանիա;
8. Մանրադիտակ Olympus CX21FS1, Ճապոնիա, BOECO BM-120, Գերմանիա;
9. Ֆիլտր Chromafil®Xtra PA (NY) -45 մկմ/33 մմ, Macherey-Nagel, Գերմանիա;
10. Կենսաառեակտոր Sartorius BIOSTAT Cplus, Sartorius, ԱՄՆ;
11. Մազնիսական խառնիչ Thermo Scientific Cimarec 15, Thermo Scientific, ԱՄՆ;
12. Ցենտրիֆուգ Thermo Sientific SL BR, Thermo Sientific, ԱՄՆ;
13. Միկրոտիտրային պլաստա TPP Techno Plastic Products, Շվեյցարիա;
14. Ջերմացիկլեր BIO-RAD Gene Cycler™, Bio-Rad, ԱՄՆ;
15. Գել էլեկտրոֆորեզի հորիզոնական համակարգ, Bio-Rad, ԱՄՆ;
16. UV տրանսիլլուցիմետր FOTODYNE, ԱՄՆ;
17. Խառնիչ Vortex GENE 2, ԱՄՆ:

Սարքավորումների միմասը ներկայացված են նկար 9-ում:



**ա**



**բ**



**գ**



**դ**



**ե**



զ



է

**Նկար 9. Օգտագործված հիմնական սարքալորու մներ**

ա) FԱՅՔ «Waters», ԱՄՆ, բ) ԳՔ Shimadzu GC-2010Plus, Shimadzu, Ճապոնիա գ) սպեկտրոֆոտոմետր Cary 13E Varian, ԱՄՆ, դ) անալիտիկ կշեռք Shimadzu AX-200, Ճապոնիա, ե) մազնիսական խառնիչ Thermo Scientific Cimarec 15, ԱՄՆ, զ) կենսաառեակտոր, է) մանրադիտակ BOECO BM-120, Գերմանիա

**ԳԼՈՒԽ 3. ԾԻՐԱՆԱԳՈՒՅՆ ՈՉ ԾՃՄԲԱՅԻՆ ՖՈՏՈՍԻՆՏԵՆՆԵՐԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ  
ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԱՅՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ 5-ԱԼԹԻԹԱՐՏԱԴՐԻՉ  
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ**

**3.1. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճը և 5-ԱԼԹԻ կենսաաինթեզը  
Օրմերոդի սենդամիջավայրում**

Աշխատանքի ընթացքում ուսումնասիրվել են *Rba. capsulatus* MDC 6508, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, MDC 6511, *Rps. palustris* MDC 6506 և *Rsp. rubrum* MDC 6505 տեսակների ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաները, որոնք նախկինում անջատվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի այլ ընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայում՝ Հայաստանի տարբեր հանքային աղբյուրներից:

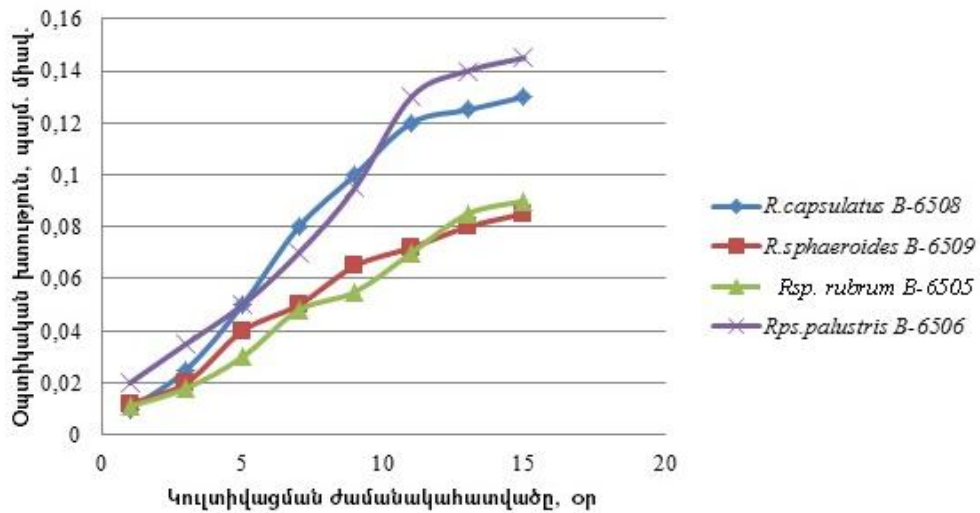
Քանի որ ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաները հատկապես ակտիվ զարգանում են ֆոտոօրգանոհետերոտրոֆ պայմաններում, դրանց պահպանման և կուլտիվացման համար օպտիմալ սենդամիջավայր է հանդիսանում 1961թ.-ին Օրմերոդի կողմից առաջարկված հեղուկ սենդամիջավայրը:

Բակտերիաների աճի գնահատումն իրականացվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ 520 նմ ալիքի երկարության տակ:

Օրմերոդի սենդամիջավայրում, աճի համանման պայմանների դեպքում (2000 լյուքս լուսավորություն, 28°C, 15 օր ինկուբացման ժամանակահատված) ընտրված կուլտուրաները, ելնելով իրենց տեսակային առանձնահատկություններից, ցուցաբերել են աճի տարբեր դինամիկա, ինչպես ցույց է տրված նկար 10-ում:

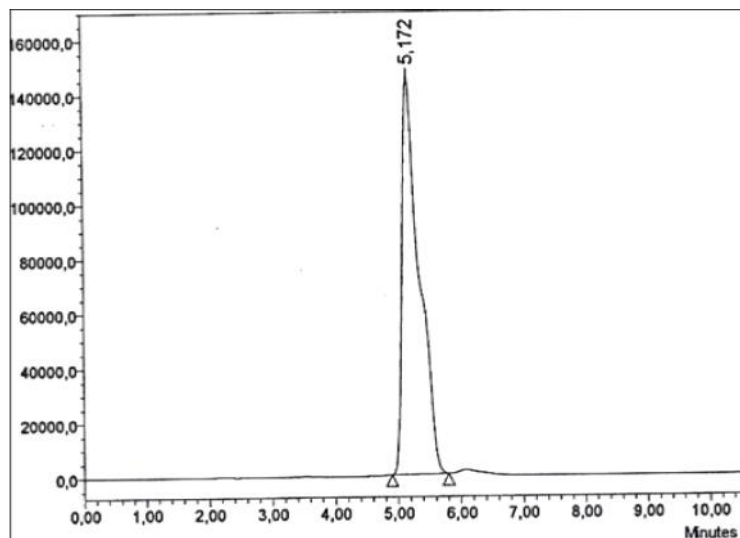
Ստացված տվյալների համաձայն, կուլտիվացման միևնույն ժամանակահատվածում *Rba. azotoformans* MDC 6508 և *Rps. palustris* MDC 6506 կուլտուրաների մոտ, համեմատած *Rba. sphaeroides* MDC 6509 և *Rsp. rubrum* MDC 6505 կուլտուրաների՝ կենսազանգվածի կուտակումն ավելի ինտենսիվ է:





**Նկար 10. Ծիրանագույն և ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճի դինամիկան**

Չետագա ուսումնասիրություններն ուղղված են եղել Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում *Rba. capsulatus* MDC 6508, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, MDC 6511, *Rps. palustris* MDC 6506 և *Rsp. rubrum* MDC 6505 ծիրանագույն և ոչ ծծմբային բակտերիաների շտամների կուլտիվացման ընթացքում 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերմանը: Այս նպատակով իրականացվել է կուլտուրալ հեղուկների ԲԱՐՔ անալիզ (նկար 11):

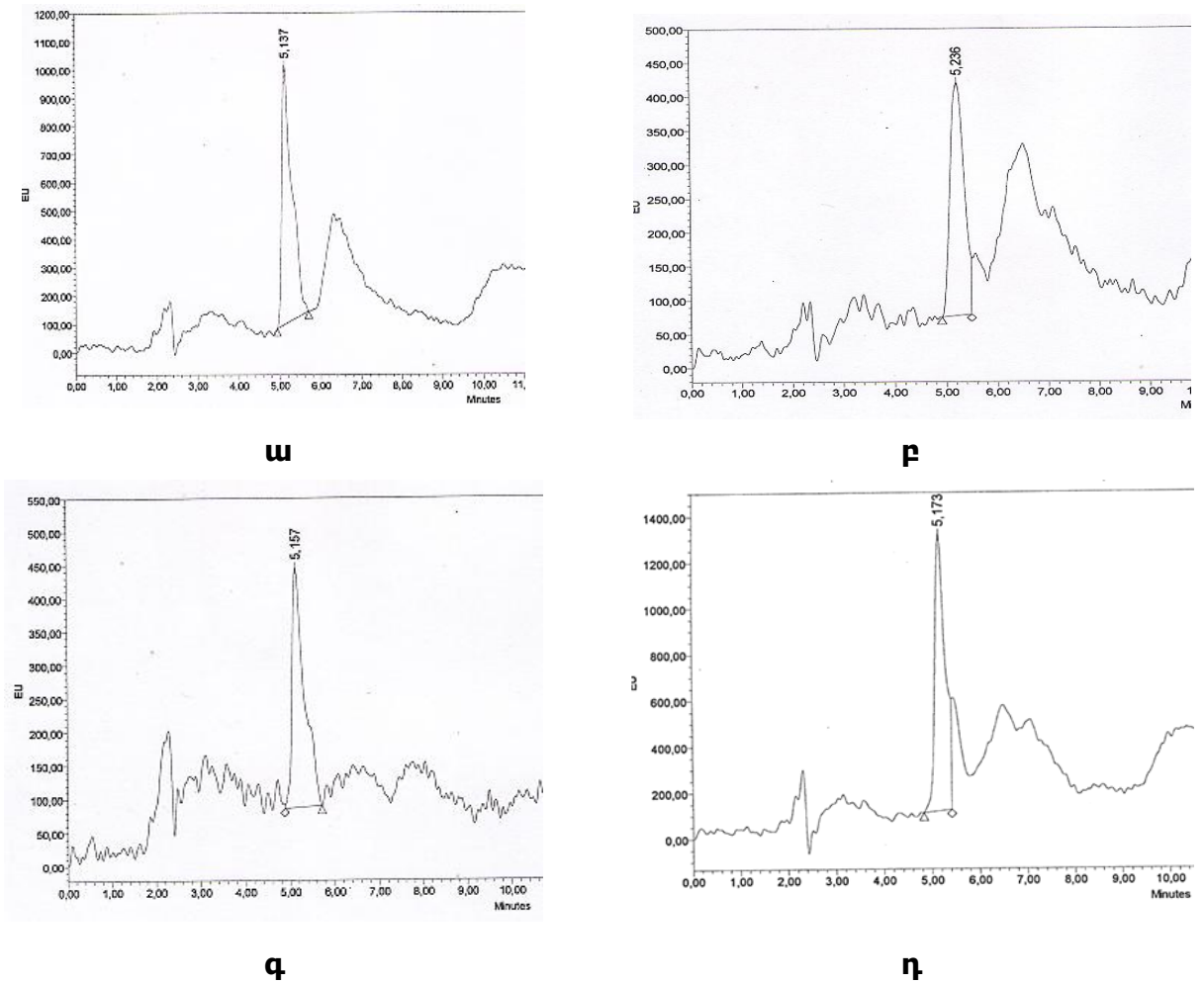


**Նկար 11. 5-ԱԼԹ-ի հիդրոբլ որիդի ստանդարտնմուշի ԲԱՐՔ քրոմատոգրամ**

Ինչպես երևում է քրոմատոգրամից, 5-ԱԼԹ-ի էլքի ժամանակահատվածը կազմում է 316 վրկ: Չետագոտվող նյութը հեշտությամբ որոշվում է, ինչը թույլ է տալիս օգտագործել այս մեթոդն ինչպես 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերման, այնպես էլ հետազոտվող ծիրանագույն բակտերիաների կուլտուրալ

հեղուկներում 5-ԱԼԹ-ի քանակական գնահատման համար: Միաժամանակ, համապատասխան նախնական մշակումից հետո անալիզի համար նախապատրաստվել են 5-ԱԼԹ-ի պոտենցիալ արտադրիչ հանդիսացող *Rba. capsulatus* MDC 6508, *Rba.sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505, *Rps. palustris* MDC 6506 ընտրված շտամների կուլտուրալ հեղուկները:

Նկար 12-ում ներկայացված են վերոնշյալ շտամների կուլտուրալ հեղուկների ԲԱՔՔ անալիզները, որոնցից երևում է, որ դրանք պարունակում են 5-ԱԼԹ՝ ստանդարտի համամասնությամբ:



**Նկար 12. Ճիրանագույն ու ծծմբային ֆոսֆորներով քվանտիտատիվ անալիզի կուլտուրալ հեղուկների ԲԱՔՔ քրոմատոգրամները**  
 (ա - *Rba.sphaeroides* MDC 6509, բ - *Rsp. rubrum* MDC 6505, գ - *Rba. capsulatus* MDC 6508, դ - *Rps. palustris* MDC 6506)

Ստացված տվյալների համաձայն հաշվարկվել են 5-ԱԼԹ-ի կոնցենտրացիաները (աղյուսակ 3):

**Օրմերոդի սննդամիջավայրում աճեցված ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների կուլտուրալ հեղուկներում 5-ԱԼԹ-ի կոնցենտրացիաները**

Չ/հ	5-ԱԼԹ-ի շտամ-արտադրիչ	5-ԱԼԹ-ի կոնցենտրացիան կուլտուրալ հեղուկում, մգ/լ
1.	<i>Rba.sphaeroides</i> MDC 6509	13.0
2.	<i>Rsp. rubrum</i> MDC 6505	1.8
3.	<i>Rba.capsulatus</i> MDC 6508	2.5
4.	<i>Rps.palustris</i> MDC 6506	13.3

Այսպիսով, հաստատվել է, որ Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում աճի ստանդարտ պայմաններում կուլտիվացված ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաների շտամները սինթեզում են 5-ԱԼԹ: Արդյունքների վերլուծության համաձայն, *Rba.sphaeroides* MDC 6509, *Rsp. rubrum* MDC 6505, *Rba.capsulatus* MDC 6508 և *Rps.palustris* MDC 6506 կուլտուրաները հանդիսացել են 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչներ, որոնք սինթեզում են համապատասխանաբար 13.0, 1.8, 2.5 և 13.3 մգ/լ 5-ԱԼԹ: Այս շտամներն ընտրվել են նպատակային նյութի ելքի ավելացմանս ուղղված հետազար ուսումնասիրությունների համար:

**3.2. Բակտերիաների աճը ածխածնի տարբեր աղբյուրներ պարունակող սննդամիջավայրերում**

Ընտրված շտամների կողմից նպատակային նյութի ելքի ավելացմանս ուղղված հետազար ուսումնասիրությունների համար ընտրվել են ածխածնի տարբեր աղբյուրներ և վիտամիններ (բիոտին, նիկոտինաթթու, թիամին) պարունակող սննդամիջավայրեր: Գրականությունից հայտնի է, որ ծիրանագույն ֆոտոսինթեզող բակտերիաները կարող են աճել տարբեր օրգանական միացություններ պարունակող սննդամիջավայրերում և բակտերիաների աճը՝ կախված ածխածնի աղբյուրից, կարող է դրսևորվել տարբեր կերպ: 5-ԱԼԹ-ի ելքը ևս, կախված սննդամիջավայրի մեջ ածխածնի աղբյուրից, կարող է տարբերվել [118]:

Հայ տնի է, նաև որ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի գործընթացում 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվության համար անհրաժեշտ է բիոտին, իսկ թիամինը հանդիսանում է հիմնականում՝ կոֆերմենտ թիամին պիրոֆոսֆատի համար, որը Շեմիևի (C<sub>4</sub>) նյութափոխանակային ուղիում  $\alpha$ -օքսազլուտարատը վերափոխում է սուկցինիլ CoA-ի: Վերջինս հանդիսանում է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի միջանկյալ միացություն:

*Rsp. rubrum* MDC 6505, *Rps. palustris* MDC 6506, *Rba. capsulatus* MDC 6508 և *Rba. sphaeroides* MDC 6509 տեսակի բակտերիաների կուլտիվացումն իրականացվել է 200 մլ տարողությամբ 12 փորձանոթների մեջ:

Օգտագործվել են GM (զլուտամատ-մալատ), GG (զլուտամատ-գլյուկոզ), GA (զլուտամատ-ացետատ) սննդամիջավայրերը: Բոլոր սննդամիջավայրերը պարունակել են բիոտին, նիկոտինաթթու և թիամին: Կուլտիվացիան իրականացվել է 1800-2000 լյուքս լուսավորության և 28-30°C ջերմաստիճանի պայմաններում:

**Աղյուսակ 4**

**Չեստգոտլող շտամների կենսազանգվածների քանակները՝ կախված կուլտիվացման ժամանակահատվածից**

Կուլտիվացում (ժամ)	Շտամներ			
	<i>Rsp. rubrum</i>	<i>Rps. palustris</i>	<i>Rba. capsulatus</i>	<i>Rba. sphaeroides</i>
	Կենսազանգված (գ/լ)			
24	0.27	0.23	0.4	0.3
48	0.42	0.51	0.96	0.88
72	0.99	0.93	1.73	1.56
96	1.3	1.21	2.4	2.1
120	1.4	1.29	2.42	2.16

Բակտերիաների աճը գնահատվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով, ինչպես նաև կուլտուրալ հեղուկներում չոր կենսազանգվածների քանակների որոշման միջոցով: Նմուշների օպտիկական խտությունը որոշվել է 520 նմ ալիքի երկարության տակ □աղյուսակ 4, 5□:

**Աղյուսակ 5**

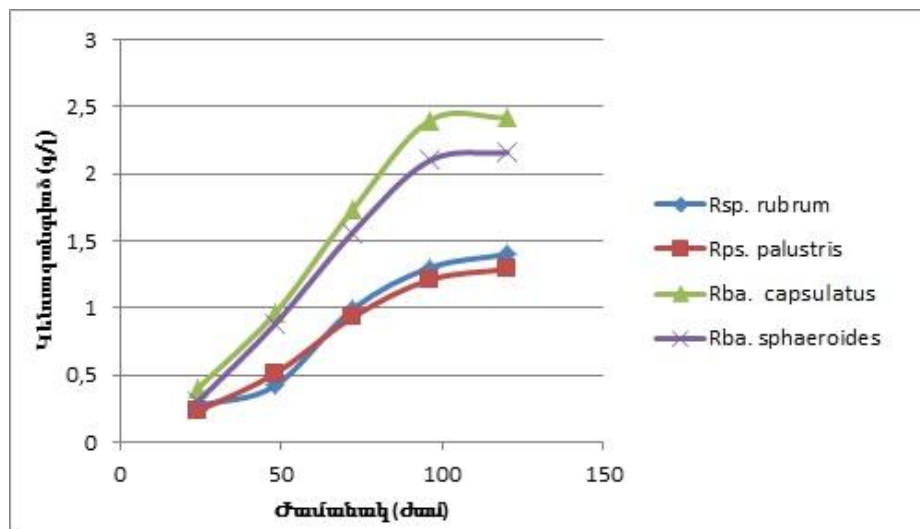
**Բակտերիաների աճը GM, GG և GA սննդամիջավայրերում**

Շտամ	Սննդամիջավայրեր
------	-----------------

	GM (գլ ու տամառ- մալատ)	GG (գլ ու տամառ- գլյուկոզ)	GA (գլ ու տամառ- ացետատ)
<i>Rsp. rubrum</i> MDC 6505	++	-	++
<i>Rps. palustris</i> MDC 6506	++	-	+
<i>Rba. capsulatus</i> MDC 6508	+++	+++	+
<i>Rba. sphaeroides</i> MDC 6509	+++	+++	+

Նշումներ՝ + - աննշան, ++ - միջին, +++ - լավ, - - աճի բացակայություն

Ստացված տվյալների համաձայն, GG սննդամիջավայրում աճի առավել բարձր ելք դիտվել է *Rba. capsulatus* և *Rba. sphaeroides* տեսակների բակտերիաների մոտ: Ուսումնասիրվող բույսի բակտերիաների մոտ աճի ցածր ելք նկատվել է GA, իսկ լավագույն արդյունք՝ GM սննդամիջավայրում կուլտիվացման դեպքում: Ուստի, այս շտամների կողմից սինթեզվող 5-ԱԼԹ-ի ելքի ավելացման ուղղված հետազոտությունների համար որպես լավագույն սննդամիջավայր ընտրվել է GM սննդամիջավայրը: Նկար 13-ում ներկայացված են հետազոտվող շտամների աճի կորերը:



**Նկար 13. Հետազոտվող շտամների աճի դինամիկան GM սննդամիջավայրում**

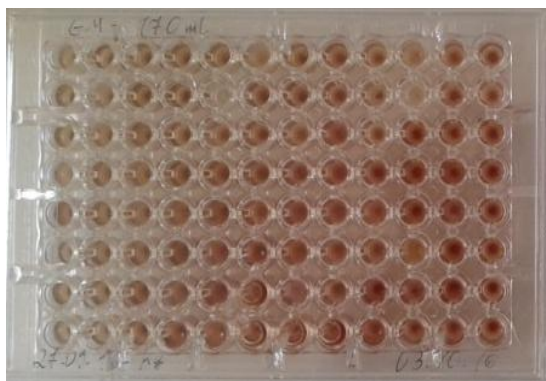
**ԳԼՈՒԽ 4. ՖՈՏՈՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼԵՐԻ ՄՈՒՏԱԳԵՆԵԶ ԵՎ 5-ԱԼԹԻ  
ԼԱՎԱԳՈՒՅՆ ԱՐՏԱԴՐԻՉ ՇՏԱՄԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆ**

Իրականացվել է *Rsp. rubrum*, *Rps. palustris*, *Rba. capsulatus* և *Rba. sphaeroides* տեսակի բակտերիաների մուտագենեզ:

Մուտագենեզի համար օգտագործվել է N-մեթիլ -N-նիտրո -N-նիտրոզոգուլանիդին, որից հետո կուլտուրաները հաջորդական նոսրացումներով ցանվել են ագարային սննդամիջավայրի վրա: Ագարային սննդամիջավայրի վրա աճ գաղութները տեղափոխվել են միկրոտիտրային պլատաների վրա՝ GM սննդամիջավայրի մեջ: 48 ժամ կուլտիվացնելուց հետո սննդամիջավայրին ավելացվել են սուկցինատ, գլիցին և լևուլինաթթու՝ համապատասխանաբար 30, 30 և 15 մմոլ /լ կոնցենտրացիաներով:

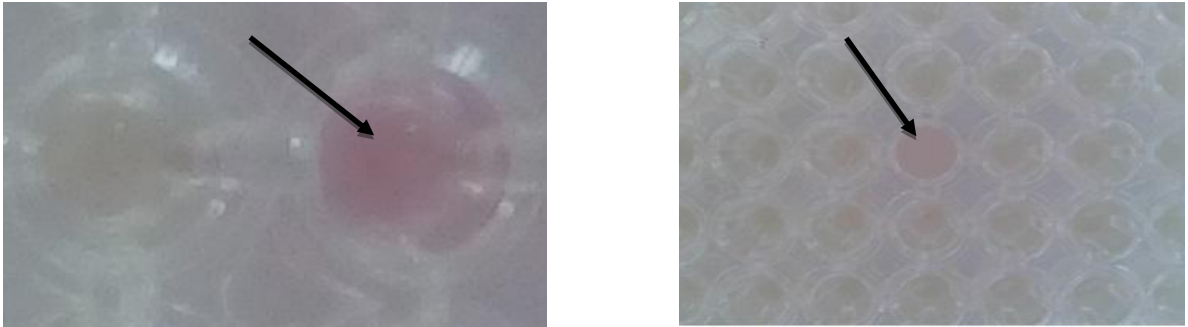
Նշված նյութերն ավելացնելուց հետո կուլտիվացիան շարունակվել է ևս 24 ժամ: 5-ԱԼԹ-ի առավել ակտիվ շտամ-արտադրիչներ մեկուսացնելու նպատակով միկրոտիտրային պլատայի մեջ աճած կուլտուրաներից համապատասխանաբար

10-ական մկլ տեղափոխվել են նոր միկրոտիտրային պլատայի մեջ, որտեղ իրականացվել է սելեկցիա՝ Էրլիխի գուլանաչափական եղանակով: Գուլանային ռեակցիայի միջոցով հայտնաբերվել են այն կուլտուրաները, որոնց մեջ սինթեզվել է 5-ԱԼԹ: Ուսումնասիրվել են *Rba. capsulatus* և *Rba. sphaeroides* շտամների շուրջ 9700-ական գաղութները (նկար 14, 15):



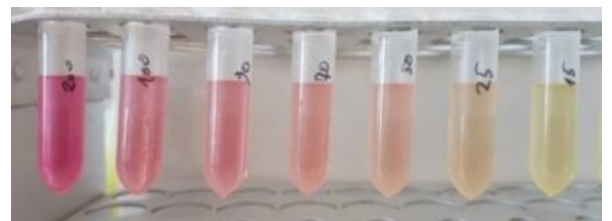
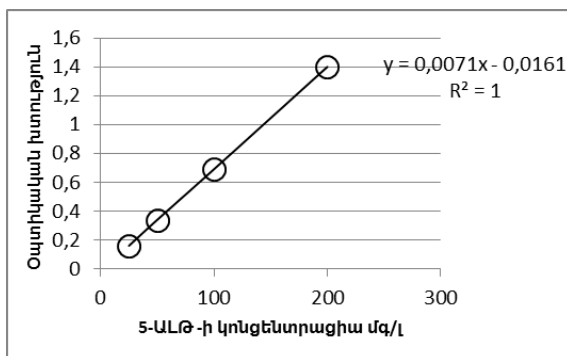
**Նկար 14. Բակտերիաների աճը միկրոտիտրային պլատայի վրա (96 կուլտուրա)**

*Rps. palustris* MDC 6506, *Rba. capsulatus* MDC 6508, *Rba. sphaeroides* MDC 6509 շտամների մուտագենեզի արդյունքում ընտրվել են 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող *Rba. capsulatus*-ից (D-7, D-8, E-1, E-5, E-10, MDC 10, F-5, F-6, G-3, G-4) և *Rba.sphaeroides*-ից (A-12, MDC 10, C-8, D-7, E-11, F-7, F-10, G-9, G-10) շտամները:



**Նկար 15. Էրլիխի գուլնաչ ախական մեթոդով դրական ռեակցիացուցաբերած 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող շտամի հայ տնաբերումը**

Էրլիխի գուլնաչ ախական և ՆՇՔ մեթոդներով 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող 19 շտամներից ընտրվել է 5-ԱԼԹ-ի առավել ակտիվ արտադրիչ E-10 շտամը: Էրլիխի գուլնաչ ախական եղանակով ստացված գուլնային ռեակցիայի արդյունքները գնահատվել են սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ լուծույթների օպտիկական խտությունները 553 նմ ալիքի երկարության տակ չափելու միջոցով: Նմուշների մեջ 5-ԱԼԹ-ի քանակը որոշվել է տրամաչափիչ կորի միջոցով: Փորձարարական նմուշներում Էրլիխի գուլնաչ ախական եղանակով 5-ԱԼԹ-ի կոնցենտրացիան որոշելու նպատակով նախև առաջ կառուցվել է քիմիապես մաքուր առևտրային 5-ԱԼԹ-ի հիդրոքլորիդի (Sigma-Aldrich) տրամաչափիչ կորը (նկար 16, 17):



բ

ա

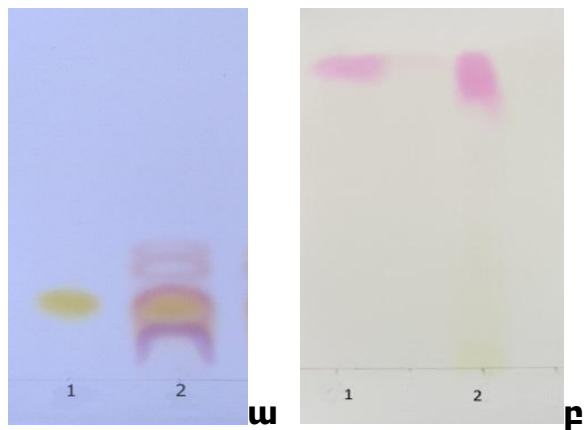
**Նկար 16. ա 5-ԱԼԹ-ի կոնցենտրացիայի հաշվման սրամաք ալիջ կորը ( $\lambda=553$  նմ), բ- հայտնի կոնցենտրացիաներով 5-ԱԼԹ-ի նմուշների գույնավորումը՝ էրլիիի մեակցիայից հետո (ծափից աջ՝ 200 մգ/լ, 100 մգ/լ, 90 մգ/լ, 70 մգ/լ, 50 մգ/լ, 25 մգ/լ, 15 մգ/լ)**



**Նկար 17. E-10 շտամի կուլտուրալ հեղուկի գույնային մեակցիան՝ ստացված էրլիիի գույնաքափայլումով**

ՆՇՔ եղանակով կատարվել է 5-ԱԼԹ-ի առավել ակտիվ արտադրիչ հանդիսացող E-10 շտամի կուլտուրալ հեղուկի ուսումնասիրություն: Որպես ստուգիչ օգտագործվել է 5-ԱԼԹ-ի հիդրոքլորիդի հայտնի քանակությամբ ջրային լուծույթը: Կուլտուրալ հեղուկի և ացետիլացետոնի պարունակությամբ ացետատ բուֆերի մեակցիայից հետո ստացված լուծույթից կաթեցվել է ՆՇՔ թիթեղի վրա:

ՆՇՔ թիթեղը լուծիչի մեջ համապատասխան ժամանակահատվածում մնալուց հետո չորացվել է և ներկվել էրլիիի մեակտիվի միջոցով: Ներկելու արդյունքում ՆՇՔ թիթեղի վրա ի հայտ են եկել երկու բծեր, որոնք ունեցել են նույն գույնավորումը և նույն  $R_f$ -ը, ինչը վկայում է E-10 շտամի կուլտուրալ հեղուկի մեջ 5-ԱԼԹ-ի առկայության մասին: Արդյունքները բերված են նկար 18-ում:



**Նկար 18. E-10 շտամի կուլտուրալ հեղուկի անալիզ ՆՇՔ-ի մեթոդով**



**(1) 5-ԱԼԹ-ի հիդրոքլորիդ (ստանդարտ), (2) E-10 շտամ, ա ներկված նիսհիդրիսի միջոցով, բ- 5-ԱԼԹ-ի և ագեսիլ ագեստնի ռեակցիայի արդյունքում մ ձևավորված պիրոլային միացություններ ներկված էրլիի ռեակտիվի միջոցով**

ԲԱՅԲ-ի եղանակով իրականացվել է նաև E-10 շտամի կուլտուրալ հեղուկի անալիզ: ԲԱՅԲ անալիզի արդյունքները ցույց են տվել, որ 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող E-10 շտամը սինթեզել է 179 մգ/լ 5-ԱԼԹ, միևնույն ժամանակ *Rba. capsulatus* հիմնական շտամը սինթեզել է ընդամենը 2.5 մգ/լ քանակությամբ 5-ԱԼԹ:

**ԳԼՈՒԽ 5. ԾԻՐԱՆԱԳՈՒՅՆ ՈՉ ԾՏՄԲԱՅԻՆ ՖՈՏՈՍԻՆՏԵՆՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ-ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄ**

Բակտերիաները կուլտիվացվել են Էրլեմեյերի փորձանոթների մեջ՝ 1800 լյուքս լուսավորության, 29°C ջերմաստիճանի և միկրոաերոբ պայմաններում: Կուլտիվացումն իրականացվել է GM սննդամիջավայրի մեջ՝ 72 ժամ տևողությամբ:

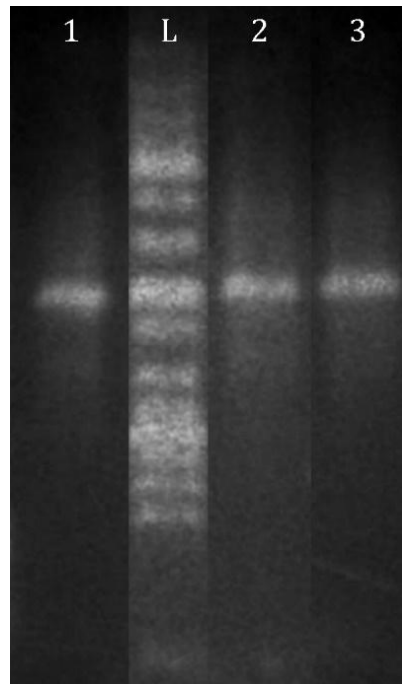
Յետազոտության համար յուրաքանչյուր կուլտուրայից վերցվել են 10-ական մլ նմուշներ: Նմուշները ցենտրիֆուգվել են, վերնստվածքային հեղուկները հեռացվել, իսկ կենսազանգվածներն օգտագործվել են ԴՆԹ-ի անջատման նպատակով: ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացվել է բենզիլ քլորիդի միջոցով [192]:

Պոլիմերազի շղթայական ռեակցիայի միջոցով 16S գենի ամալիֆիկացման համար օգտագործվել են 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) և 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT) ունիվերսալ պրայմերները: ՊՇՌ պրոդուկտների ուսումնասիրությունը կատարվել է գել էլեկտրոֆորեզի հորիզոնական համակարգով, որի համար օգտագործվել է 1.0 % ագարոզ: Գել էլեկտրոֆորեզի կիրառման արդյունքում բաժանված գեների հատվածները գնահատվել են UV-տրանսիլյուսմի նատորի վրա: ՊՇՌ-ի միջոցով ամալիֆիկացված 16S ռՌՆԹ գենի սեքվենավորումն իրականացվել է Մակրոգեն ընկերությունում (Յարավային Կորեա):

16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդների հաջորդականության համեմատությունը կատարվել է BLAST ալգորիթմի կիրառմամբ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [191]: Ֆիլոգենետիկ անալիզն իրականացնելու համար օգտագործվել է MEGA6 ծրագիրը [143, 169], իսկ նուկլեոտիդների հաջորդականության հավասարեցումն իրականացվել է ClustalW ալգորիթմի միջոցով [173]: Ֆիլոգենետիկ ծառերի կառուցման համար կիրառվել է Neighbor-Joining մեթոդը [41]:

Այս հետազոտության ընթացքում ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների երկու շտամների գենետիկական նույնականացումը կատարվել է 16S ռՌՆԹ գենի սեքվենավորման մեթոդով, որին հաջորդել է նուկլեոտիդային հաջորդականության համեմատությունը միջազգային Gene Bank տվյալների բազայում

պահպանվող գեների հաջորդականությունների հետ: Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցվել են ֆիլոգենետիկ ծառեր: ԴՆԹ-ի անջատման արդյունքում ստացվել են բարձր կոնցենտրացիայով ԴՆԹ-ի նմուշներ, որոնք կազմել են 80-150 նգ/մկլ: ՊՇՌ-ի միջոցով ամպլիֆիկացվել է 1500 գն մոլեկուլային զանգված ունեցող 16S ռՌՆԹ գենի հատվածը: Նմուշների մեջ թիրախային գեների ամպլիֆիկացման արդյունքները ներկայացված են նկար 19-ում:



**Նկար 19. 16S ռՌՆԹ գենի ամպլիֆիկացման արդյունքում ստացված ՊՇՌ արդյունքների Eլ եկտրոֆորեզրալ, L-ԴՆԹլ աղեր (Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™), 1-«Rba. capsulatus» MDC 6508 շտալ, 2 -ՊՇՌ-ի դրական ստուգիչ 3-«Rba. sphaeroides» MDC 6509 շտալ**

Նուկլեոտիդային հաջորդականության որոշման համար օգտագործվել են ամպլիֆիկացված ՊՇՌ արդյունքները, իսկ 16S ռՌՆԹ գենի ուսումնասիրված նուկլեոտիդային հաջորդականության և ֆիլոգենետիկորեն ամենամոտ կապակցված տեսակի 16S ռՌՆԹ գենի հաջորդականության նույնականության գնահատման արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 6-ում:

16S ռՌՆԹ գենի անպիգի ընթացքում մեթոդաբանական շեղումը գնահատելու համար իրականացվել է ֆիլոգենետիկ ծառերի կառուցում: Էվոլյուցիոն կապի մասին պատկերացում կազմելու

համար օգտագործվել է Neighbor-Joining մեթոդը: Կառուցված կրկնօրինակ ծառերի ճյուղերի հիմքերում կապակցված տաքսոնները *bootstrap* թեստում (10000 կրկնօրինակներ) խմբավորվել են միասին և ներկայացված են տոկոսային հարաբերություներով:

**Աղյուսակ 6**

**Միջազգային տվյալների բազայում պահպանվող սեղեկատվության հիման վրանուկ էոսֆրային հաջորդականության նույնականացման արդյունքները**

Ուսումնասիրվող շտամի անվանումը	Չամարը	Շտամի անվանումը	Չամընկնումը, %
<b>«<i>Rba. capsulatus</i>» MDC 6508</b>	<b>NR_113300.1</b>	<b><i>Rba. azotoformans</i> JCM 9340</b>	<b>99</b>
	AB607332.1	<i>Rba. azotoformans</i>	98
	NR_036826.1	<i>Rba. azotoformans</i> KA25	98
	D70847.1	<i>Rba. azotoformans</i> SA16	97
	NR_115016.1	<i>Rba. johrii</i> JA192	97
	MG928439.1	<i>Rba. sphaeroides</i> DBNRh32	97
	NR_042585.1	<i>Rba. megalophilus</i> JA194	97
<b>«<i>Rba. sphaeroides</i>» MDC 6509</b>	<b>MG928439.1</b>	<b><i>Rba. sphaeroides</i> DBNRh32</b>	<b>95</b>
	NR_113300.1	<i>Rba. azotoformans</i> JCM 9340	94
	D70847.1	<i>Rba. azotoformans</i> SA16	93
	NR_036826.1	<i>Rba. azotoformans</i> KA25	93
	AB607332.1	<i>Rba. azotoformans</i>	93
	NR_115016.1	<i>Rba. johrii</i> JA192	92
	NR_042585.1	<i>Rba. megalophilus</i> JA194	92

Էվոլյուցիոն հեռավորություները հաշվարկվելու համար օգտագործվել է Maximum Composite Likelihood մեթոդը, իսկ էվոլյուցիոն վերլուծության ներս իրականացվել են MEGA 6-ի միջոցով:

16S ռՌՆԹ գենի հաջորդականության GenBank տվյալների բազայում պահպանվող այլ 16S ռՌՆԹ գեների հաջորդականության ներս նականացման և համեմատության համար կիրառվել է NCBI Basic Local Alignment Search Tools ալգորիթմը: Ֆիլոգենետիկ վերլուծության համար 16S ռՌՆԹ գենի հաջորդականության նույնականացումը կատարվել է Clustal W-ի միջոցով:

Ֆիլոգենետիկ ծառի տոպոլոգիայի հավաստիությունը գնահատելու համար իրականացվել են bootstrapping անալիզներ՝ 10000 կրկնօրինակների համար: Անալիզն իր մեջ ներառել է 9 նուկլեոտիդային հաջորդականություններ □նկար 20, 21□:

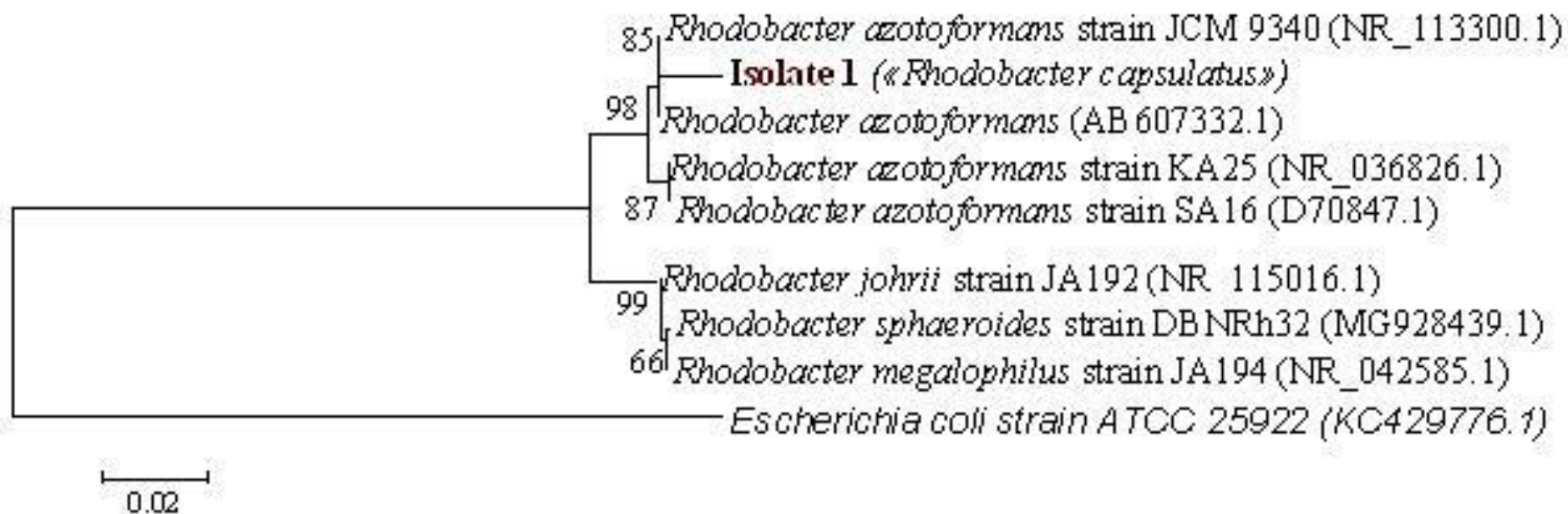
Նկար 20-ում ներկայացված ֆիլոգենետիկ ծառի ճյուղերի մոտ ցուցադրված են տոկոսային հարաբերությունները (40 % -ից բարձր ցուցանիշները): *Escherichia coli* ATCC 25922 (KC429776.1) շտամն օգտագործվել է որպես այս խմբին չպատկանող շտամ: Գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության տվյալների բազա մուտք գործելու համարները ներկայացված են փակագծերի մեջ:

Համաձայն ստացված ֆիլոգենետիկ ծառի, նմուշ 1-ի (**Isolate 1**) 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը ցուցաբերել է 99 % նմանություն *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 (NR\_113300.1) շտամի համապատասխան գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությանը:

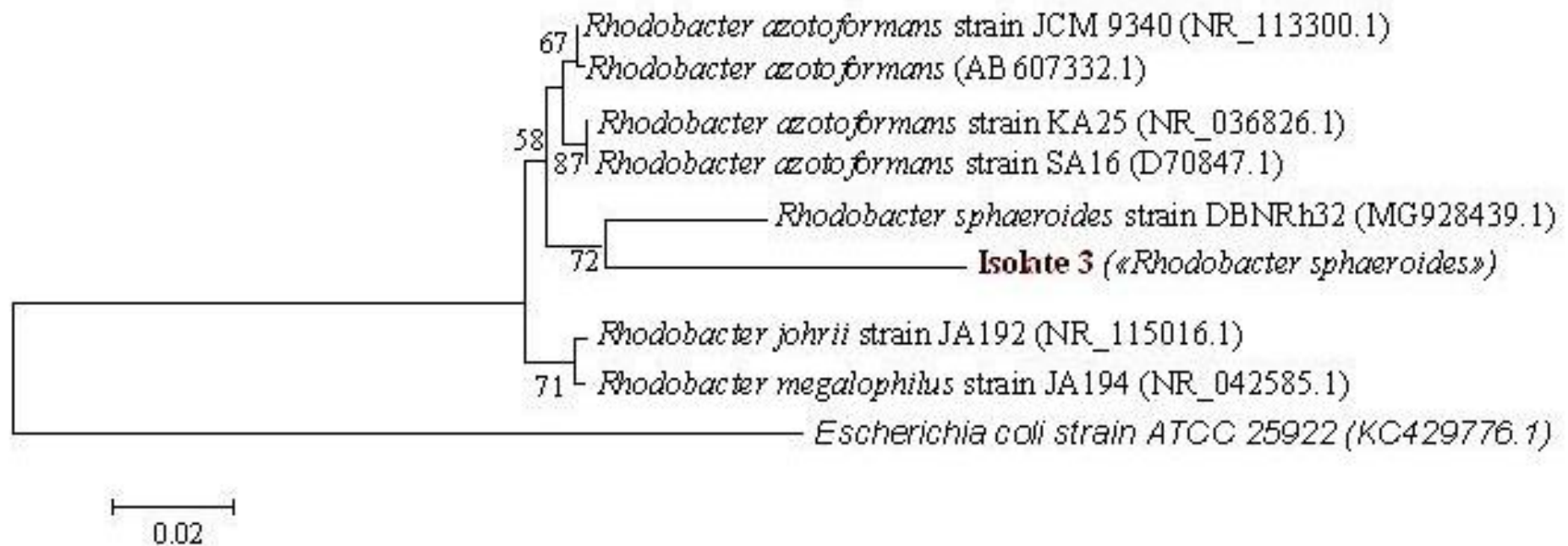
Ֆիլոգենետիկ ծառի մեջ «*Rba. capsulatus*» շտամը *Rba. azotoformans*-ի հետ համատեղվել է մեկ խմբի մեջ: Gene Bank-ի տվյալների կիրառմամբ նույնականացման միջոցով «*Rba. capsulatus*» MDC 6508 շտամը տեղակայվել է *Rba. azotoformans*-ի ֆիլոգենետիկ ճյուղերից մեկի վրա, որը ցույց է տալիս վերոնշյալ շտամի պատկանելիությունն այս տեսակին և բացառում է *Rba. capsulatus* տեսակին պատկանելու հավանականությունը:

Համաձայն կառուցված ֆիլոգենետիկ ծառի, նմուշ 3-ի (**Isolate 3**) 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը ցուցաբերել է 95 % նմանություն *Rba. sphaeroides* DBNRh32 (MG928439.1) շտամի համապատասխան գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությանը:

Համաձայն նկար 21-ում ներկայացված տվյալների, «*Rba. sphaeroides*» MDC 6509 շտամի 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը ցույց է տալիս վերոնշյալ շտամի պատկանելիությունը *Rhodobacter. sphaeroides* տեսակին:



**Նկար 20. «Rba. capsulatus» MDC 6508 շտամի ֆիլոգենետիկ դիրքը**



**Ակար 21. «*Rba. sphaeroides*» MDC 6509 շտամի ֆիլոգենետիկ դիրքը**

Այսպիսով, իրականացվել են ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների երկու շտամների մոլեկուլային գենետիկական նույնականացում՝ 16S ռՌՆԹ գենի անալիզի հիման վրա: Վերոնշյալ երկու շտամների համապատասխան գեների նուկլեոտիդային հաջորդականությունների համեմատական վերլուծության արդյունքում բացահայտվել են այս շտամների հստակ պատկանելիությունները:

Ծիրանագույն ոչ ծծմբային \$ֆոտոսինթեզող բակտերիաների վերոնշյալ երկու շտամների 16S ռՌՆԹ գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության տվյալների և միջազգային տվյալների բազայում պահպանվող տվյալների համեմատությունը ցույց է տվել, որ նախապես որպես «*Rba. capsulatus*» հայտնի MDC 6508 շտամը պատկանում է *Rba. azotoformans* տեսակին, միաժամանակ, «*Rba. sphaeroides*» MDC 6509-ի շտամի 16S ռՌՆԹ գեների նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը հաստատել է այս շտամի պատկանելիությունը *Rba. sphaeroides* տեսակին:



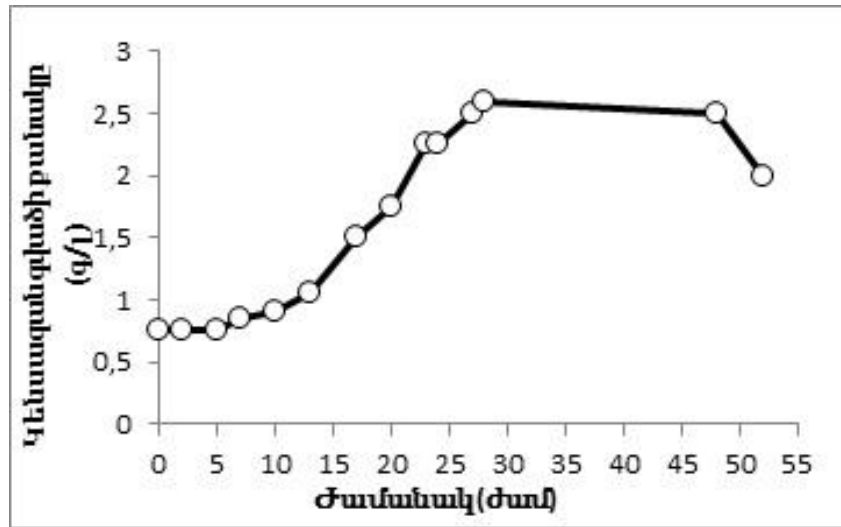
**ԳԼՈՒԽ 6. 5-ԱԼԹ-Ի ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄԱԼ ԱՑՈՒՄ**

**6.1. E-10 շտամի աճի և 5-ԱԼԹ-ի ելքի գնահատումը և լուսավորության, մթնոլորտային, միկրոատերոբ և աերոբ պայմաններում**

E-10 շտամի կուլտիվացման պայմանների օպտիմալացման նպատակով ուսումնասիրվել է բակտերիաների աճը և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը GM սննդամիջավայրում՝ աերոբ և միկրոատերոբ, լուսավորության և մթնոլորտային պայմաններում: Միկրոատերոբ և լուսավորության պայմաններում կուլտիվացումն իրականացվել է 1800 լյուքս լուսավորության, 28-30°C ջերմաստիճանում, ապակե խցաններով փակված փորձանոթների մեջ:

Աերոբ և լուսավորության պայմաններում կուլտիվացումն իրականացվել է բամբակյա խցաններով ապակե փորձանոթներում, լուսավորության և ջերմաստիճանի նույն պայմաններում: 24 ժամ կուլտիվացումից հետո վերցվել են 2-ական մլ նմուշներ և ցենտրիֆուգվել 7200 g արագացմամբ 20 րոպե: Վերնստվածքային հեղուկներն օգտագործվել են 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերման, իսկ կենսազանգվածը՝ չոր կենսազանգվածի որոշման համար, որի նպատակով թաց կենսազանգվածը չորացվել է 105°C ջերմաստիճանում 24 ժամ:

Քանի որ և կուլտիվացումը և գլիցինը արգելակիչ ազդեցություն են թողնում բակտերիաների աճի վրա անհրաժեշտ է որոշել սուկցինատի, գլիցինի և կուլտիվացվածի ավելացման պահը: 5-ԱԼԹ-ի առավելագույն սինթեզի համար անհրաժեշտ է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի միջանկյալ միացությունները (գլիցին, սուկցինատ) և 5-ԱԼԹ դեհիդրատազ ֆերմենտի արգելակիչ համարվող կուլտիվացումը կուլտուրալ հեղուկին ավելացնել բակտերիաների աճի և լոգարիթմական փուլի ավարտին, երբ առաջացել է առավելագույն քանակությամբ կենսազանգված: Ուստի որոշվել են բակտերիաների չոր կենսազանգվածները միկրոատերոբ և լուսավորության պայմաններում կուլտիվացման դեպքում (նկար 22):



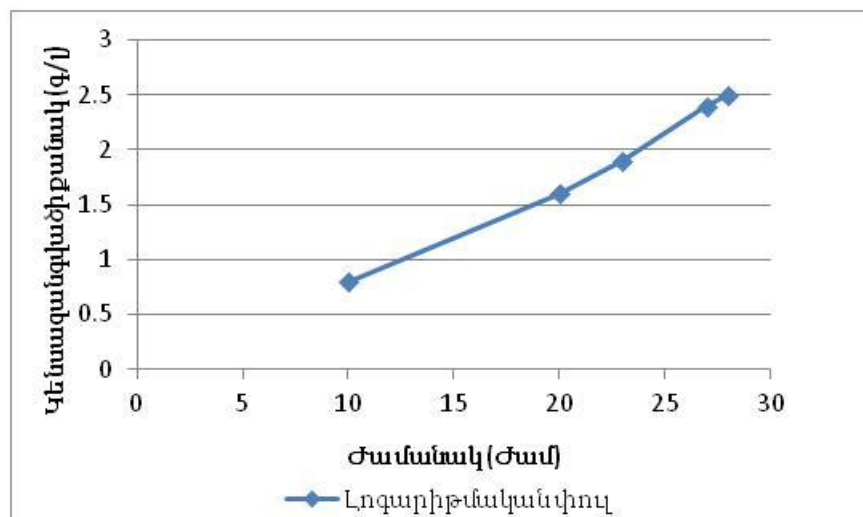
**Նկար 22. Չոր կենսազանգվածի քանակը կուլ տիվացման ընթացքում**

Աճի գործակիցը հաշվարկվել է աճի և ոգարիթմական փուլում հետևյալ բանաձևով.

$$\ln N = \mu t + \ln N_0$$

$$\mu = \frac{\ln(N/N_0)}{t}$$

որտեղ՝  $N$ -ը կենսազանգվածի քանակն է  $t$  ժամանակում,  $N_0$ -ն՝ կենսազանգվածի քանակն է կուլ տիվացման սկզբում: Աճի գործակիցը կազմել է  $0.09 \text{ օ}^{-1}$  (նկար 23):



**Նկար 23. Կենսազանգվածի քանակը աճի և ոգարիթմական փուլի ընթացքում**

Ելնելով ստացված արդյունքներից կենսազանգվածի առավելագույն ելք դիտվել է կուլ տիվացումից 28 ժամ անց:

Բակտերիաների 28 ժամ կուլի տիվացումից հետո կենսազանգվածի առավելագույն ելքը լուսավորության և միկրոատերոբ պայմաններում կազմել է 2.6 գ/լ, իսկ լուսավորության և անոբ պայմաններում՝ 2.5 գ/լ: Անոբ պայմաններում 28 ժամ կուլի տիվացումից հետո կուլի տուրաներին ավելացվել են սուկցինատ, գլիցին և լևուլինաթթու: Եվս 24 ժամ անոբ պայմաններում կուլի տիվացումից հետո 5-ԱԼԹ-ի քանակը կուլի տուրալ հեղուկում կազմել է 58.1 մգ/լ:

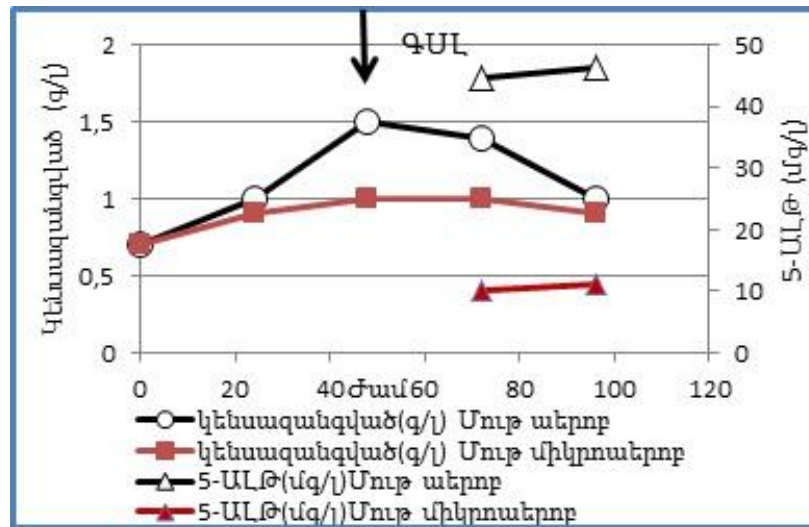
Միկրոատերոբ և լուսավորության պայմաններում կուլի տիվացման ժամանակ կենսազանգվածի առավելագույն ելք՝ 2.6 գ/լ, դիտվել 28 ժամ կուլի տիվացումից հետո, որից հետո ավելացվել է սուկցինատ, գլիցին և լևուլինաթթու: Եվս 24 ժամ կուլի տիվացումից հետո կենսազանգվածի ելքը կազմել է 2.5 գ/լ, 48 ժամ հետո՝ 2.3 գ/լ, իսկ 72 ժամ անց՝ 2.25 գ/լ:

Պարզվել է, որ երկարատև կուլի տիվացման դեպքում կրճատվում է 5-ԱԼԹ-ի քանակը: Ենթադրվում է, որ դա կապված է կենսազանգվածի, լույսի ինտենսիվության և pH-ի փոփոխման հետ, որոնք ազդում են 5-ԱԼԹ սինթեզի ակտիվության վրա: Հնարավոր է նաև, որ կուլի տուրալ հեղուկում 5-ԱԼԹ-ի կուտակման դեպքում այն յուրացվում է բակտերիաների կողմից: Այս փորձի ընթացքում 5-ԱԼԹ-ի առավելագույն քանակությունը՝ 179 մգ/լ, դիտվել է կուլի տուրալ հեղուկին գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելուց 24 ժամ անց, իսկ 48 և 72 ժամ կուլի տիվացումից հետո 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է համապատասխանաբար 124.5 և 85.5 մգ/լ:

Տարբեր պայմաններում E-10 շտամի կուլի տիվացումից պարզ է դարձել, որ լուսավորության և միկրոատերոբ պայմաններում կուլի տիվացումը լավագույնն է այս շտամի աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար: Նշված պայմաններում կուլի տիվացման համար ծախսվում է բավական էներգիա: 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը տնտեսապես ավելի արդյունավետ դարձնելու համար որոշվել է այն ուսումնասիրել մոլթատերոբ և մոլթամիկրոատերոբ պայմաններում:

Մոլթ պայմաններում E-10 շտամի կուլի տիվացման ժամանակ առավելագույն կենսազանգված ստացվել է 48 ժամ կուլի տիվացումից հետո:

Նկար 24-ից երևում է, որ մոլթ ատրոբ պայմաններում շտամի կոռլ տիվացման դեպքում սինթեզվել է 46.5 մգ/լ 5-ԱԼԹ, իսկ մոլթ միկրոատրոբ պայմաններում՝ 11 մգ/լ (մոտավորապես 4 անգամ ավելի):



**Նկար 24. 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ E-10 շտամի կոռլ տիվացումն ատրոբ և միկրոատրոբ պայմաններում՝ մթոնթյան մեջ (ԳՍԼ-գլ իցին, սուկցինատ և ԼուԼ ինաթթու)**

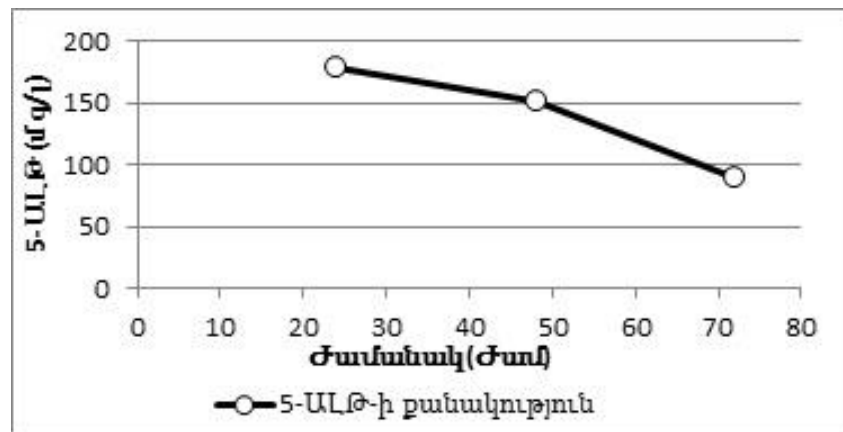
Ելնելով վերը նշվածից պարզ է դառնում, որ մթոնթյան պայմաններում կոռլ տիվացման դեպքում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար կոռլ տուրալ հեղուկում անհրաժեշտ է թթվածնի առկայություն:

Համեմատելով E-10 շտամի կոռլ տիվացումը և ուսավորության և մթոնթյան պայմաններում՝ ակնհայտ է դարձել, որ և ույսի ինտենսիվությունը և թթվածնի փոքր քանակության առկայությունը շատ կարևոր գործոններ են վերոնշյալ մոլտանտ շտամի աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար: 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ E-10 շտամի 28 ժամ և ուսավորության և միկրոատրոբ պայմաններում կոռլ տիվացման արդյունքում ստացված տվյալները 48 և 72 ժամում ստացված արդյունքների հետ համեմատելիս պարզվել է, որ 28 ժամ կոռլ տիվացումից հետո բակտերիաները գտնվում են ֆիզիոլոգիապես առավել ակտիվ վիճակում: Արդյունքները հաստատվել են նաև մանրադիտակային հետազոտություններով:

Լուսավորության և միկրոատրոբ պայմաններում կոռլ տիվացման դեպքում գլիցինի, սուկցինատի և ԼուԼ ինաթթվի

ավելացրել մինչ 24 ժամ հետո 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 179 մգ/լ, իսկ 48 և 72 ժամ հետո՝ համապատասխանաբար 124.5 և 89.5 մգ/լ: Կոլլ տիվացրել մինչ 24, 48, և 72 ժամ անց կենսազանգվածի էլքը կազմել է համապատասխանաբար 2.6, 2.3 և 2.25 գ/լ (նկար 25):

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները՝ կարելի է նշել, որ E-10 մոլտանտ շտամի կողմից առավելագույն քանակությամբ 5-ԱԼԹ սինթեզվում է լուսավորության և միկրոատերոբ պայմաններում կոլլ տիվացման դեպքում:



**Նկար 25. 5-ԱԼԹ-ի էլքը՝ կախված կոլլ տիվացման ժամանակահատվածից**

Չամաձայն ստացված տվյալների, 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար նպատակահարմար է համարվել կոլլ տիվացումն անընդհատ լուսավորության և միկրոատերոբ պայմաններում: Այդ իսկ պատճառով E-10 շտամի հետագա կոլլ տիվացումն իրականացվել է լուսավորության և միկրոատերոբ պայմաններում:

Արդյունքներից պարզ է դարձել, որ առավելագույն քանակությամբ կենսազանգված ստացվել է կոլլ տիվացումից 28 ժամ անց: Այս փաստը հատկապես կարևոր է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի նպատակով կոլլ տուրալ հեղուկին գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացման համար: Գրական տվյալների համաձայն, 5-ԱԼԹ-ի առավելագույն քանակությամբ սինթեզի համար նշված նյութերը պետք է ավելացնել կոլլ տուրալ հեղուկին աճի էքսպրեսնցիալ փուլի ավարտին: Չետագոտության ընթացքում պարզվել է, որ կենսազանգվածի առավելագույն էլք դիտվել է կոլլ տիվացումից 28 ժամ հետո:

Յետագա 24 ժամ կոլլտիվացման դեպքում կենսազանգվածի քանակն էական փոփոխության չի ենթարկվել :

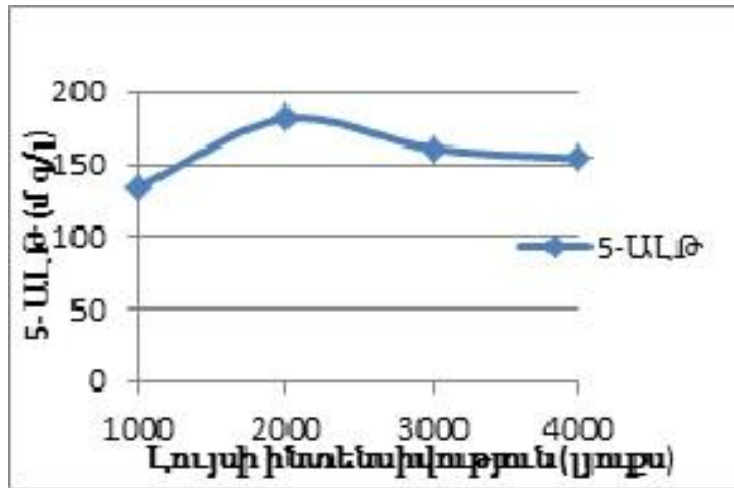
**6.2. Լույսի ինտենսիվության, ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունները**

**5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

Ուսումնասիրվել են լույսի ինտենսիվության, ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունները 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա: Լույսը շատ կարևոր գործոն է հանդիսանում ֆոտոսինթեզող բակտերիաների համար, հետևաբար, կախված լույսի ինտենսիվությունից՝ կարող են փոփոխվել նաև նրանց աճը և նյութափոխանակությունը: 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա լույսի ինտենսիվության ազդեցությունը բացահայտելու նպատակով ընտրված շտամը կոլլտիվացվել է համապատասխանաբար 1000, 2000, 3000 և 4000 լյուքս լուսավորության պայմաններում:

Լուսավորությունն ապահովվելու համար օգտագործվել են տարբեր հզորությամբ վոլֆրամային լամպեր և էլեկտրական տրանսֆորմատոր: Լուսավորությունը չափվել է լյուքս-մետրի միջոցով: 28 ժամ կոլլտիվացումից հետո կոլլտուրալ հեղուկներին ավելացվել են գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու՝ համապատասխանաբար 30, 30 և 15 մմոլ/լ կոնցենտրացիաներով: Դրանից 24 ժամ հետո կոլլտուրալ հեղուկների մեջ որոշվել են սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակները:

Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ 1000, 2000, 3000 և 4000 լյուքս լույսի ինտենսիվության պայմաններում սինթեզվել է համապատասխանաբար 134, 182, 161 և 154 մգ/լ քանակությամբ 5-ԱԼԹ (նկար 26, աղյուսակ 7):



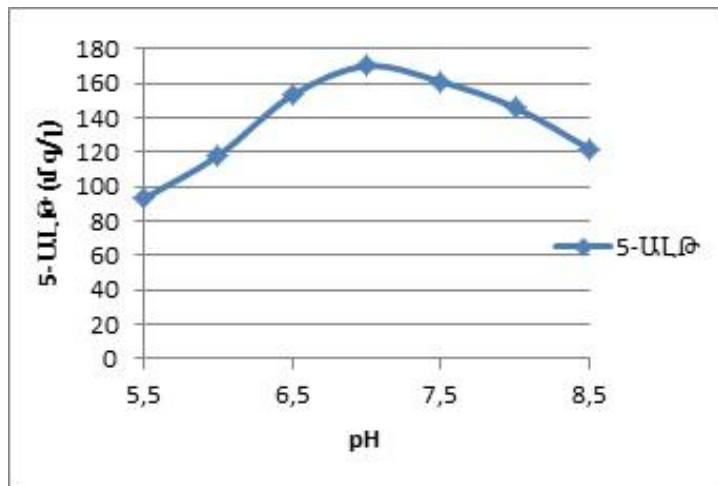
**Նկար 26. Լույսի ինտենսիվության ազդեցությանը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

**Աղյուսակ 7  
Լույսի տարբեր ինտենսիվության դեպքում սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակները**

Լուսավորության (լ/լ)	1000	2000	3000	4000
5-ԱԼԹ (մգ/լ)	134	182	161	154

рН-ի ազդեցությանը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի արդյունավետության վրա գնահատելու համար պատրաստվել են սնդամիջավայրեր՝ рН-ի համապատասխանաբար 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 և 8.5 արժեքներով:

Կուլտիվացումն իրականացվել է 2000 լ/լ լուսավորության պայմաններում: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ առավելագույն քանակությամբ 5-ԱԼԹ՝ 170 մգ/լ, սինթեզվել է միջավայրի рН-ի 7.0 արժեքի դեպքում, իսկ рН-ի 5.5 և 8.5 արժեքների դեպքում՝ համապատասխանաբար 93 և 122 մգ/լ (նկար 27, աղյուսակ 8):



**Նկար 27. pH-ի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

**Աղյուսակ 8**

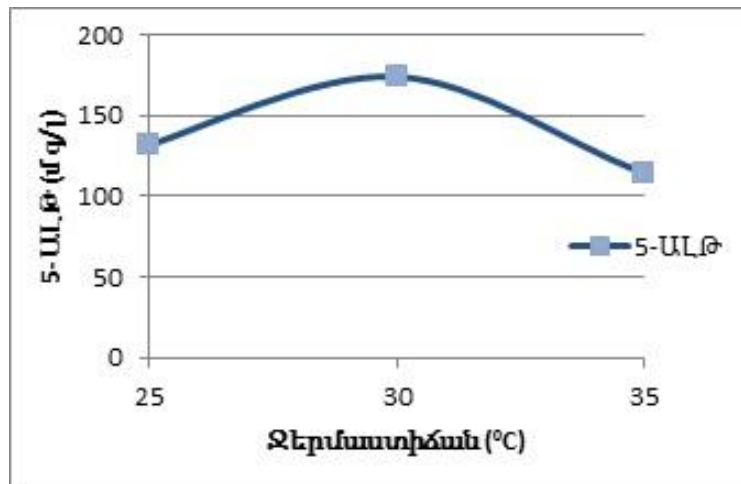
**Սինթեզված 5-ԱԼԹի քանակները՝ pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում**

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
5-ԱԼԹ (մգ/լ)	93	118	153	170	161	146	122

Ջերմաստիճանի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի ելքի վրա ուսումնասիրելու համար կատարվել է կուլտիվացում՝ զուգահեռաբար 25, 30 և 35°C ջերմաստիճաններում: Կուլտիվացումն իրականացվել է 2000 լյուքս լուսավորության և pH 7.0 արժեքի պայմաններում:

Կուլտուրալ հեղուկներից վերցված նմուշների անալիզի արդյունքում պարզվել է, որ 30°C ջերմաստիճանում կուլտիվացման դեպքում սինթեզվել է 174 մգ/լ 5-ԱԼԹ, իսկ 25 և 35°C-ի պայմաններում կուլտիվացման դեպքում՝ համապատասխանաբար 123 և 114 մգ/լ (նկար 28, աղյուսակ 9):





**Նկար 28. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

*Այլ ուսակ 9*

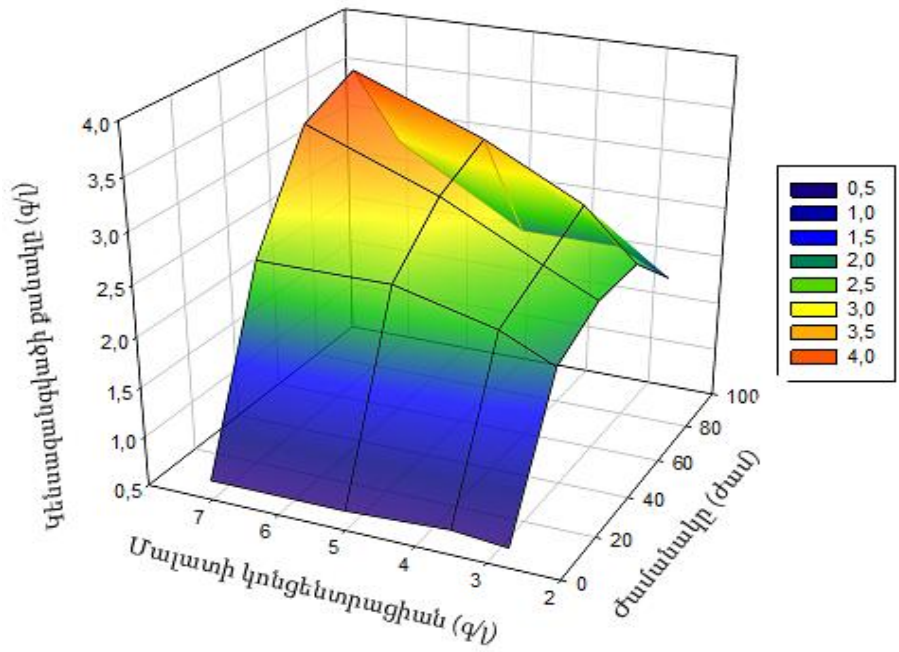
**Տարբեր ջերմաստիճանների պայմաններում սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակները**

Ջերմաստիճան (° C)	25	30	35
5-ԱԼԹ (մգ/լ )	123	174	114

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի ելքը բարձրացնելու նպատակով որպես օպտիմալ պայմաններ ընտրվել են՝ pH-ի 7.0, լույսի ինտենսիվություն 2000 լյուքս և ջերմաստիճանի 30° C արժեքները:

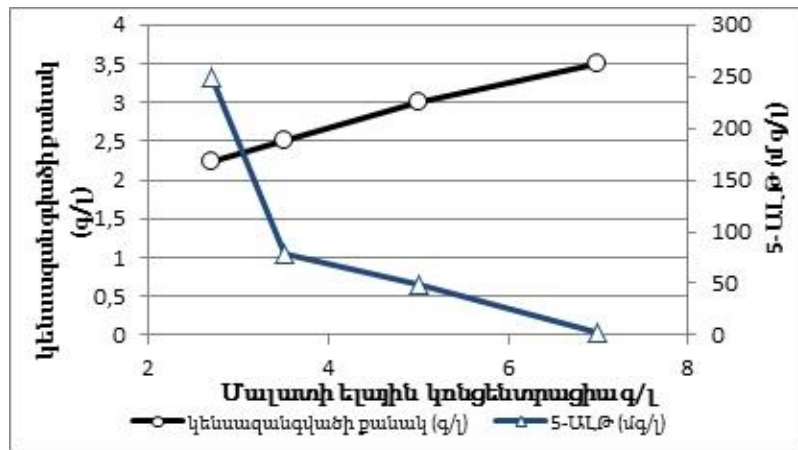
**6.3. Մալատի կոնցենտրացիայի ազդեցությունը բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճի համար մալատը հանդիսանում է ածխածնի կարևոր աղբյուրներից մեկը: Կուլտիվացման պայմանների օպտիմալացման և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար շատ կարևոր է պարզել սննդամիջավայրի մեջ մալատի օպտիմալ քանակությունը: Կուլտիվացիայի համար օգտագործվել է GM սննդամիջավայր՝ մալատի 2.7, 3.5, 5.0 և 7.0 գ/լ տարբեր կոնցենտրացիաներով: Կուլտիվացումն իրականացվել է 2000 լյուքս լուսավորության, 30°C ջերմաստիճանի և միկրոաերոբ պայմաններում: Փորձի ընթացքում կուլտուրալ հեղուկին ավելացվել են 30 մմոլ/լ գլիցին, 30 մմոլ/լ սուկցինատ և 15 մմոլ/լ լևուլինաթթու (նկար 29):



**Նկար 29. Սննդամիջավայրում մալաթի կոնցենտրացիայի ազդեցությունը կենսազանգվածի առաջացման վրա**

Հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ սննդամիջավայրում մալաթի բարձր ելային կոնցենտրացիայի դեպքում սինթեզվում է ավելի մեծ քանակությամբ կենսազանգված: Ենթադրվում էր, որ մեծ քանակի կենսազանգվածով կուլտուրալ հեղուկին գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելու դեպքում կարող է սինթեզվել ավելի շատ քանակությամբ 5-ԱԼԹ, սակայն կարևոր է հաշվի առնել նաև այն հանգամանքը, որ մեծ քանակությամբ կենսազանգվածի առկայության դեպքում արգելակվում է բակտերիաների աճը՝ կապված լուսավորության ներթափանցման կրճատման հետ, որն իր հերթին կարող է որոշ չափով արգելակել 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը (նկար 30):



**Նկար 30. Սննդամիջավայրի մեջ մալատի կոնցենտրացիայի ազդեցությունը կենսազանգվածի և 5-ԱԼԹ-ի ելքի վրա**

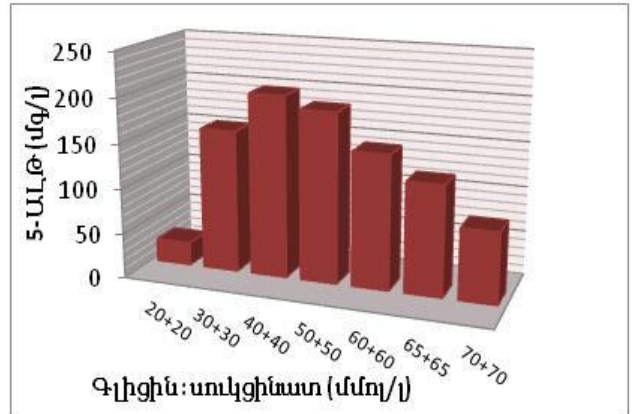
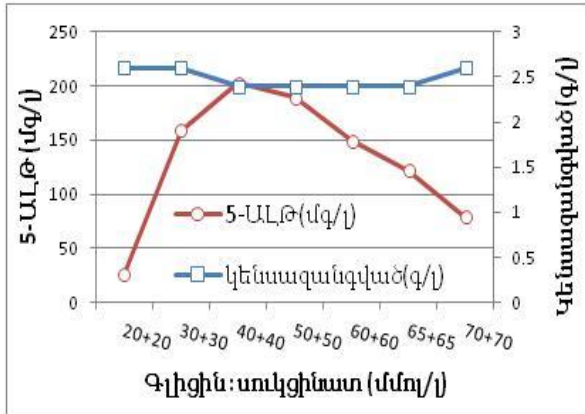
Ինչպես երևում է նկար 30-ից, կուլտիվացիայի ընթացքում կենսազանգվածի ելքի ավելացումը չի բերում 5-ԱԼԹ-ի ելքի բարձրացմանը: Որքան մեծ է մալատի կոնցենտրացիան, այնքան բարձր է կենսազանգվածի ելքը, մինչդեռ 5-ԱԼԹ-ի ելքը մալատի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում նվազում է: Որպես մալատի օպտիմալ կոնցենտրացիա ընտրվել է 2.7 գ/լ կոնցենտրացիան, որի պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի ելքն առավելագույնն է՝ 242.8 մգ/լ:

**6.4. Գլիցինի, սուկցինաթի, Լևուլինաթթվի և գլուտամաթի ազդեցությունը**

**5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի և բակտերիաների աճի վրա**

Կուլտիվացումն իրականացվել է GM սննդամիջավայրի մեջ, միկրոատերոբ, 30°C ջերմաստիճանի և 2000 լ/յոլքս լուսավորության պայմաններում: 28 ժամ կուլտիվացումից հետո կուլտուրալ հեղուկին ավելացվել են 20:20, 30:30, 40:40, 50:50, 60:60 և 70:70 մմոլ/լ հարաբերակցություններով գլիցին և սուկցինատ, ինչպես նաև 15 մմոլ/լ Լևուլինաթթու (նկար 31):

Ինչպես երևում է նկար 31-ից, առավելագույն քանակությամբ 5-ԱԼԹ սինթեզվել է այն դեպքում, երբ կուլտուրալ հեղուկում գլիցինի և սուկցինաթի կոնցենտրացիաների հարաբերակցությունը եղել է 40:40 մմոլ/լ: Նկարից պարզ է դառնում նաև, որ կենսազանգվածի ելքի ավելացման դեպքում 5-ԱԼԹ-ի ելքը չի բարձրանում:



**Նկար 31. Տարբեր կոնցենտրացիաներով գլիցինի և սուկցինատի ազդեցությամբ ունը կենսազանգվածի էլքի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

Գլիցինի և սուկցինատի ազդեցությամբ ունը կենսազանգվածի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա առավել մանրամասն ուսումնասիրելու համար օգտագործվել են նաև գլիցինի և սուկցինատի այլ կոնցենտրացիաներ (աղյուսակ 10):

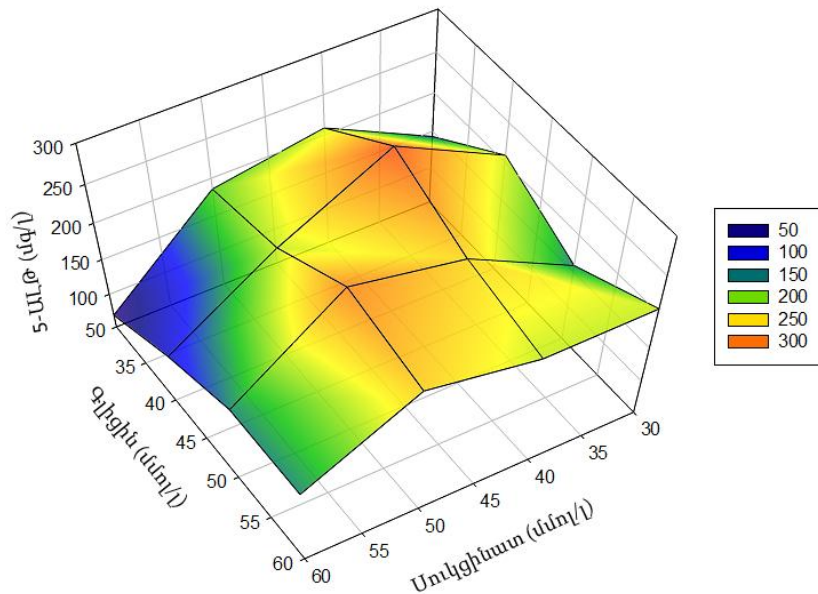
**Աղյուսակ 10**  
**5-ԱԼԹ-ի էլքը՝ կախված կոնցենտրացիայից հեղուկում գլիցինի և սուկցինատի տարբեր կոնցենտրացիաներից**

5-ԱԼԹ-ի էլքը՝ կախված գլիցինի և սուկցինատի կոնցենտրացիայից (մգ/լ)	Գլիցին (մմոլ/լ)				
	30	40	50	60	
Սուկցինատ (մմոլ/լ)	30	142.8	207.5	158.7	205.8
	40	208.7	276.2	231.5	203.6
	50	185.8	206.3	259.5	233.7
	60	68.3	118.8	148.4	159.5

Ինչպես երևում է նկար 32-ից, 5-ԱԼԹ-ի ամենաբարձր էլքը գրանցվել է այն դեպքում, երբ գլիցինի և սուկցինատի էլային կոնցենտրացիաների հարաբերակցությունը կազմել է համապատասխանաբար 40:40 մմոլ/լ և 50:50 մմոլ/լ: Պարզվել է նաև, որ կոնցենտրացիայից հեղուկում գլիցինի և սուկցինատի ցածր կոնցենտրացիաները բարենպաստ ազդեցություն են ունենում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա:

Միևնույն ժամանակ, բացահայտվել է նաև, որ գլիցինի և սուկցինատի բարձր կոնցենտրացիայով օգտագործումն արգելակիչ ազդեցություն է ունենում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա:

Գրականությունից հայտնի է, որ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա բացասական ազդեցություն է ունենում գլիցինի միայն 80 մմոլ/լ - ից բարձր կոնցենտրացիաները [170]:



**Նկար 32. 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա գլիցինի և սուկցինատի ազդեցության եռաչափ պատկերը**

5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը տեղի է ունենում հետևյալ ձևով. գլուտամատից տրանսամինազի միջոցով սինթեզվում է  $\alpha$ -կետոգլուտարատ,  $\alpha$ -կետոգլուտարատից  $\alpha$ -կետոգլուտարատ դեհիդրոգենազի միջոցով՝ սուկցինիլ CoA, իսկ սուկցինիլ CoA-ից և գլիցինից 5-ԱԼԹ-սինթեզի ֆերմենտի միջոցով՝ 5-ԱԼԹ:

Ենթադրվում է, որ գլուտամատը, որպես ածխածնի աղբյուր, բակտերիաների կողմից յուրացվում է կետոգլուտարատի կենսասինթեզի համար, որից հետագայում սինթեզվում է սուկցինիլ CoA, այդ իսկ պատճառով կուլտուրային մեծ քանակությամբ սուկցինատավելացնելու դեպքում արգելակվում է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը: Գլուտամատը կարող է իրանել բակտերիաների աճը և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը [170]: Տույն է տրվել, որ գլիցինի և սուկցինատի կոնցենտրացիաների հավասար

հարաբերակցուն թյան (40:40) դեպքում սինթեզվում է առավելագույն քանակությամբ 5-ԱԼԹ:

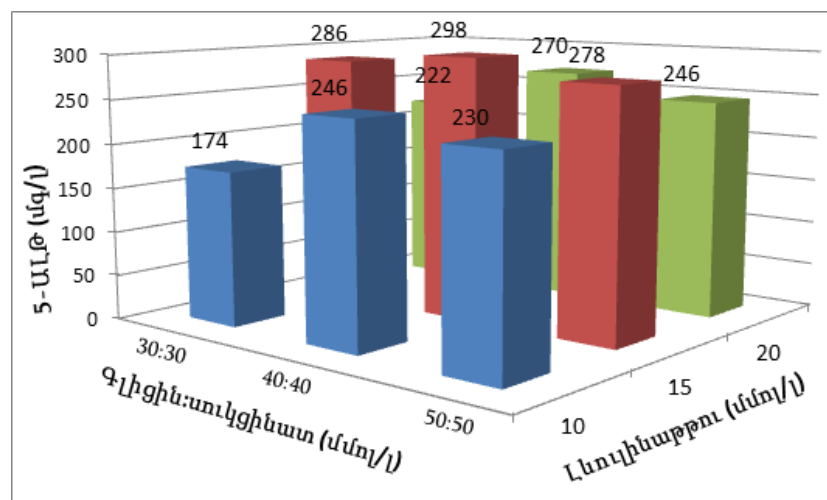
*Աղյուսակ 11*

**Կոլլ տուրալ հեղուկում գլիցինի, սուկցինաթի և Լևուլինաթթվի կոնցենտրացիաները**

Գլիցին : սուկցինատ (մմոլ/լ)	Լևուլինաթթու (մմոլ/լ)
30:30	10
	15
	20
40:40	10
	15
	20
50:50	10
	15
	20

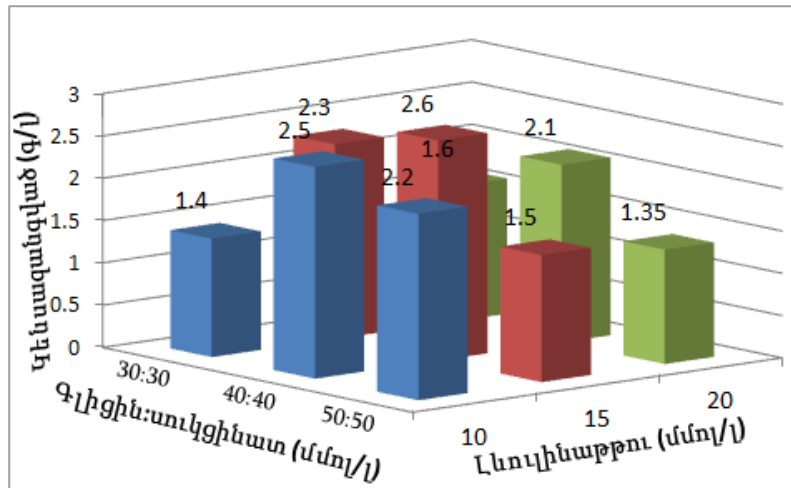
Պարզվել է, որ կոլլ տուրալ հեղուկում գլիցինի, սուկցինաթի և Լևուլինաթթվի համատեղ կիրառումը դրական ազդեցություն է ունենում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա: Կոլլ տիվացումն իրականացվել է 25-ական մլ GM սննդամիջավայրերում՝ 28°C ջերմաստիճանի և 1800 լ/յոլքս լուսավորության պայմաններում:

Կոլլ տիվացումից 28 ժամ հետո կոլլ տուրալ հեղուկին ավելացվել են գլիցին, սուկցինատ և Լևուլինաթթու (աղյուսակ 11):



**Նկար 33. Միկրոաերոբ և լուսավորության պայմաններում կոլլ տիվացման ժամանակ գլիցինի, սուկցինաթի և Լևուլինաթթվի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա**

Նկար 33-ից երևում է, որ գլխիցիների և սուկցինատի կոնցենտրացիաների նշված հարաբերակցությունների դեպքում և 15 մմոլ/լ լևուլինաթթվի առկայության պայմաններում դիտվել է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի առավելագույն ելք, իսկ նվազագույն ելք՝ լևուլինաթթվի 10 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում:



**Նկար 34. Միկրոաերոբ և լևուլինաթթուների պայմաններում կոլև տիվացման ժամանակ կոլև տուրալ հեղուկում գլխիցիների, սուկցինատի և լևուլինաթթվի քանակների ազդեցությունը կենսազանգվածի ելքի վրա**

Կոլև տուրալ հեղուկում սուկցինատի, գլխիցիների և լևուլինաթթվի համապատասխանաբար 40, 40 և 15 մմոլ/լ կոնցենտրացիաների դեպքում կենսազանգվածի քանակը կազմել է 2.7 գ/լ, իսկ 5-ԱԼԹ-ն սինթեզվել է առավելագույն քանակով՝ 298 մգ/լ (նկար 34):

#### 6.4.1. Կենսազանգվածի և 5-ԱԼԹ-ի ելքերը՝ կախված գլևուլինաթթուի կոնցենտրացիայից

Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների աճի համար գլևուլինաթթուի հանդիսանում է ածխածնի և ազոտի կարևոր աղբյուր: Կոլև տիվացումն իրականացվել է գլևուլինաթթուի 2.0 4.0 և 6.0 գ/լ կոնցենտրացիաներով GM սննդամիջավայրերում՝ 30°C ջերմաստիճանի, 2000 լյուքս լևուլինաթթուի և միկրոաերոբ պայմաններում:

28 ժամ կոռլտիվացոււմից հետո կոռլտուրալ հեղուկին ալելացվել են տարբեր կոնցենտրացիաներով գլիցին և 15 մմոլ/լ և կոռլ ինաթթու (աղյ ուսակ 12):

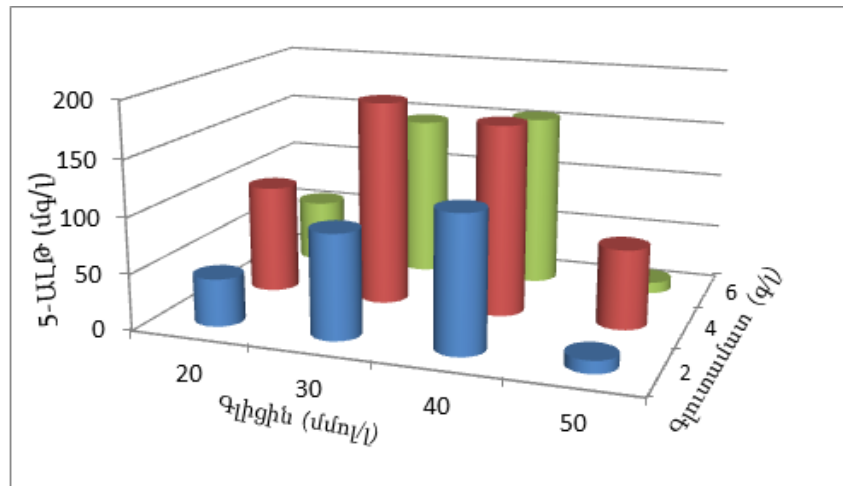
**Աղյ ուսակ 12**  
**Սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի և կենսազանգվածի էլքերը՝ կախված գլ ու տամառի և գլիցինի կոնցենտրացիաներից, 15 մմոլ/լ և կոռլ ինաթթվի առկայ ու թյամբ**

Գլ ու տամառ (գ/լ )	Գլիցին (մմոլ/լ )	5-ԱԼԹ (մգ/լ )	Կենսազանգված (գ/լ )
2	20	42.5	1.2
	30	93.75	2.25
	40	121.25	1.25
	50	11.25	1.25
4	20	92.5	1.5
	30	183.75	2.25
	40	171.25	1.5
	50	71.25	1.5
6	20	57.5	1.2
	30	146.25	2.5
	40	146.25	1.5
	50	10	1.5

Փորձի արդյ ու նքում պարզվել է, որ բակտերիաների աճի համար օգտագործվում է գլ ու տամառի մի մասը, իսկ սննդամիջավայրի մեջ գլիցինի և կոռլ ինաթթվի ալելացոււմից հետո ընկճվում է 5-ԱԼԹ-ի արտաբջջային սինթեզը:

4 գ/լ էլային կոնցենտրացիայով գլ ու տամառ պարուսակող սննդամիջավայրի մեջ կոռլտիվացոււմից 28 ժամ անց 30 մմոլ/լ գլիցին և 15 մմոլ/լ կոռլ ինաթթու ալելացնել ուց հետո սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի առալել ագույն քանակը կազմել է 183.75 մգ/լ □նկար 35□:





**Նկար 35. 2000 լ յ ու ք ս լ ու ս ա լ ո ղ ու թ յ ան և մի կ ր ո ա ն ք ո ք պ յ մ ան ն ք ու մ կ ու լ տի վ ս գ մ ան ժ ա մ ան ա կ գ լ ու տ ա մ ա տի ե լ ա յ ի ն կ ո ն ց ե ն տ ր ա ց ի ա յ ի և գ լ ի ց ի ն ի տ ար ք եր կ ո ն ց ե ն տ ր ա ց ի ան ն ք ո ղ ա զ ու ճ ու թ յ ու ն ը 5-ԱԼԹ ի կ ե ն ս ա ի ն թ Ե գ ի վ ղ ա**

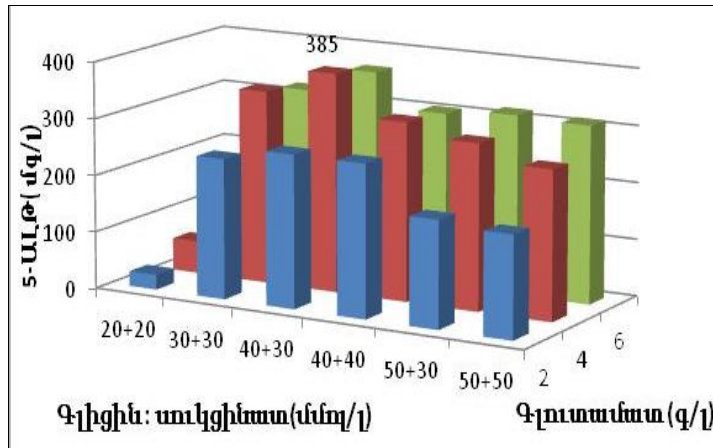
Արդյունքներից երևում է, որ սննդամիջավայրում գլուտամատի կոնցենտրացիայի բարձրացման, ինչպես նաև գլիցինի հետմիասին սուկցինատի լրացուցիչ քանակի ավելացման դեպքում սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակն ավելանում է:

4 գ/լ գլուտամատի ելային կոնցենտրացիայով GM սննդամիջավայրի մեջ կուլտիվացման ժամանակ 30 մմոլ/լ գլիցինի ավելացման դեպքում սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի ելքը եղել է 183.75 մգ/լ, մինչդեռ 30 մմոլ/լ կոնցենտրացիայով սուկցինատի ավելացման դեպքում ելքը բարձրացել է 85%-ով՝ կազմելով 340 մգ/լ:

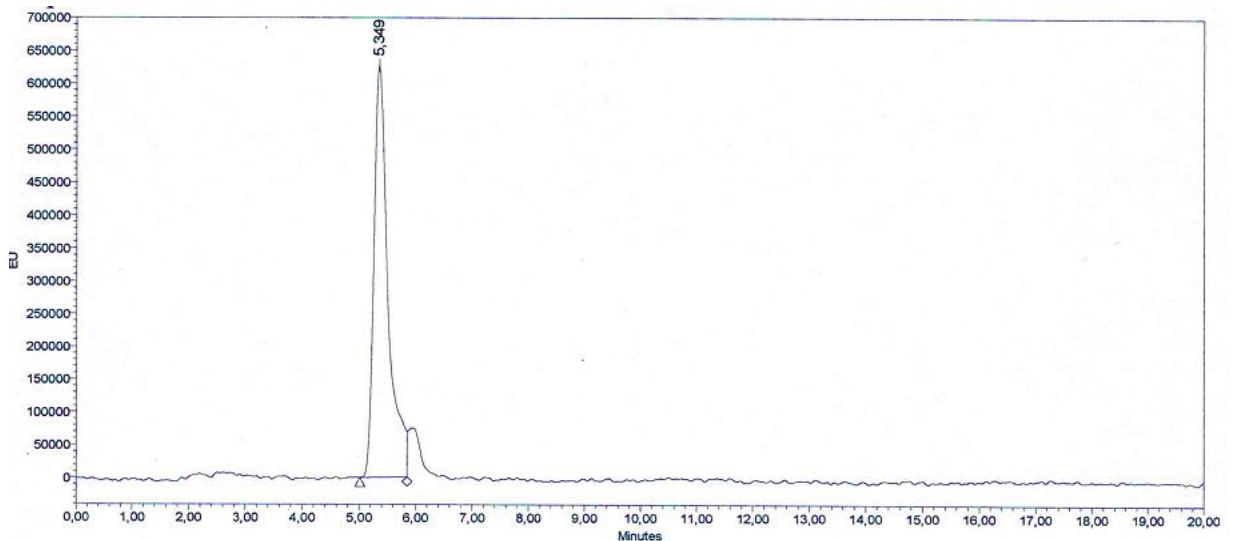
40 մմոլ/լ գլիցինի հետմիաժամանակ 30 մմոլ/լ սուկցինատի ավելացման դեպքում 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 385 մգ/լ (123%-ով ավելի, քան կուլտուրալ հեղուկին միայն գլիցինի ավելացման դեպքում) (նկար 36, 37, աղյուսակ 13):

**Աղյուսակ 13  
Սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը գլուտամատի տարբեր կոնցենտրացիաներով GM սննդամիջավայրերում**

Գլուտամատ (գ/լ)	Գլիցին (մմոլ)	Սուկցինատ (մմոլ)	Լևուլինաթթու (մմոլ)	5-ԱԼԹ (մգ/լ)
2	40	30	15	250.39
4				385.14
6				321.84



**Նկար 36. Գլ ու տամառի, գլ իցիևի և սուկցինաթի տարբեր կոնցենտրացիաների ադդեցու թյ ու նը՝ 5-ԱԼԹի կենսասինթեզի վրա**



Անունը	Ել քի ժամանակը (n)	Մակերեսը	Մակերեսը (%)	Բարձրությունը
E-10	5.349	109985693137	100,0	6272162385

**Նկար 37. E-10 շտամի կուլ սուրապ հեղուկում 5-ԱԼԹի քանակական գնահատում FURP-ի եղանակով (385.14 մգ/լ), E-10 շտամի կուլ սուրապ հեղուկի FURP քրոմատոգրամ**

Գլ ու տամառի 6 գ/լ ելային կոնցենտրացիայով GM սննդամիջավայրերում E-10 շտամը կուլ տիվացնելիս, 30 մմոլ/լ գլ իցիևի, 30 մմոլ/լ սուկցինաթի և 15 մմոլ/լ Լևուլինաթթվի ավելացման դեպքում սինթեզվել է 320 մգ/լ 5-ԱԼԹ, 40 մմոլ/լ գլ իցիևի, 30 մմոլ/լ սուկցինաթի և 15 մմոլ/լ Լևուլինաթթվի ավելացման դեպքում՝ 365 մգ/լ, իսկ 50 մմոլ/լ գլ իցիևի, 30 մմոլ/լ

սուկցինատի և 15 մմոլ/լ Լևուլինաթվի ավելացման դեպքում՝ 360 մգ/լ :

**6. 4. 2. GM արհեստական սննդամիջավայրի մեջ միկրոաերոբ և Լուսավորության պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող E-10 շտամի կողմից սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի արտադրական ծախսի հաշվարկ**

Կուլտիվացիայի պայմանների օպտիմալացման համար շատ կարևոր մաս է կազմում նպատակային նյութի արտադրման արդյունավետության հաշվարկը: Հաշվարկվել են կուլտիվացիայի ընթացքում ծախսված էլեկտրաէներգիայի և բոլոր քիմիական նյութերի արժեքները:

GM սննդամիջավայրում 2000 Լյուքս Լուսավորության և 30°C ջերմաստիճանի պայմաններում կուլտիվացումից 28 ժամ անց սուկցինատ, գլիցին և Լևուլինաթթու (30:40:15 մմոլ/լ) ավելացնելիս 5-ԱԼԹ-ի ելքը կազմել է 385 մգ/լ : 5-ԱԼԹ-ի քանակությունը որոշվել է ԲԱՅՔ և Էրլիխի գույնաչափական մեթոդներով:

Բակտերիաների աճի ընթացքում Լուսավորությունն ապահովվել է վոլֆրամային Լամպի միջոցով (200W), որը նաև անջատում է ջերմային էներգիա և ծախսում է բավական էլեկտրաէներգիա: Ուսումնասիրվել է նաև Լյումինեսցենտային Լամպի (40W) ազդեցությունը բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹ կենսասինթեզի վրա: Այն դրական ազդեցություն չի ցուցաբերել 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա, չնայած երկու դեպքում էլ Լույսի ինտենսիվությունը եղել է 2000 Լյուքս է եղել :

Հայտնի է, որ Լյումինեսցենտային Լամպերն արձակում են միայն Լույսի որոշակի երկարության ալիքներ, որոնք չեն նպաստում միկրոաերոբ պայմաններում ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների ինտենսիվ աճին և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզին: Այդ պայմաններում կուլտիվացման դեպքում սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 54 մգ/լ :

Ուսումնասիրվել է նաև բնական Լույսի ազդեցությունը 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա: Բնական Լույսը ևս դրական ազդեցություն չի ունեցել 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա (5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է ընդամենը 18 մգ/լ):

Այդ պատճառով անհրաժեշտ է կատարել հետագա ուսումնասիրություններ և գտնել ծիրանագույն ոչ ծծմբային բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար նպատակահարմար ավելի քիչ ծախսատար կամ լույսի այլ աղբյուրներ:

Սննդամիջավայրում օգտագործված քիմիական նյութերի արժեքը հաշվարկվել է Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) ընկերության քիմիական նյութերի գների համաձայն: Ծախսված ջրի և էլեկտրաէներգիայի արժեքի հաշվարկը կատարվել է Հայաստանի Հանրապետության Երևան քաղաքում ջրի և էլեկտրաէներգիայի համար գործող սակագների համաձայն (աղյուսակ 14):

**Աղյուսակ 14**  
**5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի նպատակով E-10 շտափ կոչվող սիվսման ընթացքում ծախսված էլեկտրաէներգիայի, ջրի և քիմիական նյութերի հաշվարկը**

Անվանումը	ՀՀ դրամ / գրամ	Կոնցենտրացիան սննդամիջավայրում (գ/լ)	Արժեքը ՀՀ դրամ/գրամ
<b>Սննդամիջավայրի բաղադրությունը</b>			
Մալ առ	854.7	2.7	2307.9
Խմորասկային էքստրակտ	65.6	1.5	98.6
Գլուտամատ	33.0	2	66.0
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	27.0	0.8	22.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	51.8	0.5	25.9
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	39.7	0.5	19.8
MgSO <sub>4</sub>	88.7	0.2	17.6
CaCl <sub>2</sub>	23.1	0.053	1.2
MnSO <sub>4</sub>	41.3	0.0012	0.05
Թիամին	21.5	1	21.5
Նիկոտինաթթու	80.5	1	80.5
Բիոտին	103546.0	0.00001	1.1
Սուկցինատ	54.6	4.862	265.0
Գլիցին	50.7	2.25	114.0

<b>Լևուլ ի նաթթու</b>	37.0	1.742	64.5
-----------------------	------	-------	------

**Աղյուսակ 14 (2 արուև նակու թյուև)**

<b>Լրացուցիչ նյութեր</b>			
<b>Իեժ 5-ԱԼԹ-ի բաժանման համար</b>	1.6	4 գ խեժ/25մլ	66.1
<b>Այլ ծախեր</b>			
<b>Էլեկտրաէներգիա</b>	37.0 դր/կՎտժ	28.8 կՎտ	1065.6
<b>Ջուր</b>	153 դր/խմ	0.001 խմ	0.153
<b>ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԱՐԺԵՔ՝</b>			<b>4237.5</b>

5-ԱԼԹ-ի անջատման և մաքրման արժեքի հաշվարկը կատարվել է տեսականորեն: Նախքան 5-ԱԼԹ-ի անջատումը, իրականացվել է կուլտուրալ հեղուկի գունազրկում՝ ակտիվացված ածխով: 5-ԱԼԹ-ի անջատման համար օգտագործվել է կատիոնփոխանակային Dowex 50x8 խեժ, իսկ էլյուցիայի համար՝ ացետատ և ցիտրատ-ֆոսֆատ բուֆեր: Վերոնշյալ եղանակով մաքուր ձևով կարելի է անջատել կուլտուրալ հեղուկում սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի 70%-ը [174]:

Ընդհանրացնելով վերը շարադրվածը՝ կարելի է կատարել 1 գրամ 5-ԱԼԹ-ի արտադրման տեսական հաշվարկ (աղյուսակ 15):

**Աղյուսակ 15**

**Մեկ գրամ 5-ԱԼԹ-ի արտադրման տեսական հաշվարկ**

<b>5-ԱԼԹ-ի կենսաախի նթեզի ելք</b>	<b>Կուլտուրալ հեղուկից անջատված 5-ԱԼԹ-ի քանակը</b>	<b>1 Լ կուլտուրալ հեղուկից ստացված 5-ԱԼԹ-ի քանակությունը</b>	<b>1 գ 5-ԱԼԹ-ի ստացման համար անհրաժեշտ կուլտուրալ հեղուկի ծավալը</b>	<b>3.71 Լ կուլտուրալ հեղուկի ինքնարժեքը</b>
385 մգ/լ	70%	269.5 մգ	3.71 Լ	30.94 եվրոյին համարժեք 33 դրամ

Այս տեղի հաշվարկված չեն արտադրման համար անհրաժեշտ այլ ծախսերը, սակայն համեմատության համար կարելի է նշել, որ Sigma-Aldrich-ում 1 գ 5-ԱԼԹ-ի արժեքը 287 եվրո է:

### **6.5. E-10 շտամի կուլտիվացումը կենսաառեակտորների մեջ՝ մթուղային և լուսավորության պայմաններում**

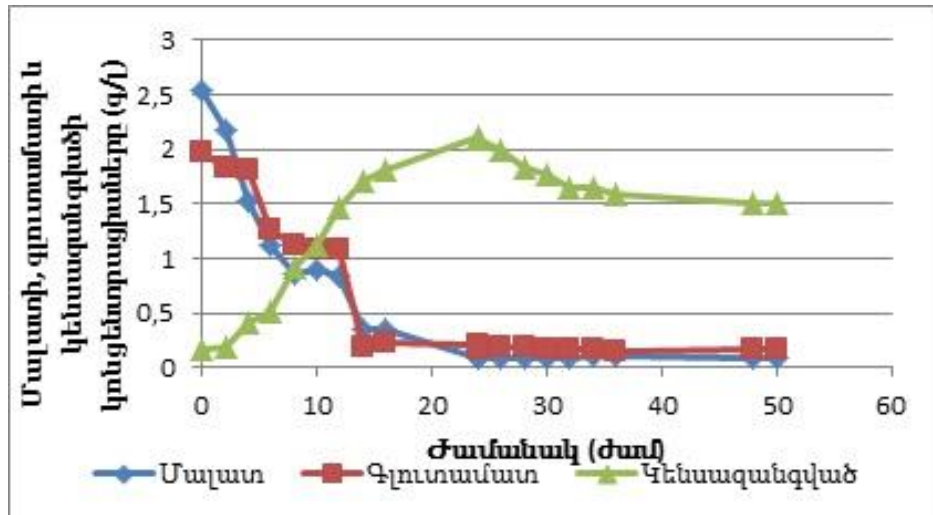
Ծիրանագույն ոչ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաները կարող են աճել աերոբ, անաերոբ, լուսավորության և մթուղային պայմաններում [118, 167]: *Rba. azotoformans* E-10 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ շտամը կուլտիվացվել է լուսավորության պայմաններում: Պարզ է դարձել, որ լույսի առկայությամբ կուլտիվացումը բարենպաստ ազդեցություն է ունենում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա:

Մթուղային և աերոբ պայմաններում բակտերիաների աճը և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի ելքը գնահատելու համար *Rba. azotoformans* E-10 շտամը կուլտիվացվել է Sartorius BIOSTAT Cplus կենսաառեակտորի մեջ 30°C ջերմաստիճանում: Կուլտիվացման ընթացքում pH-ը վերահսկվել է. նրա արժեքը եղել է 7.0, օդի հոսքը՝ 2 մլ/ր, խառնիչի արագությունը՝ 400 պտ/ր (նկար 38):



**Նկար 38. E-10 շտամի կուլտիվացումը Sartorius BIOSTAT Cplus կենսաառեակտորի մեջ՝ մթուղային և աերոբ պայմաններում**

Նկար 39-ում ներկայացված տվյալներից երևում է, որ առավելագույն քանակությամբ կենսազանգված սինթեզվել է կուլտիվացումից 28 ժամ հետո, որը կազմել է 2.12 գ/լ: Կենսառեակտորի մեջ կուլտիվացման ժամանակ աճի գործակիցը կազմել է 0.106 ժամ<sup>-1</sup>:



**Նկար 39. Կենսառեակտորի մեջ մթնոլթյան և աերոբ պայմաններում կուլտիվացման ընթացքում մալ առի, գլուտամատի և լևուլի ինաթթվի յուրացումն ու կենսազանգվածի ելքը**

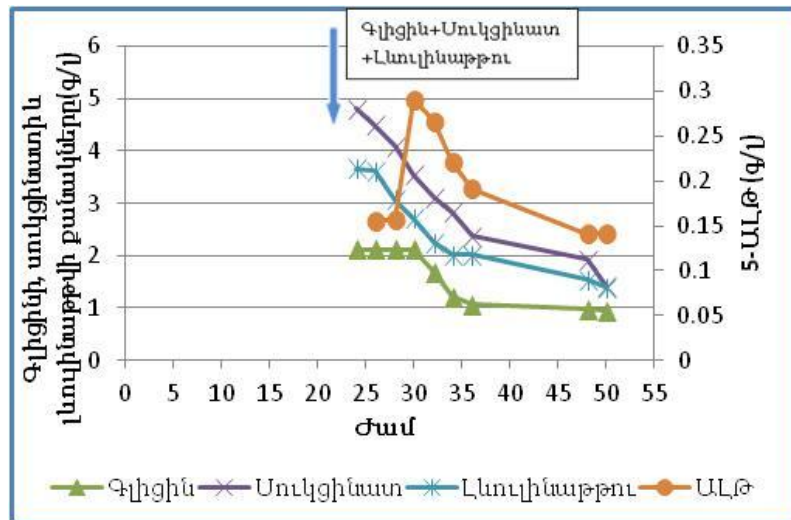
Հայտնի է, որ առավելագույն քանակությամբ 5-ԱԼԹ-ի ելքի համար անհրաժեշտ է սննդամիջավայրի մեջ ավելացնել գլիցին, սուկցինատ և լևուլի ինաթթու՝ բակտերիաների աճի էքսպոնենցիալ փուլի ավարտին [99]:

Նմուշների օպտիկական խտությունը չափելու և չոր կենսազանգվածի քանակը որոշելու միջոցով պարզվել է, որ առավելագույն քանակությամբ կենսազանգված սինթեզվել է կուլտիվացումից 28 ժամ հետո, այդ իսկ պատճառով գլիցինը, սուկցինատը և լևուլի ինաթթուն կուլտուրալ հեղուկին ավելացվել են կուլտիվացումից 28 ժամ անց:

Գրականությունից հայտնի է, որ թթվածինը մեծ ազդեցություն ունի 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվության վրա. սննդամիջավայրի մեջ լուծված մեծ քանակությամբ թթվածինը կարող է ճնշել 5-ԱԼԹ սինթետազ ֆերմենտի ակտիվությունը, որն իր

հերթին բացասական կանդրադառնա բակտերիաների աճի և 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի վրա [118]:

Կենսառեակտորի մեջ կուլտիվացման ընթացքում աերոբիան պահպանվել է ցածր մակարդակի վրա: Կուլտուրալ հեղուկի մեջ գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելուց 2 ժամ հետո սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 155 մգ/լ, իսկ 6 ժամ հետո՝ 290 մգ/լ: Կենսասինթեզի գործակիցը կազմել է 48.3 մգ/լ ժամ (նկար 40):



**Նկար 40. Կենսառեակտորի մեջ մթոնթյան և աերոբ պայմաններում կուլտիվացման ընթացքում գլիցինի, սուկցինատի, լևուլինաթթվի յոլրացումն ու 5-ԱԼԹ-ի ելքը**

Չետազոտում ընթացքում պարզ է դարձել, որ հետագա կուլտիվացման դեպքում կրճատվում է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի մակարդակը: Կուլտուրալ հեղուկի մեջ գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելուց 24 ժամ հետո սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 140 մգ/լ: Ինչպես երևում է ստացված արդյունքներից, երկար կուլտիվացումը, սննդամիջավայրի կազմի փոփոխությունը և նրանում լուծված թթվածնի քանակությունը բացասական ազդեցություն են ունեցել 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի և կայունության վրա: Ստացված տվյալները արժեքավոր են 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի նպատակով կուլտիվացում իրականացնելու համար:

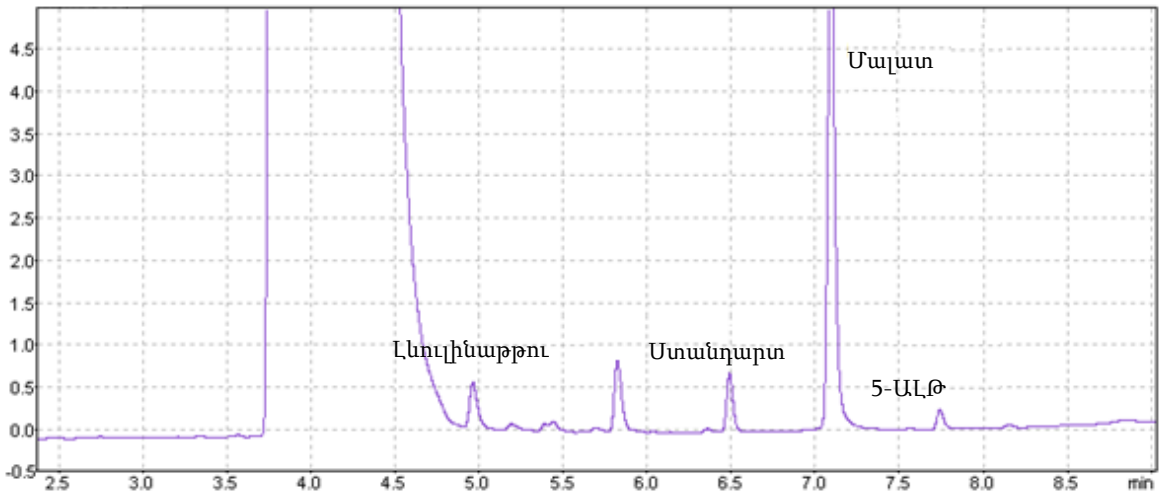
Պետք է նշել, որ 5-ԱԼԹ-ի արտադրության նպատակով կենսառեակտորների մեջ կուլտիվացումն առավել արդյունավետ իրականացնելու համար անհրաժեշտ է գտնել տեղում (*in situ*) 5-ԱԼԹ-ի արագ որոշման անալիտիկ մեթոդ: Այս ուսումնասիրության



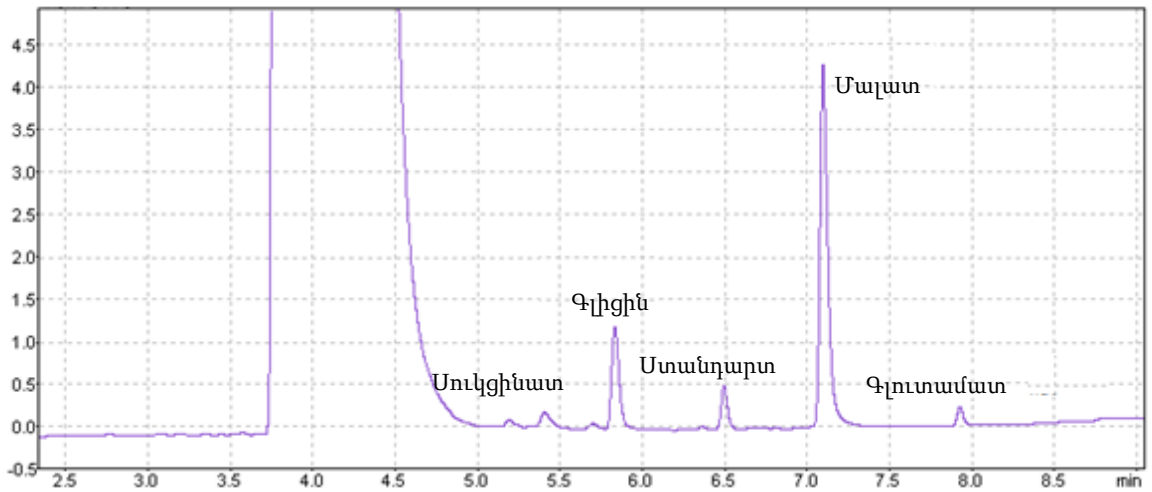
ընթացքում օգտագործված գազ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդի առավել ությունն այն է, որ դերիվատիզացված նմուշներում 5-ԱԼԹ-ի հայտնաբերումը տևում է 15 րոպե, իսկ բացասական կողմն այն, որ նմուշների դերիվատիզացիան տևում է մոտավորապես 30 րոպե [175]: Ինչպես արդեն նշվեց, առավելագույն քանակությամբ կենսազանգված սինթեզվել է կոլլտիվացումից 28 ժամ հետո, իսկ ածի գործակցի առավելագույն ցուցանիշը կազմել է 0.1 ժամ<sup>-1</sup>:

Գրականությանը հայտնի է, որ գլիցինը և լևուլինաթթուն կարող են արգելակիչ ազդեցություն ունենալ բակտերիաների աճի վրա [99]: Այս երևույթը նկատվել է սենդամիջավայրի մեջ գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելուց հետո: Կոլլտիվացման ընթացքում կենսազանգվածի առավելագույն քանակը կազմել է 2.12 գ/լ, սակայն կոլլտիվացումից հետո այն կազմել է 1.58 գ/լ: Ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ յուրացված գլիցինը և սուկցինատը ծախսվել են ոչ միայն 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար, այլ նաև նպաստել են բակտերիաների աճին և կենսագործունեության պահպանմանը:

Կենսառեակտորի մեջ կոլլտիվացման ժամանակ մալատի և գլուտամատի հետմիաժամանակյունացվել է 3.37 գ/լ սուկցինատ, 1.13 գ/լ գլիցին և 2.13 գ/լ լևուլինաթթու: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ կենսառեակտորի մեջ աերոբ և մթության պայմաններում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը կարող է համարվել հեռանկարային: 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի պայմանների օպտիմալացման համար անհրաժեշտ է ուսումնասիրել պրոցեսի արդյունավետությունը՝ պարբերական, կիսաանընդհատ և անընդհատ ռեժիմներով կոլլտիվացման դեպքում: Անհրաժեշտ է նաև ուսումնասիրել և գտնել 5-ԱԼԹ-ի *in situ* անալիզի համար ավելի արագ անալիտիկ մեթոդ (նկար 41, 42):



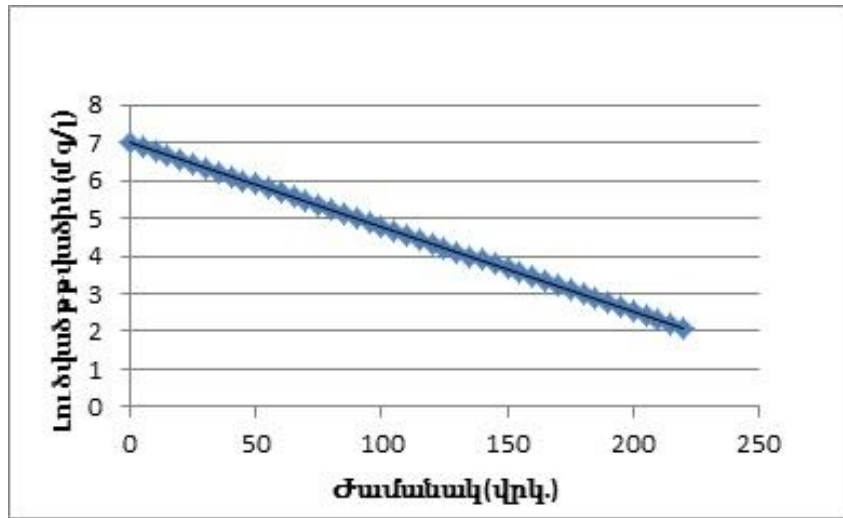
**Նկար 41. Լ և ու լ ի նաթթվի, մալ առի և 5-ԱԼԹի քրոմատոգրամները՝ ստացված գազ քրոմատոգրաֆիայի միջոցով**



**Նկար 42. Գլիցինի, սուկցինառի և գլուտամառի քրոմատոգրամները՝ ստացված գազ քրոմատոգրաֆիայի միջոցով**

Քանի որ կենսառեակտորի մեջ կուլտիվացումն իրականացվել է աերոբ պայմաններում, շատ կարևոր է իմանալ թթվածնի յուրացման մակարդակը, որը հանդիսանում է այս գործընթացի գլխավոր պարամետրերից մեկը: Այս նպատակով, կուլտիվացման ժամանակ դադարեցվել է աերացիան և 5 վայրկյան պարբերությամբ թթվածնի էլեկտրոդի միջոցով գրանցվել է լուծված թթվածնի ցուցանիշը:

Արդյունքները ներկայացված են նկար 43-ում:



**Նկար 43. Կենսառեակտորի մեջ, մթու թյ ան և աերոբ պայ մաններում կուլ տիվացման ընթացքում թթվածնի յ ուրացման գծայ ին պատկերը**

Ստացված տվյալների կիրառմամբ հաշվարկվել է թթվածնի յ ուրացման գործակիցը: Կենսազանգվածի ելքը կազմել է 1.61 գ/լ, իսկ թթվածնի յ ուրացման գործակիցը՝ 11.9 մգ O<sub>2</sub> (գ կենսազանգված/վ): Այս տվյալը կարևոր է կենսառեակտորի մեջ մուլ և աերոբ պայ մաններում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի կուլ տիվացման ծախսերը հաշվարկել ու համար:

**6.5.1. E-10 շտամի կուլ տիվացումը կենսառեակտորի մեջ՝ միկրոաերոբ և լ ուսավորությ ան պայ մաններում**

Լ ուսավորությ ան և միկրոաերոբ պայ մաններում 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզը գնահատել ու նպատակով 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ հանդիսացող E-10 շտամը գուգահեռաբար կուլ տիվացվել է ապակե կենսառեակտորի մեջ՝ 2000 լ յ ուքս լ ուսավորությ ան և 30°C ջերմաստիճանի պայ մաններում: Կուլ տիվացումն իրականացվել է մալ առի և գլ ու տամառի՝ համապատասխանաբար 2.7 և 4 գ/լ ելայ ին կոնցենտրացիաներով GM սննդամիջավայրում □նկար 44□:

Կենսառեակտորի մեջ կուլ տիվացման ընթացքում pH-ը վերահսկվել է. այն եղել է 7.0, խառնիչի արագությ ունը՝ 400 պտ/ր, իսկ միկրոաերոբ պայ մաններ ապահովել ու համար կենսառեակտորի մեջ մղվել է գազայ ին ազոտ: Առավել ազոտյ ն քանակությ ամբ կենսազանգված՝ 2.65 մգ/լ, սինթեզվել է կուլ տիվացումից 24 ժամ հետո:



**Նկար 44. E-10 շտամի կուլ սիվացու մն ապակե կենսառեակտորի մեջ՝ միկրոաէրոբ և լոսալորու թյ ան պայ մաններում**

Առավելագույն քանակությամբ 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի համար անհրաժեշտ է սննդամիջավայրի մեջ ավելացնել գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու՝ բակտերիաների աճի էքսպոնենցիալ փուլի ավարտին [99]:

Կենսառեակտորի մեջ 28 ժամ կուլ սիվացումից հետո կուլ տուրալ հեղուկին նշված նյութերն ավելացվել են համապատասխանաբար 40, 30 և 15 մմոլ/լ կոնցենտրացիաներով: Կուլ սիվացման ընթացքում վերցվել են 10-ական մլ նմուշներ և գնահատվել է բակտերիաների աճը սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով:

5-ԱԼԹ-ի քանակական գնահատման նպատակով նմուշները ցենտրիֆուգվել են 8000 պտ/ր արագությամբ և վերնստվածքային հեղուկներն ու սուբստրատները են ԳՔ եղանակով:

Կուլ տուրալ հեղուկի մեջ գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելուց 2 ժամ հետո սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 308.5 մգ/լ, իսկ 6 ժամ հետո՝ 579 մգ/լ: Կուլ տուրալ հեղուկի մեջ գլիցին, սուկցինատ և լևուլինաթթու ավելացնելուց 24 ժամ անց սինթեզված 5-ԱԼԹ-ի քանակը կազմել է 280.5 մգ/լ:

## ԵՃՐԱԿԱՑՈՒ ԹՅՈՒՆՆԵՐ

ՈՒՏՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻԳ ստացված արդյունքները թույլ են տալիս անել հետևյալ եզրակացությունները.

1. Ցույց է տրվել, որ Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում *Rba. azotoformans*, *Rba. sphaeroides* MDC 6509, *Rba. sphaeroides* MDC 6511 և *Rps. palustris* MDC 6506 վայրի շտամներն աճեցման ստանդարտ պայմաններում սինթեզում են համապատասխանաբար՝ 2.5, 13.0, 1.8 և 13.3 մգ/լ 5-ԱԼԹ:
2. Ինդուկցված մուտագենեզի եղանակով ստացված *Rba. azotoformans* E-10 կայուն մուտանտի մոտոգրաֆիորեն բարձրացել է 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի արդյունավետությունը:
3. *Rhodobacteraceae* ընտանիքին պատկանող *Rba. capsulatus* MDC 6508 շտամի ֆիլոգենետիկ անալիզի և 16S ռԲԼԹ գենի սեքվենավորման տվյալների հիման վրա այն նույնականացվել է որպես *Rba. azotoformans* տեսակ:
4. Ցույց է տրվել, որ միջավայրում գլիցինի, գլուտամատի, մալատի, սուկցինատի և լևուլինաթթվի առկայությունը, ինչպես նաև արտաքին գործոններն (pH, լուսավորություն, ջերմաստիճան) էականորեն ազդում են *Rba. azotoformans*-ի E-10 մուտանտ շտամի կողմից 5-ԱԼԹ-ի կենսասինթեզի գործընթացի վրա:
5. Հաստատվել է, որ անընդհատ կուլտիվացման պայմաններում *Rba. azotoformans* շտամի E-10 մուտանտի կողմից 5-ԱԼԹ-ի սինթեզի առավելագույն ելքը՝ 385 մգ/լ, դիտվում է 2.7 գ/լ մալատ և 4 գ/լ գլուտամատ պարունակող սննդամիջավայրին 40 մմոլ/լ գլիցին, 30 մմոլ/լ սուկցինատ, 15 մմոլ/լ լևուլինաթթու ավելացնելու դեպքում:
6. Ցույց է տրվել, որ կենսաառեակտորում լուսավորության պայմաններում կուլտիվացման դեպքում *Rba. azotoformans* շտամի E-10 մուտանտը սինթեզում է 579 մգ/լ 5-ԱԼԹ, մինչդեռ մթություն մեջ այն չի գերազանցում 290 մգ/լ:
7. Ցույց է տրվել մանրէաբանական ճանապարհով *Rba. azotoformans*-ի E-10 մուտանտ շտամի կիրառմամբ 5-ԱԼԹ-ի ստացման տնտեսական արդյունավետությունը կիսաարտադրական պայմաններում:

8. *Rba. azotoformans*-ի E-10 մուլտանտ շտամն ավանդադրվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում՝ MDC 6523 շիֆրի և համարի ներքո՝ որպես 5-ԱԼԹ-ի արտադրիչ :

## ՕԳՏԱԳՈՐԾԿԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Պարոնյան Ա.Խ. Հայաստանում տարածված ֆոտոսինթետիկ բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկությունները և նրանց կիրառման հեռանկարները, 2010, 295 էջ:
2. Арутюнян Б.А. Выявление продуцентов 5-аминолевулиновой кислоты среди культур пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий, Биологический Журнал Армении, 2(70), 2018, с. 6-13.
3. Габлиелян Л.С. Окислительно-восстановительный потенциал и фотовыделение  $H_2$  *Rhodobacter sphaeroides*: влияние ингибитора нитрогеназной активности. Межд. научная конференция “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем”. 2016, с. 27-29.
4. Гоготов И.Н. Биотехнологические основы получения водорода за счет фототрофных микроорганизмов. Биотехнология. 5(1), 1989, 7 с.
5. Горленко В.М., Компанцева Е.И., Пучкова Н.Н. Влияние температуры на распространение фототрофных бактерий в термальных источниках. Микробиология. 54. 5. 1985, с. 848-853.
6. Европейский патент, EP №514776, 1992.
7. Кондратьева Е. Н. Фотосинтезирующие бактерии, М., 1963, 316 с.
8. Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. Микроорганизмы продуценты водорода. Изв. АН СССР. 1. Сер. биол. 1. 1976, 69 с.
9. Кондратьева Е.Н. Автотрофные прокариоты: Учебное пособие. Москва: Издательство МГУ. С. 1996, 312 с.
10. Кондратьева Е.Н. Фототрофные микроорганизмы / Е.Н. Кондратьева, И.В. Максимова, В.Д. Самуилов - М: Изд-во МГУ, 1989а, 376 с.
11. Определитель бактерий Берджи / Под. Ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. Изд-во «Мир» в 2-х томах, 1997.
12. Паронян А.Х. Алкалофильные серные фотосинтезирующие бактерии из содовых солончаков Армении. Биологический журнал Армении, (1-2) 53, 2001, с. 41-45.
13. Паронян А.Х. Влияние источников углерода на рост и биосинтез каротиноидов *Rhodobacter sphaeroides*, шт. А-1. Биологический журнал Армении, (3-4) 56, 2004, с. 133-137.

14. Паронян А.Х. *Характеристика алкалофильной серной пурпурной бактерии, выделенной из солончаков Араратской долины*. Биологический журнал Армении, (1-2) 58, 2006, с. 34-37.
15. Паронян А.Х. Экология и биоразнообразие фототрофных бактерий различных экосистем Армении. Биологический журнал Армении, (1-2) 54, 2002, с. 91-98.
16. Паронян А.Х. Экофизиологические особенности фототрофной бактерии *Rhodopseudomonas palustris* из минеральных источников Джермука. Биологический журнал Армении, (1-2) 59, 2007, с. 73-77.
17. Паронян А.Х., Маркосян Л.С. Влияние витаминов группы В на содержание каротиноидов фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides*. Биологический журнал Армении, 1-2 (60), 2008, с. 22-27.
18. Патрушева Е.В. Синтез бактериохлорофилла а пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* / Е.В. Патрушева, А.С. Федоров, В.В. Белера, И.Г. Минкевич, А.А. Цыганков // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 43. №2. С. 2007, с. 208-214.
19. Цыганков А.А., Гоготов И.Н. Получение биомассы пурпурных несерных бактерий. Прикл. биох. и микробиол. 26. 1990, с. 819-824.
20. Цыганков А.А., Павлова Е.А., Гоготов И.Н. Активность некоторых ферментов, участвующих в метаболизме H<sub>2</sub> у *Rhodopseudomonas capsulata* в зависимости от условий роста культур. Микробиология. 51 (2), 1982, с. 188-192.
21. Элиазян А.А., Паронян А.Х. *Об аминокцилазной активности фотосинтезирующих бактерий*. Биологический журнал Армении, (1-2) 53, 2001, с. 46-50.
22. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research, 25 (17), 1997, pp. 3389-3402.
23. Anderson L. Photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. 3. Metabolic control of reductive pentose phosphate and tricarboxylic acid cycle enzymes / L. Anderson, R. Fuller // Plant Physiol. 42 (4): 1967, pp. 497-502.
24. Arnon D.I., Losada M., Whatley F.R., Tsujimoto H.Y., Hall, D.O., Horton, A.A. Photosynthetic phosphorylation and molecular oxygen. Proceedings of the National Academy of Sciences, 47 (9), 1961, pp. 1314-1334.



25. Arnon D.I., Losada, M., Nozakoi, M., Tagawa, K. Photoproduction of hydrogen, photofixation of nitrogen and a unified concept of photosynthesis. *Nature*, 190 (4776), 1961, 601p.
26. Astner I., Schulze J. O., Van den Heuvel J., Jahn, D., Schubert W. D., Heinz, D. W. Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *The EMBO journal*, 24 (18), 2005, pp. 3166-3177.
27. Bahatyrova S., Frese R.N., Siebert C.A., Olsen J.D., van der Werf K.O., van Grondelle R., Niederman R.A., Bullough P.A., Otto C., Hunter C.N. The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature*. 430, 2004, pp. 1058–1062.
28. Bandell M., Ansanay V., Rachidi N., Dequin S., Lolkema J.S. Membrane potential-generating malate (MleP) and Citrate (CitP) transporters of lactic acid bacteria are homologous proteins. Substrate specificity of the 2-hydroxycarboxylate transporter family. *J. Biol. Chem.* 272, 1997, pp. 18140-18146.
29. Beale S.I. Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor,  $\delta$ -aminolevulinic acid, from glutamate. *Plant physiology*, 93(4), 1990, pp. 1273-1279.
30. Beck T.J., Kreth, F.W., Beyer W., Mehrkens J.H., Obermeier A., Stepp H. Baumgartner, R. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers in surgery and medicine*, 39 (5), 2007, pp. 386-393.
31. Bentley R., Thiessen C.P. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with C14-labeled substrates. *J. Biol. Chem.* 226, 1957, pp. 673-687.
32. Bergeron J.A., Fuller R.C. The photosynthetic macromolecules of *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Biological Structure and Function*, 2, 1961, pp. 307-324.
33. Biebl H., Pfennig N. Isolation of members of the family *Rhodospirillaceae*. In *The prokaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, 1981, pp. 267-273.
34. Bozzini G., Colin P., Nevoux P., Villers A., Mordon S., Betrouni N. Focal therapy of prostate cancer: energies and procedures. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Elsevier, Vol. 31, No. 2, 2013, February, pp. 155-167.
35. Bril C. Studies on bacterial chromatophores I. Reversible disturbance of transfer of electronic excitation energy between bacteriochlorophyll-types in chromatium. *Biochimica et biophysica acta*, 39(2), 1960, pp. 296-303.

36. Brune D.C., Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E. Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1995, pp. 885-914.
37. Buder I. Aus der Biologie der Purpurbakterien. Naturwissenschaften, VII Jahrg., №14-15, 1920, 261 p.
38. Bunt J.S. Notes on the bacteriae belonging to the *Rhodobacterineae* breed Murray and Hitchens and the *Chlamydobacteriales* Buchanan occurring at Macquaris Island. Proc. Linnean Soc. N. South Wales, 79,63, 1954, pp. 3-4
39. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Applied microbiology and biotechnology, 68(3), 2005, pp. 283-291.
40. Bykhovskii V., Zaitseva N.I., Eliseev A.A. Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, biotechnology. Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya, 34(1), 1998, pp. 3-21.
41. Clarridge III J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // Clinical Microbiology Reviews, Vol.17. 2004, pp. 840-862.
42. Cogdell R.J., Gall, A., Köhler J. The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes. Quarterly reviews of biophysics, 39(3), 2006, pp. 227-324.
43. Cogdell R.J., Isaacs N.W., Howard T.D., Mcluskey K., Fraser N.J., Prince S.M. How photosynthetic bacteria harvest solar energy. J. Bacteriol. 181, 1999, pp. 3869-3879.
44. Cogdell R.J., Roszak A.W. Structural biology: The purple heart of photosynthesis. Nature. 508(7495), 2014, pp. 196-197.
45. Cohen-Bazire G., & Kunisawa R. Some observations on the synthesis and function of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 46(12), 1960, pp. 1543-1553.
46. Collins V.G. The ecology and distribution of photosynthesis bacteria in fresh water. VII Intern. Congr. Microbiol. Stockholm, 1958, 71p.
47. Conrad R. and Schlegel H.G, Different pathways for fructose and glucose utilization in *Rhodopseudomonas capsulata* and demonstration of 1-phosphofructokinase in phototrophic bacteria. Biochim. Biophys. Acta 358, 1974, pp. 221-225.
48. Cviic V. Red water in the lake «Malo Jezero» (Island of Mljet). Acta adriat., 1955, 6, №2, 15p.

49. Driscoll B., Lunceford C., Lin S., Woronowicz K., Niederman R.A. and Woodbury N.W. Energy transfer properties of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores during adaptation to low light intensity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16(32), 2014, pp. 17133-17141
50. Dunstan R.H., Kelley B.C., Nicholas D.J. Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans. *J. Bacteriol.* 150, 1982, pp. 100-104.
51. Ehrenreich A., Widdel F. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 60, 1994, pp. 4517-4526.
52. Eidels L. and Preiss J. Citrate synthase. A regulatory enzyme from *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* 245, 1970b, pp. 2937-2945.
53. Eidels L., and Preiss J. Carbohydrate metabolism in *Rhodopseudomonas capsulate*, enzyme titers, glucose metabolism, and polyglucose polymer synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 1970, pp. 75–89.
54. Frenkel A. W., Hickman D. D. Structure and photochemical activity of chlorophyll-containing particles from *Rhodospirillum rubrum*. *The Journal of Cell Biology*, 6(2), 1959, pp. 285-290.
55. Fuller R. C., Smillie R. M., Sisler E. C., Kornberg, H. L. Carbon metabolism in Chromatium. *Journal of Biological Chemistry*, 236(7), 1961, pp. 2140-2149.
56. Fuller R. C., Smillie, R. M., Rigopoulos, N., Yount, V. Comparative studies of some quinones in photosynthetic systems. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 1961, pp. 197-202.
57. Gabrielyan L., Sargsyan H., Trchounian A. Biohydrogen production by purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: Effect of low-intensity electromagnetic irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 162, 2016, pp. 592-596.
58. Gibson K. D., Laver W. G., Neuberger A. Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of  $\delta$ -aminolaevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochemical Journal*, 70(1), 1958, 71p.
59. Glaeser J., Overmann J. Selective enrichment and characterisation of *Roseospirillum parvum*, gen. nov. and sp. nov., a new purple nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Arch. Microbiol.* 171, 1999, pp. 405-416.

60. Goedheer J.C. Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophyll in chromatophores of purple bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 35, 1959, pp. 1-8.
61. Gregor J., Klug G. Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett.* 179, 1999, pp. 1-9.
62. Hansen T.A. and Imhoff J.F. *Rhodobacter veldkampii*, a new species of phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Intl J Syst Bacteriol.* 35, 1985, pp. 115–116.
63. Hansen T.A., Gernerden H. Sulfide utilization by nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 86, 1972, pp. 49-56.
64. Harutyunyan B. Molecular-genetic verification of the taxonomic status of two strains of purple non-sulfur photosynthetic bacteria based on the analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA genes // *Electronic Journal of Natural Sciences NAS RA*, 2(31), 2018, pp. 57-60.
65. Harutyunyan B., Novak M., Pavlečić M., Goginyan V., Hovhannesyan R., Melkumyan I., Šantek B. Influence of glycine, succinate, levulinic acid and glutamate concentrations on growth of purple non-sulfur photosynthetic bacteria and 5-aminolevulinic acid production // *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, Vol. 7, Issue 4, 2018, pp. 3839-3846.
66. Horne I.M., Pemberton J.M., McEwan A.G. Photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* is regulated by redox changes which are linked to electron transport. *Microbiology.* 142, 1996, pp. 2831-2838.
67. Huang D. D., Wang W. Y. Genetic control of chlorophyll biosynthesis: regulation of delta-aminolevulinate synthesis in *Chlamydomonas*. *Molecular and General Genetics MGG*, 205(2), 1986, pp. 217-220.
68. Hulcher F. H., Conti, S. F. Cytochromes in chlorophyll-containing particles of *Chromatium* and *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 3(5), 1960, pp. 497-503.
69. Ibanez M. L., Lindstrom, E. S. Comparative studies with the photooxidase of *Rhodospirillum*. *Canadian journal of microbiology*, 7(1), 1961, pp. 85-90.
70. Imai T., Globberman H., Gertner J.M., Kagawa N., Waterman M.R. Expression and purification of functional human 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase (P450c17) in *Escherichia coli*. Use of this system for study of a novel form of combined 17

- alpha-hydroxylase/17, 20-lyase deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 1993, pp. 19681-19689.
71. Imhoff J. F., Trüper H. G. Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic bacteria. *Microbial ecology*, 3(1), 1976, pp. 1-9.
72. Imhoff J.F. True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch Microbiol.* 176, 2001, pp. 243–254.
73. Itoh Y., Ninomiya Y., Tajima S., Ishibashi A. Photodynamic therapy for acne vulgaris with topical 5-aminolevulinic acid. *Archives of dermatology*, 136(9), 2000, pp. 1093-1095.
74. Ivanovsky R.N., Krasilnikova E.N., Fal Y.I. A pathway of the autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Chloroflexus aurantiacus*. *Archives of microbiology*, 159(3), 1993, pp. 257-264.
75. Jahn D., Verkamp E., So, D. Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends in biochemical sciences*, 17(6), 1992, pp. 215-218.
76. Jannasch H.W., Truper H. G., Tuttle J. H. Microbial sulfur cycle in Black Sea. *The Black Sea-Geology, Chemistry and Biology*, Tulsa, Oklahoma, American Association of Petroleum Geologists, 1974, pp. 419-425.
77. Jenkins M.P., Buonaccorsi G.A., Mansfield R., Bishop C. C., Bown S. G., McEwan J. R. Reduction in the response to coronary and iliac artery injury with photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid. *Cardiovascular research*, 45(2), 2000, pp. 478-485.
78. Jensen S.L., Cohen-Bazire G., Stanier R.Y. Biosynthesis of carotenoids in purple bacteria: a re-evaluation based on considerations of chemical structure. *Nature*, 192(4808), 1961, 1168 p.
79. Kang Z., Wang Y., Gu, P., Wang Q., Qi Q. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose. *Metabolic engineering*, 13(5), 2011, pp. 492-498.
80. Kennedy J. C., Pottier R. H., Pross D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6(1-2), 1990, pp. 143-148.
81. Kern M., Klipp, W., Klemme J. H. Increased nitrogenase-dependent H<sub>2</sub> photoproduction by hup mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and environmental microbiology*, 60(6), 1994, pp. 1768-1774.

82. Kikuchi G., Kumar A., Talmage P., Shemin D. The enzymatic synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 233(5), 1958, pp. 1214-1219.
83. Klemme J. H. Studies on the photoautotrophic growth of new isolated nonsulfur purple bacteria at the expense of molecular hydrogen. *Archiv für Mikrobiologie*, 64(1), 1968, pp. 29-42.
84. Kobayashi M., Haque M.Z. Contribution to nitrogen fixation and soil fertility by photosynthetic bacteria. *Plant and Soil*, 35(1), 1971, pp. 443-456.
85. Kondratieva E. N. The phototrophic prokaryotes. The prokaryotes, 2nd ed, A handbook on the biology of bacteria. ecophysiology, isolation, identification, applications. 1, 1992, pp. 312-330.
86. Kranz R.G., Gabbert K.K., Locke T.A. and Madigan M. T. Polyhydroxyalkanoate Production in *Rhodobacter capsulatus*, genes, mutants, expression, and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8), 1997a, pp. 3003-3009.
87. Kresge N., Simoni R. D., Hill R. L. A pathway for heme biosynthesis: the work of David Shemin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 2006, pp. e28-e28.
88. Kulichevskaya I.S., Gusev V.S., Gorlenko M.V., Liesack W., Dedysh S.N. *Rhodoblastus sphagnicola* sp. nov., a novel acidophilic purple non-sulfur bacterium from *Sphagnum* peat bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2006, pp. 1397-1402.
89. Lang A.S. and Beatty T.J. The gene transference agent of *Rhodobacter capsulatus* and “constitutive transduction” in procariotes. *Arch Microbiol.* 175, 2001, pp. 241–249.
90. Lascelles J. Tetrapyrrole synthesis in microorganisms. *The bacteria*, 3, 1962, pp. 335-372.
91. Lascelles J. The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll in cell suspensions of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochemical Journal*, 62(1), 1956, 78 p.
92. Laurinavichene T.V., Tekucheva D.N., Laurinavichius K.S., Ghirardi M.L., Seibert M. and Tsygankov A.A. Towards the integration of dark and photo fermentative waste treatment. 1. Hydrogen photoproduction by purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* using potential products of starch fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 2008, pp. 7020-7026.
93. Lee S.B., Wilson P.W. Hydrogenase and nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Journal of Biological Chemistry*, 151(2), 1943, pp. 377-385.

94. Lee W.L., Shalita A.R., Poh-Fitzpatrick M.B. Comparative studies of porphyrin production in *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. *Journal of bacteriology*, 133(2), 1978, pp. 811-815.
95. Liaaen-Jensen S. Bacterial carotenoids. *Acta Chem Scand*, 19, 1965, pp. 1025-1030.
96. Lindstrom E.S. Photooxidase activity of heated chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Plant physiology*, 37(2), 1962, 127 p.
97. Lindstrom E.S., Burris, R. H., Wilson, P. W. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. *Journal of bacteriology*, 58(3), 1949, 313 p.
98. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (<http://www.bacterio.net/classifphyla.html>).
99. Liu S., Zhang G., Li, X., Zhang J. Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(17), 2014, pp. 7349-7357.
100. Losada M., Trebst A. V., Ogata S., Arnon D. I. Equivalence of light and adenosine triphosphate in bacterial photosynthesis. *Nature*, 186(4727), 1960, 753 p.
101. Madigan M.T. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Photosynth Res.* 76, 2003, pp. 157–171.
102. Madigan M.T. and Gest H. Growth of a photosynthetic bacterium anaerobically in darkness supported by "oxidant-dependent" sugar fermentation. *Arch. Microbiol.* 117, 1978, pp. 119-122.
103. Madigan M.T. and Gest H. Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H<sub>2</sub> as the energy source. *J. Bacteriol.* 137, 1979, pp. 524-530.
104. Marrs B.L. Genetic recombination in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71, 1974, pp. 971-973.
105. Masuda T., Tanaka R., Shioi Y., Takamiya K. I., Kannangara C. G., Tsuji, H. Mechanism of benzyladenine-induced stimulation of the synthesis of 5-aminolevulinic acid in greening cucumber cotyledons: benzyladenine increases levels of plastid tRNA<sup>Glu</sup>. *Plant and cell physiology*, 35(2), 1994, pp. 183-188.
106. Mauzerall D., and Granick S. "The occurrence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *Journal of Biological Chemistry* 219.1, 1956, pp. 435-446.

107. McFadden B.A. and Shively L.M. in: Variations in autotrophic life. (Shively L.M. and Barton L.L., eds) Acad. Press, London, 1991, pp. 25–49.
108. McKinlay J.B. and Harwood C.S. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 2010, pp. 11669–11675.
109. Medová H. Phototrophic microorganisms in extreme environments. Ph.D. Thesis Series, No. 1. University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic, 2013, 123 p.
110. Moens L. U.S. Patent No. 6,583,317. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2003.
111. Muller F.M. On the metabolism of the purple sulfur bacteria in organic media. Arch. Mikrobiol. 4, 1933, pp. 131–166.
112. Neidle E.L., Kaplan S. 5-Aminolevulinic acid availability and control of spectral complex formation in hemA and hemT mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. Journal of bacteriology, 175(8), 1993, pp. 2304-2313.
113. Neutzling O., Imhoff J.F., Truper H.G. *Rhodopseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the *Rhodospirillaceae*, dependent on reduced sulfur compounds. Arch. Microbiol. 137, 1984, pp. 256-261.
114. Newton J.W., Wilson P.W. Nitrogen fixation and photoproduction of molecular hydrogen by Thiorhodaceae. Antonie van Leeuwenhoek, 19(1), 1953, pp. 71-77.
115. Ni M., Leung D. Y., Leung M. K., Sumathy K. An overview of hydrogen production from biomass. Fuel processing technology, 87(5), 2006, pp. 461-472.
116. Nichols, B.W., Harris, P., James, A. T. The biosynthesis of trans- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid by *Chlorella vulgaris*. Biochemical and biophysical research communications, 21(5), 1965, pp. 473-479.
117. Niederman R.A. Membrane development in purple photosynthetic bacteria in response to alterations in light intensity and oxygen tension. Photosynthesis Research. 116(2-3), 2013, pp. 333-348.
118. Nishikawa S., Watanabe K., Tanaka T., Miyachi N., Hotta Y., Murooka Y., *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87(6), 1999, pp. 798-804.



119. Nishikawa S., Murooka, Y. 5-Aminolevulinic acid production by fermentation, and agricultural and biomedical applications. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 18(1), 2001, pp. 149-170.
120. Niwa S., Yu L.J., Takeda K., Hirano Y., Kawakami T., Wang-Otomo Z.Y., Miki K. Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. *Nature*. 508(7495), 2014, pp. 228–232.
121. Novak M., Harutyunyan B., Goginyan V., Pavlečić M., Horvat P., Šantek B. Influence of initial malate concentration on 5-ALA synthesis during cultivation of *Rhodobacter capsulatus* MDC 6508 // *Electronic Journal of Natural Sciences NAS RA*, 2(31), 2018, pp. 3-7.
122. Novak M., Pavlečić M., Harutyunyan B., Goginyan V., Horvat P., Šantek B. Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers // *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 12 (3-4), 2017, pp. 113-119.
123. Olah J., Biebl H., Overback J. Photo-organotrophic utilisation of acetate in a stratified eutrophic lake. *Hidrol Kozl*, 1, 1973, pp. 21-27.
124. Papiz M. Z., Prince S. M., Howard T., Cogdell R. J., Isaacs N. W. The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions. *Journal of molecular biology*, 326(5), 2003, pp. 1523-1538.
125. Pardee A. B., Schachman H. K., Stanier R. Y. Chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Nature*, 169(4294), 1952, pp. 282.
126. Parson W. W. The role of P870 in bacterial photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 153(1), 1968, pp. 248-259.
127. Paschinger H. A changed nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum* after substitution of tungsten for molybdenum. *Archives of Microbiology*, 101(1), 1974, pp. 379-389.
128. Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K. E., Nesland, J. M. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer*, 79(12), 1997, pp. 2282-2308
129. Percudani R., Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO reports*, 4(9), 2003, pp. 850-854.
130. Pfennig N. *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch Microbiol*. 100, 1974, pp. 197–206.

131. Pfennig N., Trüper H.G. The family *chromatiaceae*. In The prokaryotes Springer, New York, NY, 1992, pp.3200-3221.
132. Pfennig N., Truper H. G. The phototrophic bacteria Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp. 24-64.
133. Potter J.A., Fyfe P.K., Frolov D., Wakeham M.C., van Grondelle R., Robert B., Jones, M. R. Strong effects of an individual water molecule on the rate of light-driven charge separation in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center. Journal of Biological Chemistry, 280(29), 2005, pp. 27155-27164.
134. Pratt D. C., Frenkel A. W. Studies on Nitrogen Fixation and Photosynthesis of *Rhodospirillum Rubrum*. Plant physiology, 34(3), 1959, 333 p.
135. Qian P., Papiz M.Z., Jackson P.J., Brindley A.A., Ng I.W., Olsen J.D., Dickman M.J., Bullough P.A., Hunter C.N. Three-dimensional structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX complex: dimerization and quinone channels promoted by PufX. Biochemistry 52, 2013, pp. 7575–7585.
136. Rebeiz C.A., Montazer-Zouhour A., Hopen H.J., Wu S. M. Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. Enzyme and microbial technology, 6(9), 1984, pp. 390-396.
137. Rebeiz C. A., Montazer-Zouhour A., Mayasich J. M., Tripathy B. C., Wu S. M., Rebeiz C. C., Friedmann H. C. Photodynamic herbicides. Recent developments and molecular basis of selectivity. Critical reviews in plant sciences, 6(4), 1988, pp. 385-436.
138. Rebeiz C. A., Reddy K. N., Nandihalli U. B., Velu J. Tetrapyrrole-Dependent Photodynamic Herbicides. Photochemistry and photobiology, 52(6), 1990, pp. 1099-1117.
139. Recchia P. A., Davis C.M., Lilburn T.G., Beatty J.T., Parkes-Loach P.S., Hunter C.N. and Loach P.A. Isolation of the PufX protein from *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. Evidence for its interaction with the apolypeptide of the core light-harvesting complex. Biochemistry. 37, 1998 pp. 11055–11063.
140. Resnick S.M and Madigan M.T. Isolation and characterization of a mildly thermophilic non-sulfur purple bacterium containing bacteriochlorophyll b. FEMS Microbiol Lett 65, 1989, pp.165-170.

141. Rockley M.G., Windsor M.W., Cogdell R.J., Parson W.W. Picosecond detection of an intermediate in the photochemical reaction of bacterial photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(6), 1975, pp. 2251-2255.
142. Roderik K. Clayton and William R. Sistrom. *The Photosynthetic Bacteria*, Press, 1978.
143. Rossello-Mora R., Amann R. The species concept for prokaryotes // *FEMS Microbiol. V.* 25. 2001, pp. 39-67.
144. Roszak A.W., Howard T.D., Southall J., Gardiner A.T., Law C.J., Isaacs N.W., Cogdell R. J. Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. *Science*, 302(5652), 2003, pp. 1969-1972.
145. Roszak A. W., Gardiner, A. T., Isaacs, N. W., Cogdell, R. J. Brominated lipids identify lipid binding sites on the surface of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 46(11), 2007, pp. 2909-2916.
146. Roszak A.W., Moulisová V., Reksodipuro A.D., Gardiner A.T., Fujii R., Hashimoto H., Isaacs N.W., Cogdell R.J. New insights into the structure of the reaction centre from *Blastochloris viridis*: evolution in the laboratory. *Biochem J.* 442(1), 2012, pp. 27-37.
147. Sanders Erin R. "Aseptic laboratory techniques: plating methods." *Journal of visualized experiments*: 63, 2012.
148. Sasaki K., Watanabe M., Suda, Y., Ishizuka, A., Noparatnaraporn, N. Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(5), 2005, pp. 481-488.
149. Sasaki K., Ikeda S., Nishizawa Y., Hayashi M. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of fermentation technology*, 65(5), 1987, pp. 511-515.
150. Sasaki K., Tanaka T., Nishio N., Nagai S. Effect of culture pH on the extracellular production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from volatile fatty acids. *Biotechnology letters*, 15(8), 1993, pp. 859-864.
151. Sasaki K., Tanaka T., Nishizawa Y., Hayashi M. Enhanced production of 5-aminolevulinic acid by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 71(6), 1991, pp. 403-406.
152. Sasaki K., Tanaka T., Nishizawa Y., Hayashi M. Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid, by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine waste

- from an anaerobic digester. *Applied microbiology and biotechnology*, 32(6), 1990, pp. 727-731.
153. Sasaki K., Watanabe M., Nishio N. Inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology letters*, 19(5), 1997, pp. 421-424.
154. Sasaki K., Watanabe M., Tanaka T. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(1), 2002, pp. 23-29.
155. Sasikala C. H., Ramana C. V. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. II. Biopolyesters, biopesticide, biofuel, and biofertilizer. In *Advances in applied microbiology*, Academic Press, Vol. 41, 1995, pp. 227-278.
156. Sasikala C. H., Ramana C. H. V., Rao, P. R. Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* OU 001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 20(2), 1995, 123-126.
157. Sasikala C., Ramana C. V., Rao P. R. 5-Aminolevulinic acid: a potential herbicide/insecticide from microorganisms. *Biotechnology progress*, 10(5), 1994, pp. 451-459.
158. Satoh T., Hoshino Y., Kitamura H. *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Archives of microbiology*, 108(3), 1976, pp. 265-269.
159. Sattley W.M. and Madigan M.T. Isolation, Characterization, and Ecology of Cold-Active, Chemolithotrophic, Sulfur-Oxidizing Bacteria from Perennially Ice-Covered Lake Fryxell, Antarctica. *Appl Environ Microbiol.* 72(8),2006, pp. 5562–5568.
160. Schauer S., Chaturvedi S., Randau L., Moser J., Kitabatake M., Lorenz S., Wall K. *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase trapping the thioester intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 2002, pp. 48657-48663.
161. Schimmel P. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annual review of biochemistry*, 56(1), 1987, pp. 125-158.
162. Schultz J.E., Weaver P.F. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of bacteriology*, 149(1), 1982, pp. 181-190.

163. Schultz, J.E., Gotto J.W., Weaver P.F., Yoch, D.C. Regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum* grown under dark, fermentative conditions. *Journal of bacteriology*, 162(3), 1985, pp. 1322-1324.
164. Seifert E. and Pfennig N.F. Chemoautotrophic growth of *Rhodopseudomonas* species with hydrogen and chemotrophic utilization of methanol and formate. *Achiv Microbiol.* 122, 1979, pp. 177-182.
165. Shively J.M., Davidson E. and Marrs B.L. Depression of the synthesis of the intermediate and large forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 138, 1984, pp. 233-236.
166. Statwald-Demchick R., Turner R.F., Gest H. *Rhodopseudomonas cryptolactis*, sp. nov., a new thermotolerant species of budding phototrophic purple bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 71, 1990 pp. 117–121.
167. Suwansaard M. Production of hydrogen and 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria from palm oil mill effluent. Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University, Thailand, 2010.
168. Tabita F.R., Hanson T.E., Li H., Satagopan S., Singh J. and Chan S. Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-Like Proteins and Their RubisCO Homologs. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(4), 2007, pp. 576–599.
169. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol.* V.24(8), 2007, pp. 1596-1599.
170. Tangprasittipap A., Prasertsan P., 5-aminolevulinic acid from photosynthetic bacteria and its applications. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 24(4), 2002, pp. 717-725.
171. Tangprasittipap A., Prasertsan, P., Choorit, W., Sasaki, K. Biosynthesis of intracellular 5-aminolevulinic acid by a newly identified halotolerant *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology letters*, 29(5), 2007, pp. 773-778.
172. Tholozan J.L., Samain E., Grivet J.P., Albagnac G. Propionate metabolism in a methanogenic enrichment culture. Direct reductive carboxylation and acetogenesis pathway. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 1990, pp. 291-298.
173. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., Clustal W. In proving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap Nucleic Acids Res. V.22, 1994, pp. 4673-468.

174. Tripetch P., Szrednicki G. and Borompichaichartkul, C., Separation process of 5-aminolevulinic acid from *Rhodobacter sphaeroides* for increasing value of agricultural product by ion exchange chromatography. In II Asia Pacific Symposium on Postharvest Research Education and Extension: APS2012 1011, September, 2012, pp. 265-271.
175. Trontel A., Slavica A., Novak M., Jelovac N., Novak S., Šantek B. Applying gas chromatography to monitor extracellular free amino acids content in cultivation medium during lactic acid fermentation. *The EuroBiotech Journal*, 1(1), 2017, pp. 29-37.
176. Trüper H. G., Genovese S. Characterization of photosynthetic sulfur bacteria causing red water in Lake Faro (Messina, Sicily). *Limnology and Oceanography*, 13(2), 1968, pp.225-232.
177. US Pat. 5907058, Synthesis of an acid addition salt of delta-aminolevulinic acid from 5-bromo levulinic acid esters, 1999.
178. US Pat. 6583317, Synthesis of acid addition salt of delta-aminolevulinic acid from 5-bromo levulinic acid esters, 2002.
179. Van Niel C.B. The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol. Revs.*, 8(1), 1944, pp. 1-118
180. Viale A.A., Wider E.A. and Battle A.M.C. Some properties of the 5-aminolevulinic synthetase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Rev. Argent. Microbiol.* 15, 1983, pp. 233-238.
181. Walsby A.E. Structure and function of gas vacuoles. *Bacteriological reviews*, 36(1), 1972, pp. 1-32.
182. Wang L., Wilson S., Elliott T. A mutant HemA protein with positive charge close to the N terminus is stabilized against heme-regulated proteolysis in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 181(19), 1999, pp. 6033-6041.
183. Weaver K.E. and Tabita F.R. Isolation and partial characterization of *Rhodospseudomonas sphaeroides* mutants defective in the regulation of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Bacteriol.* 156, 1983, pp. 507-515.
184. Weaver P.F., Wall J.D. and Gest H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 105, 1975, pp. 207–216.
185. Weinstein J. D., Beale S. I. Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 258(11), 1983, pp. 6799-6807.

186. Woodard S. I., Dailey, H. A. Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 316(1), 1995, pp. 110-115.
187. Woronowicz K., Olubanjo O.B., Sung H.C., Lamptey J., Niederman R.A. Differential assembly of polypeptides of the light harvesting 2 complex encoded by distinct operons during acclimation of *Rhodobacter sphaeroides* to low light intensity. Photosynth Res. 111(1-2), 2012, pp. 125–138.
188. Xiao Yi N., "Study of the Fermentation Conditions for 5-Aminolevulinic Acid Production by *Rhodospseudomonas palustris*." Applied Mechanics and Materials. Trans Tech Publications, Vol. 448, 2014, pp. 38-42
189. Yen H.C., Hu N.T., Marrs B.L. Characterization of the gene transfer agent made by an overproducer mutant of *Rhodospseudomonas capsulata*. J Mol Biol. 131, 1979, pp. 157- 168.
190. Zannoni D. Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria. Editors: Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer, 1995, pp. 949-971.
191. Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational biology, 7(1-2), 2000, pp. 203-214.
192. Zhu H., Qu F., Zhu L. H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic Acids Research, 21(22), 1993, 5279 p.
193. Zhu Y.S., Hearst J.E. Regulation of expression of genes for light-harvesting antenna proteins LH-I and LH-II; reaction center polypeptides RC-L, RC-M, and RC-H; and enzymes of bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* by light and oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 83, 1986, pp. 7613-7617.
194. Zorin N.A. Redox properties and active center of phototrophic bacteria hydrogenases. Biochimie, 68(1), 1986, pp. 97-101.

### ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

- 5-ԱԼԹ - 5-ամինալևուլինաթթու
- 5-ԱԼԹԴ - 5-ամինալևուլինաթթու դեհիդրատաց
- 5-ԱԼԹՍ - 5-ամինալևուլինաթթու սինթետաց
- EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
- LH - Light-harvesting complex
- MDC - Microbial Depositray Center
- $R_f$  - Retention factor
- SDS - Sodium Dodecyl Sulfate
- SOUR - specific oxygen uptake rate,
- UV - Ultraviolet
- ԲԱՅՔ - Բարձրարդյունավետությամբ հեղուկային քրոմատոգրաֆիա
- ԳԼՈԼՌՌ - գլուտամիլ փոխազդող կոֆակտոր
- ԳԼՈԼՌՍ - գլուտամիլ փոխազդող սինթետաց
- ԳՍԱ - գլուտամատ-1-սեմիալ դեհիդրոն
- ԳՍԱ-ԱՄ - գլուտամատ-1-սեմիալ դեհիդրոն ամինոտրանսֆերաց
- ԳՍԼ - Գլիցին, սուկցինատ, և ևուլինաթթու
- ԳՔ - Գազային քրոմատոգրաֆիա
- ԴՆԹ - Դեզոքսիռիբոնուկլեյնաթթու
- ՊԾՌ - Պոլիմերային շղթայակառուցվածք
- ՌԿ - Ռեակցիոն կենտրոն
- ՌՆԹ - Ռիբոնուկլեյնաթթու
- Սուկցինիլ CoA - Սուկցինիլ կոֆերմենտ A
- փոխազդող ՌՆԹ



ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գ/ա Կենտրոնի տնօրեն՝  
 ակադեմիկոս Ս. Ս. Մարյան  
 2018թ.



ՏԵՂԵԿԱԼՔ

ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գիտաարտադրական Կենտրոնի  
 «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում շտամի ավանդադրման  
 վերաբերյալ

Սույն տեղեկանքը տրված է առ այն, որ 2018թ. մայիսի 22-ին «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկը (ՄԱԿ) ավանդադրման նպատակով ընդունել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գ/ա Կենտրոնի Այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի կողմից ներկայացված շտամ՝ *Rhodobacter azotoformans* E-10, անհրաժեշտ փաստաթղթերով:

Ավանդադրված շտամին ՄԱԿ-ում տրվել է համապատասխան շիֆր և համար՝ *Rhodobacter azotoformans* E-10 –MDC 6523:

Համաձայն սահմանված կարգի, շտամի փոխանցումն այլ կազմակերպությանը կամ ֆիզիկական անձի, ինչպես նաև դրա օգտագործումն առևտրային և արտադրական նպատակներով հնարավոր է միայն հատուկ գրավոր թույլտվության առկայության դեպքում:

Հիմք՝ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գ/ա Կենտրոնի Այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի վարիչ Վ.Բ. Գոգինյանի դիմումը՝ առ 2018թ. մայիսի 22-ի:

ՄԱԿ-ի ղեկավար, կգթ  Հ. Զարգարյան

ՄԱԿ-ի Կուլտուրաների Հավաքածուի պահպանման պատասխանատու  Ս. Գիսոսյան

ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսաստեխնոլոգիա” գ/ա Կենտրոնի տնօրեն՝  
Ա.Ա. Մաղյան  
2018թ.



ԱԿՏ


Սույն ակտը կազմված է այն մասին, որ, ~~հանձնվել է~~ ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսաստեխնոլոգիա” գ/ա Կենտրոնի Այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի վարիչ Վ.Բ. Գոգինյանի դիմումի՝ առ 2018թ. մայիսի 22-ի, ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսաստեխնոլոգիա” գ/ա Կենտրոնի “Սանրէների ավանդադրման կենտրոն” (ՄԱԿ) հիմնարկին է հանձնվել *Rhodobacter azotoformans* E-10 բակտերիայի մուտանտ շտամը, ավանդադրման նպատակով:

Ըստ ներկայացված շտամի Անձնագրի, նրա հեղինակներ են համարվում Բաղիշ Աշոտի Հարությունյանը և Վիգեն Բորիսի Գոգինյանը:

Շտամը ՄԱԿ-ում ստացել է համապատասխան շիֆր և համար՝ *Rhodobacter azotoformans* E-10 – MDC 6523:

Փաստաթղթերի ընդունման, ձևակերպման գործընթացը կատարել է ՄԱԿ-ի Սանրէների Հավաքածուի պահպանման պատասխանատու Մարինա Կինոսյանը: Շտամի պահպանման համար պատասխանատու է Կենտրոնի Այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի ասպիրանտ՝ Բ.Ա. Հարությունյանը:

Համաձայն սահմանված կարգի, որևէ շտամի փոխանցումն այլ կազմակերպությանը կամ ֆիզիկական անձի, ինչպես նաև դրա օգտագործումն առևտրային և արտադրական նպատակներով հնարավոր է միայն հատուկ գրավոր թույլտվության առկայության դեպքում:

Փաստաթղթերը հանձնեց՝  Բ. Հարությունյանը  
Փաստաթղթերը ընդունեց՝  Մ. Կինոսյանը

25 05 2018 թ.

«УТВЕРЖДАЮ»  
 Директор НПЦ «Армбиотехнология» НАН  
 Академик НАН РА \_\_\_\_\_ А.С. Сагян  
 \_\_\_\_\_ 2018 г.

### ПАСПОРТ

штамма *Rhodobacter azotoformans* MDC 6523 (мутант E10), передаваемого на хранение в  
 «Центр депонирования микроорганизмов» НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА

1.	<i>Организация:</i>	Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН РА, Лаборатория альтернативных источников энергии
2.	<i>Автор и авторский коллектив:</i>	Арутюнян Б.А., Гогинян В.Б.
3.	<i>Почтовый адрес:</i>	Республика Армения, 0056, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14
4.	<i>Номер и название штамма с указанием определителя:</i>	<i>Rhodobacter azotoformans</i> MDC 6523 (мутант E10), полный сиквенс 16S rPHK гена («Microgen», Южная Корея), 2018.
	<i>Таксономия:</i>	Bacteria → Proteobacteria → Alphaproteobacteria → Rhodobacterales → Rhodobacteraceae → Rhodobacter → Rhodobacter azotoformans [Hiraishi et al. 1997].
5.	<i>Источник, дата выделения:</i>	<i>Rhodobacter azotoformans</i> MDC 6523 (мутант E10) ← <i>Rhodobacter azotoformans</i> ← <i>Rhodobacter capsulatus</i> MDC B-6508, НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА ← <i>Rhodobacter capsulatus</i> ИНМИА В-6508, Центр Микробиологии и Депонирования Микроорганизмов НАН РА ← <i>Rhodobacter capsulatus</i> ИНМИА В-6508, Республиканский Центр Депонирования Микроорганизмов НАН РА ← <i>Rhodobacter capsulatus</i> ИНМИА В-6508 (Д-4), Институт Микробиологии НАН ← Термальные минеральные источники, г. Джермук, Армения, 1982.
6.	<i>Сведения о патогенности штамма:</i>	Сведений о патогенности штаммов для данного вида в научной литературе не обнаружено.
7.	<i>Основание для депонирования:</i>	Защита диссертационной работы. Оформление патента.
8.	<i>Целевой продукт, синтезируемый штаммом и активность:</i>	5-аминолевулиновая кислота (5-АЛА), 0,579 г/л.

9.	Способ определения активности синтезируемого продукта:	<p>Определение 5-аминолевулиновой кислоты спектрофотометрическим методом (модифицированная реакция Эрлиха) [Sato K., Ishida K., Shirai M., Shimizu S. Occurrence and some properties of two types d-aminolevulinic acid synthase in a facultative methylotrophe, <i>Protaminobacter ruber</i>. Agricultural and biological chemistry, 1981, 49 3423-3428].</p> <p>Определение 5-аминолевулиновой кислоты методом ВЭЖХ [Namjoshi S., Caccetta R., Edwards J., Benson H. Liquid chromatography assay for 5-amiloveluninic acid: application to <i>in vitro</i> assessment of skin penetration via Dermaportation. J. Chromatography B, 2007, v. 852, issue 1-2, pp. 49-55].</p> <p>Определение 5-аминолевулиновой кислоты газохроматографическим методом [Trontel A., Slavica A., Novak M., Jelovac, N. Novak S., Šantek B. Applying gas chromatography to monitor extracellular free amino acids content in cultivation medium during lactic acid fermentation. The EuroBiotech Journal, 2017, 1(1), 29-37].</p>
10.	Морфологические и культуральные особенности:	<p>Клетки овальные (1,1-1,2 x 1,5-1,8 мкм), в специфических коротких цепочках. Клетки подвижные, имеют полярно расположенный жгутик. Деление - путем перетяжки. Грамотрицательные. На поверхности агара в аэробных условиях образуют красно-оранжевые колонии со светлым ровным краем, выпуклые, гладкие, мягкой консистенции диаметром 0,5-3,0 мм. В глубине агара образуют чечевицеподобные колонии красного цвета. Фотосинтезирующая мембранная система везикулярного типа. Факультативный анаэроб, мезофил, оптимальная температура роста 28-30°C, освещение – 2000-2500 люкс. Диапазон pH 6,8-7,3.</p>
11.	Физиолого-биохимические особенности:	<p>Содержит бактериохлорофилл <u>a</u> и каротиноиды альтернативной серии спираллоксантина. Цвет колоний в анаэробных условиях на свету - желтовато-коричневый. В темноте в микроаэрофильных условиях образует розовое кольцо на уровне поверхности среды, на агаризованных средах колонии ярко-красные. В темноте в анаэробных условиях не растет. Основные максимумы поглощения целых клеток, выращенных в условиях освещения, - 375, 590, 802, 862 и 900 нм. Нуждается в витаминах В<sub>12</sub>, тиамине и биотине. Усваивает малаты, глутаматы, сукцинаты, глицин, левулиновую кислоту. Фотоавтотрофный рост - в присутствии тиосульфата. Обладает гидрогеназной и аспарагиназной активностями. Процентное содержание Т+Ц в ДНК - 62,2±0,5 мол%.</p>
12.	Условия хранения и состав питательных сред:	<p>Хранение в жидкой и арагизованной среде Ормеруда (пересевы - каждые 6 месяцев). Культивирование анаэробно, при температуре 28°C, освещении 2000-2500 люкс, в люминостате.</p> <p>Состав среды Ормеруда (Ormerod et al., 1961), г/л: малат Na – 2.0, дрожжевой экстракт – 0.1, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0.2, CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O – 0.08, FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O - 0.01, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.6, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1.25, EDTA – 0.02, агар – 20, pH 6,8-7,3. Стерилизация: 1 ати, 20 мин.</p>

		<p><i>Раствор микроэлементов</i> (г/л): <math>H_3BO_3</math> - 0.028, <math>MnSO_4 \times 4H_2O</math> - 0.021, <math>Na_2MoO_4 \times 2H_2O</math> - 0.075, <math>ZnSO_4 \times 2H_2O</math> - 0.0024, <math>Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O</math> - 0.01.</p> <p>Глютамат-малатная среда (GM) (Nishikawa et al., 1999), г/л:  дрожжевой экстракт - 1.5, <math>C_4H_4Na_2O_5</math> - 2.7, <math>C_5H_8NO_4Na</math> - 2.0, <math>(NH_4)_2SO_4 \times 7H_2O</math> - 0.8, <math>KH_2PO_4</math> - 0.5, <math>K_2HPO_4</math> - 0.5, <math>MgSO_4 \times 7H_2O</math> - 0.2, <math>CaCl_2 \times 2H_2O</math> - 0.053, <math>MnSO_4 \times 7H_2O</math> - <math>1.2 \times 10^{-3}</math>, витамин B<sub>1</sub> - <math>1.0 \times 10^{-3}</math>, никотиновая кислота - <math>1.0 \times 10^{-3}</math>, биотин - <math>1.0 \times 10^{-5}</math>, pH = 6.8-7.3.</p>
13.	<i>Другие особенности:</i>	<p>1) Штамм получен методами индукционного мутагенеза и селекции.</p> <p>2) Сиквенс 16S рРНК гена:</p> <p>СААGTCGGGTCTCCCAGGCGGATGCTTATCCGTTAGGTGTGTC  ACCGAACAGCATGCTGCCCGACGACTGGCATTATCGTTTAC  GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC  TTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCGAGCCAGTGAGCCGCCTTCG  CCTGCTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTCACCTCTACAC  TCGGAATCCACTCACCTCTCTCGACCTCAAGACTGGGAGTTT  СААAGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGATTCACCCCTGA  CTTCCAGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCCAGTAATCCGA  ATAACGCTAGCCCCCTCCGTATTACCGCGGTGCTGGCACGG  AGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGGTGGTACCGTCAATTACTTCCC  ACCTGAAAGATCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCGATCACG  CGGCATGGCTAGATCAGGCTTGGCGCCATTGTCTAAGATTCCC  CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA  GTGTGGCTGATCATCTCTCAAACCAGCTATGGATCGTCGGCT  TGGTAGGCCATTACCCCACTACCTAATCCAACGCGGGC  СААТССААAGGCGААААТCTTТСССССГАAGGGCACАТАСG  GTATTACTCCAGTTTCCCGGGCTATTCCGTACCTTTGGGCA  TGTTCCACGCGTACTACCCGTCGCCGCTAAGTCCGAAGA  CTTCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAT  TCTGACGAAAAAAAAAATGCAGTCGTCGGGCAGCATGCTGT  TCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGT  ACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGC  AGAACCTTACCAACCCTTGACATGGCGATCGCGTTCCAGAG  ATGGTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCGCACACAGGTGCTGCATG  GCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTCCGGTTAAGTCCGGC  AACGAGCGCAACCCACGTCCTCAGTTGCCAGCATTAGTTGG  GCACTCTGGGGAAACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGT  GGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACA  CACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCAAAAAG  CTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAA  GTCGGAATCGTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGAA  TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG  AATTGGTTCTACCCGAAGGCGGTGCGCCAACCTCGCAAGAGG  AGGCAGCCGACCACGGTAGGATCAGTGACTGGGGTGAAGTC</p>

		GTACGGGGGAAACCGTATAA
14.	Ссылки на штамм:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Арутюнян Б.А. Выявление продуцентов 5-аминолевулиновой кислоты среди культур пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий. Биологический Журнал Армении, 2018, 2(70), 6-13.</li> <li>2. Harutyunyan B. Molecular-genetic verification of the taxonomic status of two strains of purple non-sulfur photosynthetic bacteria based on the analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene. Electronic Journal of Natural Sciences NAS RA, 2018, 2(31), 57-60.</li> <li>3. Novak M., Pavlečić M., Harutyunyan B., Goginyan V., Horvat P., Šantek B. Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 2017, 12 (3-4), 113-119.</li> <li>4. Harutyunyan B., Novak M., Pavlečić M., Goginyan V., Hovhannesian R., Melkumyan I., Šantek B. Influence of glycine, succinate, levulinic acid and glutamate concentrations on growth of purple non-sulfur photosynthetic bacteria and 5-aminolevulinic acid production. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 2018, Vol. 7, Issue 4, 3839-3846.</li> </ol>

Арутюнян Б.А.



Гогинян В.Б.

