

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВИРОЩУВАННЯ РІЗНИХ ШТАМІВ
ДРІЖДЖІВ НА РІЗНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ З МЕТОЮ
ОТРИМАННЯ ГЛУТАТІОНУ: ВПЛИВ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ НА
ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ**

Допущено до захисту
«__»_____2025 р.
Завідуючий
кафедрою _____

Оцінка «_____»
Голова ЕК

«__»_____2025 р.

Кваліфікаційна робота бакалавра
студента кафедри молекулярної біології
та біотехнології
Запорожця Дмитра Валентиновича

Науковий керівник:
д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович
Науковий консультант:
Молодший технолог (нових продуктів)
ПрАТ «Компанія Ензим» Чепіга Дмитро
Анатолійович

АНОТАЦІЯ

Об'єктом дослідження даної роботи є дріжджі роду *Saccharomyces*, вирощені в умовах контрольованого культивування. Предмет дослідження – взаємозв'язок між інтенсивністю росту дріжджових клітин і рівнем синтезу глутатіону.

Методи дослідження: мікробіологічні, біохімічні, спектрофотометричні, аналітичні.

У межах дослідження проаналізовано особливості синтезу глутатіону дріжджами за різних умов культивування, включаючи температуру, тривалість росту та наявність хімічних стрес-факторів. Доведено, що температурне підвищення до 33 °C сприяє збільшенню синтезу глутатіону на $\approx 18.1\%$, що свідчить про активацію антиоксидантної відповіді клітин. Вивчено вплив іонів Fe^{2+} , Na^+ та Ca^{2+} на біосинтез GSH, де оптимальним виявилось додавання FeSO_4 при 33 °C. Також встановлено, що застосування амінокислот-попередників (глутамату, цистеїну, гліцину) суттєво підвищує накопичення глутатіону в дріжджових клітинах.

Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення біотехнологічних процесів з отримання глутатіону у промислових масштабах.

Роботу виконано на базі інноваційного центру з досліджень та розробок ПрАТ «Компанія Ензим»

Ключові слова: *глутатіон, дріжджі, окисний стрес, культивування, антиоксиданти, біосинтез, Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The object of this study is yeast of the *Saccharomyces* genus cultivated under controlled conditions. The subject of the research is the relationship between the growth intensity of yeast cells and the level of glutathione synthesis.

Methods: Microbiological, biochemical, spectrophotometric, and analytical methods were applied.

The study analyzed the features of glutathione biosynthesis in yeast under various cultivation conditions, including temperature, cultivation time, and the presence of chemical stress factors. It was shown that increasing the temperature to 33 °C enhanced glutathione synthesis by approximately 18.1%, indicating activation of the cellular antioxidant response. The effects of Fe²⁺, Na⁺, and Ca²⁺ ions on glutathione biosynthesis were investigated, with FeSO₄ supplementation at 33 °C proving to be the most effective. It was also established that the use of amino acid precursors (glutamate, cysteine, glycine) significantly increases glutathione accumulation in yeast cells.

The results obtained may be applied to improve biotechnological processes for large-scale industrial production of glutathione.

The research was conducted at the Innovation R&D Center of PJSC "Enzym Company".

Keywords: *glutathione, yeast, oxidative stress, cultivation, antioxidants, biosynthesis, Saccharomyces cerevisiae*

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Біологічна характеристика дріжджів та їхнє значення в біотехнології.....	9
1.2. Взаємозв'язок інтенсивності росту дріжджів та синтезу глутатіону	12
1.2.1. Регуляція синтезу глутатіону	12
1.2.2. Фактори, що впливають на інтенсивність росту і продукування глутатіону	12
1.2.3. Молекулярні механізми та експериментальні дані	13
1.3. Глутатіон: структура, функції та значення.....	14
1.3.1. Хімічна структура і метаболізм	14
1.3.2. Антиоксидантна та захисна функція	14
1.3.3. Медичне і ветеринарне застосування.....	15
1.3.4. Перспективи біотехнологічного використання	15
1.3.5. Аналітичні та візуалізаційні методи визначення глутатіону.....	16
1.4. Біологічні особливості дріжджів як продуцентів глутатіону.....	17
1.4.1. Метаболізм глутатіону в дріжджових клітинах.....	17
1.4.2. Перспективні штами-продуценти глутатіону	18
1.4.3. Фізіологічні фактори впливу	18
1.4.4. Метаболічні зв'язки з біосинтезом глутатіону	18
1.4.5. Біологічна роль глутатіону в дріжджах.....	19
1.4.6. Молекулярно-генетичні механізми регуляції синтезу глутатіону	19
1.5. Фактори, що впливають на біосинтез глутатіону дріжджами	22
1.5.1. Склад поживного середовища.....	23
1.5.2. Умови культивування	23

1.5.3. Фізіологічний стан культури	23
1.5.4. Вплив осмотичного та окисного стресу	24
1.5.5. Генетичні фактори	24
1.6. Взаємозв'язок між ростом дріжджів та синтезом глутатіону	25
1.6.1. Фази росту, швидкість розмноження та глутатіоногенез	25
1.6.2. Обмеження живлення та метаболічна адаптація.....	25
1.6.3. Технологічні стратегії: від двофазного культивування до генетичної оптимізації	26
1.7. Сучасні підходи до підвищення синтезу глутатіону дріжджами.....	26
1.7.1. Метаболічна інженерія та регуляція шляхів.....	26
1.7.2. Застосування регуляторів та стимуляторів	30
1.7.3. Технологічні прийоми: контроль стресу і росту	31
1.7.4. Комбінація поживних факторів.....	31
1.7.5. Перспективи біоінформатики та синтетичної біології	31
1.7.6. Практичні протоколи та моделі оптимізації синтезу глутатіону	31
1.8. Обґрунтування доцільності проведення дослідження.....	34
1.8.1. Науково-практичне значення вивчення взаємозв'язку між ростом дріжджів та синтезом глутатіону	34
1.8.2. Перспективи оптимізації технологічних процесів.....	34
1.8.3. Генетична та системна інженерія як інструмент підвищення продуктивності	35
1.8.4. Прикладне та економічне обґрунтування	35
1.8.5. Необхідність комплексного підходу	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	39
2.1. Дріжджові штами та загальний план експерименту	39
2.2. Склад поживного середовища та експериментальні варіації.....	40

2.3. Умови культивування	41
2.4. Аналітичні методи.....	42
2.4.1. Визначення оптичної щільності (OD600)	42
2.4.2. Визначення рН середовища.....	43
2.4.3. Визначення вмісту цукру та спирту.....	43
2.4.4. Визначення вмісту етилового спирту методом ВЕРХ (HPLC).....	43
2.4.5. Визначення формольного числа.....	44
2.4.6. Визначення абсолютно сухої біомаси (АСБ)	44
2.4.7. Визначення глутатіону (GSH) за методом DTNB.....	44
2.5. Статистична обробка результатів.....	45
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ	46
3.1. Підбір штаму з найкращими показниками синтезу глутатіону та росту. .	46
3.2. Динаміка росту дріжджів на різних середовищах	47
3.3. Зміни супровідних фізико-хімічних показників (рН, АСБ, формольне число).....	49
3.4. Оцінка метаболічної активності (вміст цукру та спирту)	50
3.5. Порівняння синтезу глутатіону у двох штамів і обґрунтування вибору для подальших дослідів.....	51
3.6. Вплив температури культивування на синтез глутатіону.....	52
3.7. Вплив мікроелементів (NaCl, FeSO ₄ , CaCl ₂) на синтез глутатіону.....	53
3.8. Зв'язок між ростом (OD, рН, АСБ) і глутатіоногенезом у третій серії експериментів	56
3.9. Дослідження синтезу глутатіону штамом 1 із додаванням різних комбінацій попередників біосинтезу глутатіону.....	58
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	61

ВСТУП

Глутатіон (γ -глутаміл-цистеїніл-гліцин) є одним із найважливіших низькомолекулярних тіолових антиоксидантів, який відіграє ключову роль у захисті клітин від окисного стресу, підтримці редокс-балансу та детоксикації ксенобіотиків. Завдяки своїм унікальним біологічним властивостям глутатіон широко застосовується у фармацевтичній, харчовій, косметичній галузях та медицині.

Мікробіологічний синтез глутатіону з використанням дріжджів є одним із найперспективніших напрямків біотехнології, оскільки дозволяє отримувати цей цінний біологічно активний компонент у промислових масштабах. Особливу увагу привертають дріжджі роду *Saccharomyces*, які здатні накопичувати значні концентрації глутатіону. Проте продуктивність дріжджових клітин суттєво залежить від умов культивування, складу поживного середовища та фізіологічного стану культури.

Актуальність теми дослідження полягає в необхідності вдосконалення біотехнологічних процесів отримання глутатіону шляхом встановлення оптимальних умов культивування дріжджів, що забезпечують максимальну продуктивність штамів-продуцентів. Визначення взаємозв'язку між інтенсивністю росту дріжджових культур та їх здатністю до накопичення глутатіону дозволить розробити ефективні стратегії оптимізації біотехнологічних процесів та підвищити рентабельність виробництва.

Метою дипломної роботи є виявлення та характеристика взаємозв'язку між інтенсивністю росту дріжджів та синтезом глутатіону, визначення оптимальних умов для забезпечення максимальної продуктивності дріжджових клітин у біотехнологічних процесах.

Об'єкт дослідження: дріжджі, вирощені на поживних середовищах, з подальшим аналізом кількісного вмісту глутатіону, синтезованого в результаті культивування.

Предмет дослідження: взаємозв'язок між інтенсивністю росту дріжджів та їх продуктивністю щодо синтезу глутатіону, залежність накопичення глутатіону від умов культивування.

Завдання роботи:

1. Провести аналітичний огляд наукової літератури щодо біологічної ролі глутатіону, особливостей його синтезу в дріжджах і впливу умов культивування на продуктивність штамів-продуцентів.
2. Визначити взаємозв'язок між інтенсивністю росту дріжджових різних штамів дріжджових клітин і здатністю до накопичення глутатіону.
3. Оцінити вплив тривалості культивування на рівень синтезу глутатіону на різних стадіях росту дріжджової культури.
4. Дослідити вплив температурного фактору на синтез глутатіону та інтерпретувати можливі біохімічні механізми змін у синтезі.
5. Встановити ефекти додавання неорганічних солей (FeSO_4 , NaCl , CaCl_2) за різних температур на рівень синтезу глутатіону в дріжджах.
6. Проаналізувати ефективність використання амінокислот-попередників (глутамат, цистеїн, гліцин) та їхніх похідних для стимуляції біосинтезу глутатіону.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна характеристика дріжджів та їхнє значення в біотехнології

Дріжджі – це еукаріотичні одноклітинні мікроорганізми, які належать до царства грибів. Їхнє значення для науки та промисловості визначається високою адаптивністю, метаболічною гнучкістю та здатністю синтезувати важливі біологічно активні речовини, зокрема глутатіон антиоксидант, що відіграє ключову роль у клітинному метаболізмі [1, 2].

Найвідомішим видом є *Saccharomyces cerevisiae*, що активно використовується в харчовій промисловості (випічка, пивоваріння, виноробство), а також у сучасній біотехнології. Його геном повністю секвеновано, і він є зручною модельною системою для дослідження клітинного росту, старіння та експресії генів [2].

Клітинна будова дріжджів включає типові еукаріотичні органели: ядро, мітохондрії, вакуолі, ендоплазматичний ретикулум тощо. Важливою особливістю є здатність змінювати метаболізм залежно від умов: при наявності кисню використовують аеробне дихання, а при його відсутності – анаеробне бродіння, під час якого утворюється етанол та вуглекислий газ [3].

Дріжджі мають здатність до розмноження брунькуванням або поділом. У сприятливих умовах клітинний цикл триває 90–120 хвилин. Клітини можуть накопичувати шрами брунькування, що слугує маркером віку. Відомо, що зі старінням пов'язані зміни у метаболізмі та зниження продукції глутатіону [4].

Таксономічно дріжджі поділяються на представників *Ascomycota* та *Basidiomycota*. Крім *Saccharomyces*, у біотехнології використовуються види *Candida utilis*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces marxianus* та *Yarrowia lipolytica*, які демонструють різні метаболічні властивості й застосовуються для синтезу білків, ферментів, жирів, вітамінів та, зокрема, глутатіону [1, 5].

Глутатіон (GSH) – трипептид, синтез якого у дріжджах тісно пов'язаний з темпом росту клітин. Він виконує роль антиоксиданту, нейтралізуючи активні форми кисню, та бере участь у регуляції клітинного поділу, детоксикації та

підтримці внутрішньоклітинного редокс-балансу. Дослідження показують, що за умов швидкого росту або стресу, синтез глутатіону активується, що підвищує стійкість клітин [6].

У промисловості глутатіон отримують переважно шляхом біосинтезу з використанням оптимізованих штамів *S. cerevisiae* та *C. utilis*. Важливими параметрами є інтенсивність росту, склад середовища та наявність попередників, зокрема амінокислот – глутамату, цистеїну та гліцину [6].

У біотехнологічній практиці різні види дріжджів демонструють відмінну здатність до синтезу глутатіону, що обумовлено їхнім метаболічним профілем, температурною толерантністю, потребами в поживних речовинах та чутливістю до стресу.

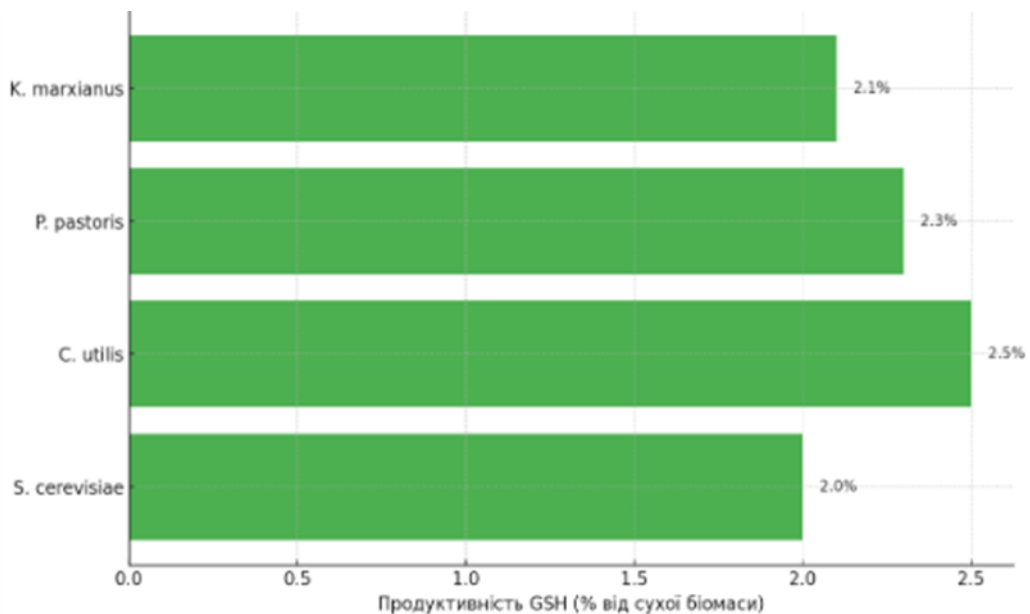


Рис. 1.1. Порівняння синтезу GSH у різних видах дріжджів [6, 18, 31]

Метаболічні особливості відіграють критичну роль у здатності штамів до біосинтезу глутатіону. Наприклад, *C. utilis* та *K. marxianus*, завдяки переважно респіраторному метаболізму, мають підвищений рівень утворення активних форм кисню, що активує антиоксидантну відповідь, включаючи синтез GSH. *P. pastoris* відзначається здатністю до експресії гетерологічних генів, що робить його зручним для генної інженерії.

Порівняння синтезу GSH найбільш поширених біотехнологічних видів дріжджів [6, 10, 18, 30, 31]

Вид дріжджів	Максимальна продуктивність GSH (% від СБМ)	Особливості метаболізму	Температурний оптимум (°C)	Переваги	Недоліки
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5–2.0%	Ферментативний метаболізм, чутливий до стресу	28–30	Добре вивчений геном, модельний організм	Високе споживання глюкози, чутливість до етанолу
<i>Candida utilis</i>	2.0–2.5%	Респіраторний метаболізм, активний у присутності O ₂	30–33	Висока продуктивність, толерантність до стресу	Потребує аеробних умов, складніші вимоги до середовища
<i>Pichia pastoris</i>	1.8–2.3%	Метилотроф, здатний до посттрансляційних модифікацій	28–30	Висока ефективність експресії білків, GSH	Необхідність метанолу як індуктору
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.5–2.1%	Термотолерантний, респіраторний	35–40	Висока температура росту, економія енерговитрат	Менш досліджений генетично, обмежена бібліотека промоторів

З практичної точки зору вибір виду визначається специфікою виробництва:

- *S. cerevisiae* підходить для систем із вже налагодженими технологіями.
- *C. utilis* ефективна для масштабних виробництв за аеробних умов.
- *P. pastoris* – для рекомбінантних білків і комбінованого виробництва GSH.
- *K. marxianus* – перспективний у регіонах з високою температурою довкілля.

Значення дріжджів не обмежується харчовою промисловістю. Вони використовуються для виробництва етанолу, біопрепаратів, пробіотиків, ферментів та як агенти біоремедіації. Їхня стійкість до стресових факторів – температури, рН, осмотичного тиску – обумовлена адаптивними механізмами, серед яких центральне місце займає глутатіонова система [3].

Таким чином, дріжджі є ключовими організмами в біотехнології завдяки унікальному поєднанню фізіологічних властивостей, високій швидкості росту та здатності до синтезу цінних метаболітів, серед яких особливе місце займає глутатіон.

1.2. Взаємозв'язок інтенсивності росту дріжджів та синтезу глутатіону

Дослідження, присвячені виявленню взаємозв'язку між швидкістю росту дріжджів і продукцією глутатіону, свідчать про тісну регуляцію синтезу цього антиоксидантного трипептиду, що безпосередньо впливає на життєздатність та адаптаційні можливості клітин

1.2.1. Регуляція синтезу глутатіону

Глутатіон (γ -L-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин) синтезується у дріжджах за участю ключових ферментів (глутамат-цистеїнотрансфераза та глутатіон-синтетаза). За нормальних умов його базовий рівень забезпечує підтримку клітинного редокс-балансу. Проте численні дослідження вказують на те, що фактори, що стимулюють активний ріст або виникнення окислювального стресу, призводять до підвищення активності цих ферментів і, відповідно, посиленого синтезу глутатіону [6].

1.2.2. Фактори, що впливають на інтенсивність росту і продукування глутатіону

На інтенсивність росту дріжджових клітин впливають як внутрішньоклітинні механізми, так і зовнішні фактори:

Склад і концентрація поживних речовин. Наявність або дефіцит певних амінокислот (наприклад, глутамату та цистеїну) безпосередньо впливає на швидкість синтезу глутатіону.

Окислювальний стрес. В умовах підвищеної генерації реактивних форм кисню клітини активізують системи захисту, серед яких центральне місце займає збільшення синтезу глутатіону.

Ритм клітинного циклу. Найбільш активний синтез спостерігається в періоди швидкого розмноження (наприклад, під час експоненціального росту), що дозволяє забезпечити клітинну стійкість до стресових умов.

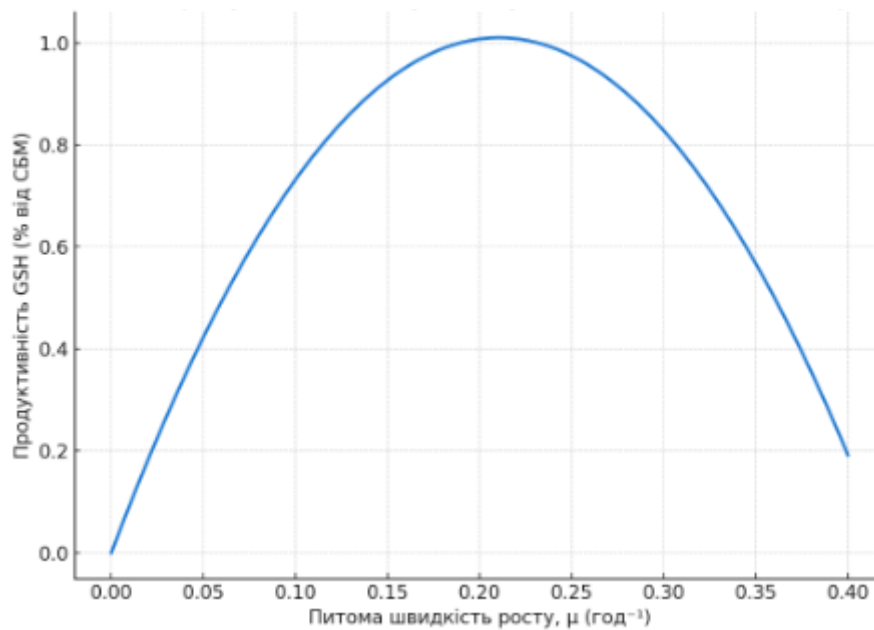


Рис. 1.2. Залежність синтезу GSH від питомої швидкості росту

1.2.3. Молекулярні механізми та експериментальні дані

Експериментальні дослідження на модельних об'єктах, зокрема *Saccharomyces cerevisiae*, показали, що зростання клітин безпосередньо корелює з рівнем глутатіону. За активного метаболізму відбувається активна експресія генів, відповідальних за синтез цього трипептиду, що підвищує загальну здатність клітин до протидії окислювальному стресу і підтримує їх життєдіяльність [6]. Також, зниження швидкості росту або наявність дефіциту поживних речовин призводить до зменшення синтезу глутатіону, що може негативно позначатися на стійкості клітин до змін зовнішнього середовища.

Таким чином, існує безпосередній зв'язок між інтенсивністю росту дріжджів і рівнем синтезу глутатіону, що має важливе практичне значення для оптимізації біотехнологічних процесів (наприклад, виробництва антиоксидантів, біопрепаратів та ферментів). Виявлення та аналіз молекулярних механізмів регуляції дозволяє адаптувати технології культивування дріжджів для збільшення продуктивності та стійкості за умов промислового виробництва.

1.3. Глутатіон: структура, функції та значення

1.3.1. Хімічна структура і метаболізм

Глутатіон (GSH) – трипептид, що складається з глутамату, цистеїну та гліцину, з унікальним γ -пептидним зв'язком, який робить його стійким до дії звичайних пептидаз [1]. Основну біологічну активність визначає тіолова група цистеїну, що забезпечує антиоксидантні властивості.

Синтез глутатіону відбувається в цитозолі у два етапи, за участі ферментів GCL і GS, з використанням АТФ. Подальша регенерація GSH із його окисленої форми (GSSG) забезпечується глутатіонредуктазою (GR) за участі NADPH [6]. У дріжджів цей процес регулюється генами GSH1 і GSH2, експресія яких зростає при окисному стресі [6].

1.3.2. Антиоксидантна та захисна функція

Глутатіон – ключовий компонент клітинного редокс-гомеостазу. Він нейтралізує активні форми кисню (АФК), захищаючи клітинні структури від пошкодження [1, 3]. Окрім прямої нейтралізації АФК, він бере участь у функціонуванні ферментативних антиоксидантів:

- Глутатіонпероксидаза (GPx) – відновлення H_2O_2 ,
- Глутатіонредуктаза (GR) – відновлення GSSG до GSH,
- GST – детоксикація електрофільних метаболітів,
- Глутаредоксини (Grx) – регуляція білків через глутатіонілювання [6].

У дріжджів GSH є критичним для протидії стресу, спричиненому металами, окисниками чи старінням. Мутанти *S. cerevisiae* з дефіцитом GSH виявляють високу чутливість до зовнішніх стресів [4].

1.3.3. Медичне і ветеринарне застосування

Завдяки антиоксидантній, імуномодулюючій та детоксикаційній функції глутатіон широко використовується як у медицині, так і у ветеринарії. У медицині його застосовують для підтримки функцій печінки, лікування нейродегенеративних і респіраторних захворювань, а також в онкології, хоча з обережністю, оскільки високий рівень глутатіону може сприяти розвитку хіміорезистентності. У ветеринарній практиці глутатіон використовують для лікування отруєнь, підтримки печінкової функції, зменшення стресу у тварин і покращення їхньої репродуктивної здатності [5]. Оскільки біодоступність глутатіону при пероральному прийомі залишається обмеженою, перевага надається застосуванню його попередників, таких як N-ацетилцистеїн (NAC) і S-аденозилметіонін (SAME), або ж використанню інкапсуляції у ліпосоми чи наночастинки.

1.3.4. Перспективи біотехнологічного використання

Глутатіон є цінною сполукою для:

- промислового виробництва за участі дріжджів та бактерій (*S. cerevisiae*, *C. utilis*) з метою отримання натурального антиоксиданту [4];
- функціональних продуктів і БАДів – як інгредієнт із протистресовими властивостями;
- біосенсорів – для виявлення токсичних речовин;
- біоремедіації – як захисний фактор у мікроорганізмів при детоксикації забруднень;
- нанотехнологій – як стабілізатор або покриття наночастинок;
- рослинництва – підвищення стійкості до стресів;

- тваринництва – поліпшення імунітету та продуктивності [4].

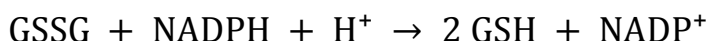
1.3.5. Аналітичні та візуалізаційні методи визначення глутатіону

Точне визначення рівня глутатіону в клітинах є критично важливим для оцінки метаболічного стану дріжджів. У сучасній біотехнології використовуються різні методи аналізу, що дозволяють визначати як загальний вміст глутатіону, так і співвідношення відновленої (GSH) та окисленої (GSSG) форм.

Високоєфективна рідинна хроматографія з мас-спектрометрією (HPLC-MS) у поєднанні з електроспрей-іонізаційною мас-спектрометрією (ESI-MS) є золотим стандартом у визначенні глутатіону:

- Розділення GSH та GSSG досягається за допомогою C18 колонки з мобільною фазою на основі фосфатного буфера (pH 2.5–3.0) та метанолу.
- Ліміт виявлення – 1–5 нмоль/мл.
- Метод дозволяє кількісно оцінити як GSH, так і GSSG у зразках клітинних екстрактів або середовища [68].

Найпоширеніший ферментативний метод базується на використанні NADPH-залежної глутатіонредуктази, яка відновлює GSSG до GSH:



- Реакція моніториться спектрофотометрично при 340 нм (споживання NADPH).
- Для розділення GSH і GSSG зразок перед аналізом обробляють N-етилмалеїдом (NEM), який блокує вільні SH-групи GSH [69].
- Метод чутливий і простий у виконанні, підходить для рутинного аналізу.

Сучасні флуоресцентні зонди дозволяють візуалізувати глутатіон *in vivo* з просторовою роздільністю:

- monochlorobimane (MCB) – реагує з GSH з утворенням флуоресцентного кон'югату; збудження на 380 нм, емісія при 461 нм [70];
- roGFP2-Grx1 – генетично кодований біосенсор, що змінює флуоресценцію залежно від редокс-стану клітини;
- ThiolTracker™ Violet – комерційний барвник, вибірково до відновлених тіолів, у т.ч. GSH.

Такі методи дозволяють вивчати локалізацію глутатіону в органелах (наприклад, у мітохондріях або ядрах) та моніторити зміну його рівня у режимі реального часу під дією стресу.

Спектрофотометричний метод з Ellman's reagent (DTNB):

DTNB (5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойна кислота)) реагує з вільними SH-групами GSH, утворюючи жовте з'єднання TNB, яке детектується при 412 нм. Хоча метод недиференційний для GSSG, він дозволяє швидко оцінити загальний рівень тіолів [6].

1.4. Біологічні особливості дріжджів як продуцентів глутатіону

1.4.1. Метаболізм глутатіону в дріжджових клітинах

У дріжджах глутатіон синтезується у цитозолі шляхом двох АТФ-залежних реакцій за участі γ -глутамілцистеїнсинтетази (Gsh1p) та глутатіонсинтетази (Gsh2p). Регенерація окисленої форми глутатіону (GSSG) до відновленої (GSH) здійснюється глутатіонредуктазою за участі NADPH, який продукується у пентозофосфатному шляху [6, 7].

Регуляція синтезу глутатіону в *S. cerevisiae* відбувається як на транскрипційному рівні (через Yap1p, Met4p), так і на рівні доступності амінокислот-попередників – цистеїну, глутамату та гліцину [6, 8].

1.4.2. Перспективні штами-продуценти глутатіону

До найбільш перспективних продуцентів глутатіону належать штами *S. cerevisiae*, *Candida utilis* і *Pichia pastoris*, які здатні накопичувати до 2,5% глутатіону від сухої біомаси [9, 10]. Генетична модифікація штамів із надекспресією GSH1 та GSH2 дозволяє підвищити продуктивність синтезу глутатіону на понад 60% [10]

Також цінними є штами *Kluuveromyces marxianus*, здатні до ефективного накопичення глутатіону при 35–40 °С, що знижує енерговитрати на охолодження у промисловому культивуванні [31].

1.4.3. Фізіологічні фактори впливу

Накопичення глутатіону змінюється протягом росту культури. Найвищий рівень досягається на межі експоненціальної та стаціонарної фаз [11]. Крім того, дріжджі з респіраторним метаболізмом продукують більше GSH порівняно з ферментативними, оскільки в їх клітинах формується більше активних форм кисню, які стимулюють антиоксидантну відповідь [3, 12].

Ефективний транспорт амінокислот-попередників (особливо цистеїну) також впливає на рівень синтезу глутатіону [13].

1.4.4. Метаболічні зв'язки з біосинтезом глутатіону

Синтез глутатіону інтегровано в загальний метаболізм клітини. Основні пов'язані шляхи:

- сірковий обмін – визначає наявність цистеїну як лімітуючого субстрату [7],
- пентозофосфатний шлях – джерело NADPH для редукції GSSG [8],
- глутатіон-S-трансферази – підсилюють детоксикацію ксенобіотиків, впливаючи на витрати GSH [9],

- трегалоза – штами з високим рівнем трегалози краще накопичують глутатіон, завдяки підвищеній стресостійкості [10].

1.4.5. Біологічна роль глутатіону в дріжджах

Глутатіон є критично важливим для нейтралізації активних форм кисню, збереження редокс-балансу, згортання білків, детоксикації шкідливих сполук, а також регуляції експресії генів і клітинного циклу [1, 4, 6]. Його дефіцит призводить до порушення функції мітохондрій, зниження життєздатності клітин і підвищення чутливості до етанолу та інших стресових факторів. Саме тому високий вміст GSH важливий для штамів, які використовуються у виноробстві й пивоварінні [11].

1.4.6. Молекулярно-генетичні механізми регуляції синтезу глутатіону

Регуляція біосинтезу глутатіону у дріжджів відбувається на декількох рівнях – від транскрипційного контролю генів до посттрансляційної модифікації ферментів, що забезпечує швидку адаптацію клітин до змін умов середовища.

Центральну роль у регуляції експресії генів GSH1 і GSH2 відіграють транскрипційні фактори:

Yap1p – головний регулятор окисного стресу у дріжджів, що містить редокс-чутливі цистеїнові залишки, які утворюють дисульфідні зв'язки, що блокують його експорт із ядра, сприяючи накопиченню в ядрі та активації транскрипції цільових генів [34]. Активація Yap1p відбувається за участі тіоредоксинів та глутаредоксинів, які виступають "сенсорами" окисно-відновного стану клітини [35]. У промоторних ділянках GSH1 і GSH2 ідентифіковано елементи відгуку Yap1p (YRE, Yap1 Response Element), що мають консенсусну послідовність 5'-TTACTAA-3' [36]. Зв'язування Yap1p з цими елементами призводить до активації транскрипції генів синтезу глутатіону в 3-5 разів при окисному стресі.

Met4p – майстер-регулятор метаболізму сірки, який функціонує в комплексі з Met28p та Cbf1p. Цей комплекс контролює транскрипцію більше 30 генів

метаболізму сірки, включаючи гени біосинтезу цистеїну – лімітуючого прекурсора для синтезу глутатіону [37]. Met4p є ключовим інтегратором сигналів про доступність сірковмісних амінокислот та окисного стресу. Зокрема, при дефіциті метіоніну або цистеїну відбувається активація Met4p через деубіквітування, що призводить до посилення експресії GSH1 [38].

Msn2p/Msn4p – транскрипційні фактори загальної стресової відповіді, що розпізнають STRE-елементи (Stress Response Element) з консенсусною послідовністю 5'-AGGGG-3' [39]. Промотори GSH1 і GSH2 містять STRE-елементи, що забезпечує координовану регуляцію синтезу глутатіону під час різних типів стресу (тепловий, осмотичний, дефіцит поживних речовин).

Skn7p – фактор транскрипції, що функціонує у співпраці з Yap1p для активації антиоксидантних генів. Skn7p взаємодіє з H₂O₂-активованим Yap1p та посилює експресію генів глутаредоксинів і глутатіонзалежних ферментів [40]

Активація транскрипційних факторів відбувається через складні сигнальні каскади:

TOR-сигналінг (Target Of Rapamycin) – центральний регуляторний шлях, що контролює баланс між ростом клітин та їх стійкістю до стресів. Інгібування TOR (наприклад, при дефіциті азоту або дії рапаміцину) призводить до активації стрес-чутливих факторів транскрипції Msn2p/Msn4p та індукції генів стресової відповіді, включаючи GSH1 і GSH2 [41]. Досліджено, що TOR комплекс 1 (TORC1) опосередковує азотну регуляцію синтезу глутатіону: при дефіциті азоту активність TORC1 знижується, що призводить до дефосфорилювання та активації факторів транскрипції Gln3p і Gat1p, які посилюють експресію генів синтезу глутатіону [42].

HOG-шлях (High Osmolarity Glycerol) – сигнальний каскад, що відповідає на осмотичний стрес. Активація HOG-шляху через осмосенсиори Sln1p-Ypd1p-Ssk1p та кіназу Hog1p призводить до фосфорилювання та активації транскрипційних факторів (Hot1p, Msn2p/Msn4p), що індукують експресію генів синтезу глутатіону та трегалози [43]. Цікаво, що помірний осмотичний стрес стимулює

синтез глутатіону на 30-45%, а надмірний – пригнічує його через загальне пригнічення метаболічної активності клітин.

РКА-шлях (Protein Kinase A) – центральний регулятор, що реагує на доступність глюкози та інших джерел вуглецю. Висока активність РКА при надлишку глюкози призводить до фосфорилування та інактивації Msn2p/Msn4p, що зменшує експресію стрес-захисних генів, включаючи гени синтезу глутатіону [44]. При виснаженні глюкози активність РКА знижується, що призводить до активації Msn2p/Msn4p та індукції генів стресової відповіді.

Окрім прямої регуляції транскрипції, синтез глутатіону контролюється епігенетичними механізмами:

Хроматинове ремоделювання – встановлено, що гістонові деацетилази Rpd3p та Hda1p беруть участь у регуляції експресії генів відповіді на окисний стрес. При окисному стресі відбувається рекрутування гістонових ацетилтрансфераз (зокрема SAGA комплексу) до промоторів генів GSH1 і GSH2, що призводить до ацетилювання гістонів H3 та H4, розпускання хроматину та активації транскрипції [45].

Некодуючі РНК – ідентифіковано довгі некодуючі РНК (lncRNAs), що регулюють експресію генів біосинтезу глутатіону. Наприклад, антисенсова РНК до GSH1 може утворювати дуплекси з мРНК GSH1, впливаючи на її стабільність та трансляцію [46].

Активність ферментів біосинтезу глутатіону регулюється через посттрансляційні модифікації:

Фосфорилування – γ -глутамілцистеїнсинтетаза (Gsh1p) містить сайти фосфорилування для декількох кіназ, включаючи РКА та Snf1p. Фосфорилування впливає на каталітичну активність та стабільність ферменту [47].

Окисно-відновна регуляція – активність Gsh1p регулюється окисненням/відновленням критичних тіолових груп. При окисному стресі формування внутрішньомолекулярних дисульфідних містків може змінювати конформацію та активність ферменту [48].

Алостерична регуляція – активність Gsh1p інгібується кінцевим продуктом (GSH) за принципом негативного зворотного зв'язку. Концентрація GSH, що спричиняє 50% інгібування (IC_{50}), становить приблизно 2,5 мМ [49]. Цей механізм запобігає надмірному накопиченню глутатіону та витратам енергії клітини.

Нещодавні дослідження виявили зв'язок між клітинним циклом, циркадними ритмами та синтезом глутатіону:

Клітинно-циклічна регуляція – синтез глутатіону найактивніший у G1 та S фазах клітинного циклу, коли клітини найбільш вразливі до окисного стресу через реплікацію ДНК. Транскрипційні фактори клітинного циклу, зокрема Swi4p та Swi6p (комплекс SBF), можуть регулювати експресію генів біосинтезу глутатіону [50].

Метаболічні осцилятори – виявлено, що у культурах *S. cerevisiae*, які ростуть синхронно, експресія генів GSH1 і GSH2 осцилює з періодом близько 40 хвилин, що корелює з метаболічними циклами дріжджів [51]. Ці осциляції координуються з редокс-станом клітини та доступністю попередників для синтезу глутатіону.

Розуміння цих складних молекулярно-генетичних механізмів відкриває нові можливості для цілеспрямованої модифікації штамів-продуцентів глутатіону через інженерію транскрипційних факторів, сигнальних шляхів та епігенетичних регуляторів.

1.5. Фактори, що впливають на біосинтез глутатіону дріжджами

Біосинтез глутатіону в дріжджах визначається комбінацією факторів середовища, фізіологічних, стресових та генетичних факторів. Розуміння й оптимізація цих умов має вирішальне значення для промислового підвищення продуктивності дріжджових культур.

1.5.1. Склад поживного середовища

Ключовими поживними компонентами для продукції глутатіону є джерела вуглецю, азоту, сірки та амінокислоти-попередники. Глюкоза вважається найефективнішим джерелом вуглецю для більшості штамів *S. cerevisiae*, але її концентрація повинна бути оптимальною – надлишок може гальмувати синтез [7, 8].

Додавання глутамату, гліцину та особливо цистеїну суттєво підвищує продукцію глутатіону. Використання прекурсорів (метіонін, N-ацетилцистеїн) також демонструє ефект підвищення на 40–60% [6, 8]. Органічні джерела сірки, як-от метіонін, можуть бути ефективнішими за неорганічні сульфати [7].

Мікроелементи (Mg^{2+} , Mn^{2+}) слугують кофакторами ферментів синтезу GSH, і їх додавання в середовище сприяє активнішому накопиченню трипептиду [9].

1.5.2. Умови культивування

Температура, рН, аерація та тип культивування істотно впливають на біосинтез глутатіону. Для *S. cerevisiae* оптимальна температура – 28–30 °С, для *K. marxianus* – 35–37 °С [3, 10]. Ідеальний рН – 5.5–6.5; відхилення знижують активність ферментів [11].

Глутатіон синтезується в аеробних умовах, тому забезпечення рівня кисню (30% від насичення) є критичним. Надлишкова аерація може викликати стрес і зниження GSH [12].

Найвища продуктивність досягається при напівбезперервному культивуванні з дозованим підживленням, що дозволяє уникати дефіциту поживних речовин і накопичення токсичних метаболітів [13].

1.5.3. Фізіологічний стан культури

Максимальне накопичення глутатіону відбувається в пізній експоненційній або ранній стаціонарній фазах росту, коли ріст сповільнюється, але метаболічна активність ще висока [4, 14].

Адаптація до стресу (включаючи легкий окисдаивний або металічний вплив) призводить до активації захисних систем і стимуляції синтезу глутатіону – вихід може зростати на 15–30% [6, 15].

1.5.4. Вплив осмотичного та окисного стресу

Контрольовані дози осмотиків (NaCl, сорбітол) або окисників (H₂O₂, пероксиди) активують транскрипційний фактор Yap1, що підсилює експресію генів GSH1 і GSH2 [5, 16]. Подібний ефект спостерігається при використанні мікродоз Fe²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, які стимулюють антиоксидантну відповідь [17].

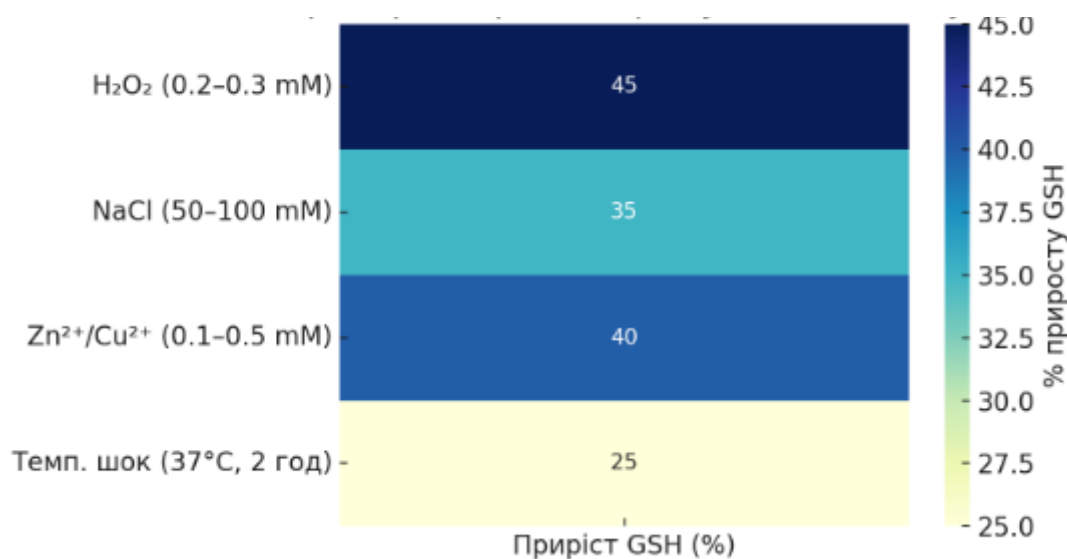


Рис.1.3. Вплив стрес-факторів на синтез GSH

1.5.5. Генетичні фактори

Генетична модифікація – найефективніший інструмент для посилення біосинтезу GSH. Надекспресія GSH1 підвищує вихід на 30–50%, а комбінація GSH1 та GSH2 – до 80% [10, 18]. Інактивація генів дегградації (γ-глутамілтранспептидаза) також сприяє накопиченню [19].

Регуляція промоторів і сигнальних шляхів, що контролюють експресію, – перспективний напрям у створенні гіперпродуцентів [20].

1.6. Взаємозв'язок між ростом дріжджів та синтезом глутатіону

1.6.1. Фази росту, швидкість розмноження та глутатіоногенез

Синтез глутатіону в дріжджів є тісно пов'язаним із фазою росту культури. Найвищий рівень накопичення глутатіону зазвичай спостерігається на межі експоненціальної та стаціонарної фаз, коли клітини переходять від активного ділення до реалізації захисних функцій [11]. У цей період активується експресія генів GSH1 і GSH2, які кодують ферменти біосинтезу глутатіону, що регулюється транскрипційними факторами Yap1, Msn2/4 та Met4 [22].

Швидкість росту також має значення: встановлено, що помірна швидкість росту ($\mu = 0,15\text{--}0,20 \text{ год}^{-1}$) сприяє оптимальному накопиченню GSH. Занадто швидкий ріст спрямовує ресурси клітини на поділ, а не на захисні метаболіти [23].

Крім того, респіраторний тип метаболізму, характерний для деяких штамів *S. cerevisiae* і *C. utilis*, супроводжується інтенсивним утворенням активних форм кисню (АФК), що додатково стимулює глутатіонову систему [3].

1.6.2. Обмеження живлення та метаболічна адаптація

Лімітування доступу до джерел азоту або фосфору, за умови надлишкового вуглецевого живлення, сприяє перерозподілу ресурсів на вторинний метаболізм, включаючи синтез глутатіону. У таких умовах рівень GSH може зростати на 30–45% [11].

Аналогічно, зменшення темпів росту через нестачу макроелементів активує компенсаторні шляхи, серед яких центральну роль відіграє пентозофосфатний шлях. Він постачає NADPH для глутатіонредуктази, яка підтримує глутатіон у відновленій активній формі [8].

Загальна адаптація до стресу також залучає глутатіонову систему: при дії АФК, теплового чи осмотичного навантаження активується сигнальний шлях Yap1, що стимулює синтез захисних білків і антиоксидантів [22].

1.6.3. Технологічні стратегії: від двофазного культивування до генетичної оптимізації

Однією з найефективніших технологічних стратегій є двофазне культивування, при якому перша фаза забезпечує активний ріст, а друга – індукцію глутатіоногенезу через додавання прекурсорів (глутамат, цистеїн, гліцин). Такий підхід дозволяє збільшити концентрацію GSH до 60–80% у порівнянні з однофазною системою [21].

Генетичні маніпуляції, зокрема модифікація сигнальних шляхів TOR, дозволяють регулювати баланс між ростом та продукцією вторинних метаболітів. Мутації у гальмівних ділянках TOR-шляху знижують проліферацію, але водночас активують стресову відповідь і підвищують рівень глутатіону [24].

1.7. Сучасні підходи до підвищення синтезу глутатіону дріжджами

Підвищення продукції глутатіону дріжджами є актуальним напрямом біотехнологічних досліджень, що базується на поєднанні генетичних, хімічних та технологічних підходів.

1.7.1. Метаболічна інженерія та регуляція шляхів

Сучасні підходи метаболічної інженерії дріжджів для підвищення продукції глутатіону охоплюють кілька стратегічних напрямків, що базуються на глибокому розумінні молекулярних механізмів регуляції.

Класичний підхід передбачає надекспресію генів GSH1 і GSH2. Показано, що використання конститутивних сильних промоторів (ADH1, TEF1, PGK1) для експресії цільових генів дозволяє підвищити вміст глутатіону в 2-3 рази [52]. Оптимізація кодонного складу генів для ефективною трансляції також сприяє підвищенню активності ферментів. Важливим аспектом є баланс активності ферментів: дослідження показали, що надмірна експресія GSH1 без пропорційного підвищення експресії GSH2 призводить до накопичення

проміжного метаболіту γ -глутамілцистеїну, що може мати токсичний ефект для клітин [53].

Створення химерних білків, де ферменти синтезу глутатіону об'єднані в єдиний поліпептидний ланцюг через гнучкі лінкери, підвищує ефективність використання субстратів завдяки ефекту каналювання — безпосередній передачі проміжних продуктів між активними центрами [54].

Перспективним напрямком є модифікація транскрипційних факторів, що регулюють експресію генів біосинтезу глутатіону:

Створення конститутивно активних мутантних форм Yap1, що нечутливі до інактивації через експорт з ядра. Заміна цистеїнових залишків C598A та C620A в С-термінальному CRD (Cysteine-Rich Domain) призводить до утримання Yap1 в ядрі та постійної активації цільових генів, зокрема GSH1 і GSH2 [55].

Розробка синтетичних транскрипційних факторів на основі системи CRISPR/dCas9, де дезактивована Cas9 зливається з транскрипційними активаторами (VP64, p65) та спрямовується до промоторів цільових генів за допомогою специфічних sgRNA. Такий підхід дозволяє одночасно активувати кілька генів, залучених до біосинтезу глутатіону та його прекурсорів [56].

Модифікація промоторів через введення додаткових елементів відгуку (YRE, STRE) або видалення сайтів зв'язування репресорів. Мультиплікація YRE-елементів у промоторах GSH1 і GSH2 посилює їхню відповідь на окисний стрес на 60-80% [57].

Оптимізація забезпечення клітин амінокислотами-попередниками є важливим напрямком метаболічної інженерії:

Посилення біосинтезу цистеїну через надекспресію генів сульфатасимілюючого шляху (MET3, MET14, MET16, MET5/10) та транссульфурації (CYS3, CYS4). Особливо ефективною є надекспресія цистатіонін- β -синтази (CBS, CYS4), що сприяє підвищенню пулу цистеїну на 75% [58].

Посилення транспорту та утилізації зовнішніх джерел амінокислот через надекспресію генів транспортерів (загальна пермеаза амінокислот Gap1p, специфічні транспортери Dip5p для глутамату та Mur1p для метіоніну) [59].

Інтеграція метаболічних шляхів асиміляції сульфату та транссульфурації для ефективної конверсії неорганічної сірки в цистеїн через створення біфункціональних ферментів [60].

Інженерія ключових сигнальних шляхів відкриває нові можливості для контролю біосинтезу глутатіону:

Модифікація TORC1-сигналіngu через цілеспрямовані мутації в компонентах комплексу або його регуляторів. Зниження активності TORC1 через делецію гена TCO89 або стабільну експресію домінантно-негативної форми Tor1p (TOR1-1) призводить до дерепресії генів, контрольованих азотною катаболічною репресією, включаючи гени метаболізму амінокислот [61].

Інженерія HOG-шляху для підвищення стійкості до осмотичного стресу та активації синтезу захисних метаболітів. Надекспресія складових HOG-каскаду (Pbs2p, Hog1p) або їх конститутивно активних форм підвищує акумуляцію глутатіону на 30-50% [62].

Модуляція PKA-сигналіngu для оптимізації балансу між ростом та стрес-резистентністю. Зниження активності PKA через делецію генів субодиниць Trk2p або Trk3p активує стресову відповідь без суттєвого пригнічення росту [63].

Сучасні підходи системної метаболічної інженерії ґрунтуються на всебічному аналізі метаболічних та регуляторних мереж:

Використання методів неспрямованого мутагенезу в поєднанні з високопродуктивним скринінгом для ідентифікації нових генетичних детермінант, що впливають на синтез глутатіону. Цей підхід дозволив виявити несподівані мішені для інженерії, наприклад, компоненти вакуолярної H⁺-АТФази, що впливають на внутрішньоклітинний рН та активність ферментів біосинтезу глутатіону [64].

Створення синтетичних метаболічних модулів – функціональних одиниць, що об'єднують гени та регуляторні елементи для оптимізації певного процесу. Наприклад, "глутатиносома" – синтетичний модуль, що включає гени біосинтезу цистеїну, глутатіону та систем регенерації NADPH під контролем індукційних або синтетичних промоторів [65].

Застосування технологій синтетичних схем регуляції, включаючи рибозимні перемикачі, що реагують на метаболіти або екзогенні індуктори, для точного контролю експресії цільових генів [66].

Інтеграція даних омічних технологій (транскриптоміка, протеоміка, метаболоміка) для створення предиктивних математичних моделей, що дозволяють оптимізувати генетичні модифікації для максимального виходу глутатіону [67].

Комбінація цих підходів дозволяє створювати високопродуктивні штами-продуценти глутатіону з виходом до 2,5-3% від сухої біомаси, що суттєво перевищує показники немодифікованих штамів.

Інструментарій CRISPR/Cas9 відкриває нові можливості для точкових мутацій, нокауту інгібіторних генів та активації синтезу глутатіону:

- Видалення генів деградації GSH (ECM38, DUG1) → +40–60% до рівня GSH.
- Надекспресія GSH1, GSH2, CYS4 через вставку біосинтетичних касет у «гарячі точки» геному.
- Використання CRISPRa (активація) на базі dCas9-VP64 для мультигенної індукції метаболічного кластера [56].

Синтетичні промотори та рибозими для контролю експресії:

- Штучні промотори з мультиплікованими елементами STRE/YRE забезпечують 5–10-кратну індукцію експресії GSH1 у відповідь на стрес.
- Розроблені синтетичні регуляторні касети дозволяють тонко налаштовувати рівень експресії в залежності від умов середовища (осмотичний/окисний стрес).

- Рибозимні перемикачі (riboswitches) реагують на метаболіти (напр., цистеїн, SAMe) й регулюють трансляцію шляхом самосплайсингу мРНК [66].

Метаболічна інженерія дозволяє концентрувати внутрішньоклітинні потоки речовин до синтезу глутатіону:

- Надекспресія CYS3/CYS4 → посилений синтез цистеїну з гомоцистеїну;
- Інженерія пентозофосфатного шляху (надекспресія ZWF1, GND1) → збільшення NADPH, необхідного для редукції GSSG;
- Блокування конкурентних шляхів (наприклад, поліамінів через нокаут SPE1) дозволяє зменшити відтік амінокислот-попередників [65].

Системна біологія забезпечує інтеграцію омік-даних для предиктивного моделювання:

- Створення геномномасштабних моделей (GEMs) для *S. cerevisiae* (наприклад, модель Yeast8) дозволяє прогнозувати ефект модифікацій на глобальний метаболізм.
- Flux Balance Analysis (FBA) – використовується для оптимізації потоків до GSH та виявлення вузьких місць (наприклад, дефіцит NADPH або цистеїну).
- Візуалізація результатів у вигляді метаболічних карт дає змогу ідентифікувати синергетичні мішені для генетичної модифікації [67].

1.7.2. Застосування регуляторів та стимуляторів

Хімічна стимуляція синтезу глутатіону передбачає додавання прекурсорів (цистеїн, метіонін, глутамат), антиоксидантів (наприклад, аскорбінової кислоти) та металів (Zn^{2+} , Se), які активують захисні системи [14]. Окремо виділяється роль трегалози як осмозахисника, яка підвищує толерантність клітин і рівень GSH [10].

1.7.3. Технологічні прийоми: контроль стресу і росту

Встановлено, що оптимальні рівні глутатіону досягаються при легкому оксидативному або осмотичному стресі. Наприклад, додавання H_2O_2 у сублетальних концентраціях активує Yap1-залежний механізм індукції синтезу GSH [12].

Також ефективними є температурні шоки та контрольований дефіцит поживних речовин (азоту, фосфору), що спричиняють уповільнення росту й активацію захисних метаболітів [14, 15].

1.7.4. Комбінація поживних факторів

Збільшення синтезу глутатіону можливе за умов комбінованої дії різних джерел вуглецю (глюкоза, гліцерин), оптимального співвідношення амінокислот-попередників та введення пептонів або дріжджового екстракту [6]. Баланс елементів живлення особливо важливий при масштабуванні процесів.

1.7.5. Перспективи біоінформатики та синтетичної біології

Сучасні методи синтетичної біології дозволяють створювати штучні регуляторні касети для точного контролю експресії генів, пов'язаних із біосинтезом глутатіону. Використання біоінформатичних інструментів (Gene Ontology, Pathway Tools) допомагає ідентифікувати нові мішені для інженерії та створювати предиктивні моделі метаболізму [13].

Такі підходи сприяють створенню високопродуктивних штамів, адаптованих до промислових умов, із покращеною стійкістю до окисного стресу та стабільною продукцією глутатіону.

1.7.6. Практичні протоколи та моделі оптимізації синтезу глутатіону

Двофазне культивування

Одним з найбільш ефективних підходів до підвищення синтезу глутатіону є двофазна стратегія культивування, яка включає:

- Фаза I (росту):
 - Середовище: глюкоза 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L;
 - Температура: 30 °C (для *S. cerevisiae*);
 - pH: 6.0;
 - Аерація: 1.0 vvm, 300 rpm;
 - Тривалість: до досягнення OD₆₀₀ ≈ 10 (пізня експоненціальна фаза).
- Фаза II (індукції синтезу GSH):
 - Додавання прекурсорів: L-глутамат — 2 g/L, L-цистеїн — 1.5 g/L, гліцин — 1.0 g/L;
 - Аерація знижена до 0.5 vvm;
 - Підвищення осмотичного тиску (NaCl 50–100 mM) або додавання 0.2 mM H₂O₂ для стимуляції окисного стресу;
 - Тривалість: 12–24 год.

Така стратегія дозволяє підвищити вихід глутатіону на 60–80% порівняно з однофазним культивуванням [21, 28].

Таблиця 1.2.

Оптимальні концентрації попередників

Попередник	Оптимальна концентрація (g/L)	Збільшення продукції GSH (%)
L-глутамат	1.5–2.5	+20–30
L-цистеїн	1.0–1.5	+40–60
Гліцин	0.8–1.0	+15–25
НАС (N-ацетилцистеїн)	0.5–1.0	+30–45

Найбільш ефективною є комбінація L-цистеїну з глутаматом. Також показано, що надлишок попередників понад 3 g/L викликає інгібування росту [6, 18].

Математичні моделі взаємозв'язку росту і GSH

Згідно з моделлю Takagi et al. [23], продукція глутатіону (P) залежить від питомої швидкості росту (μ) за параболічним законом:

$$P = a\mu - b\mu^2$$

де:

- $a = 9.6$,
- $b = 22.8$,
- μ — питома швидкість росту, год⁻¹.

Максимальне накопичення GSH досягається при $\mu \approx 0.20$ год⁻¹, при цьому продуктивність становить до 2.3% від сухої біомаси (*S. cerevisiae* GSH1 \uparrow GSH2 \uparrow).

Таблиця 1.3.

Вплив факторів стресу на синтез GSH

Стрес-фактор	Концентрація(mM)	Збільшення GSH (%)	Примітки
H ₂ O ₂	0.2–0.3	+30–45	Активує Yap1-залежну відповідь
NaCl	50–100	+20–35	Осмотичний стрес
Метали (Zn ²⁺ , Cu ²⁺)	0.1–0.5	+25–40	Активація антиоксидантних ферментів
Температурний шок	37 °C протягом 1–2 год	+15–25	Підвищення експресії GSH1, HSP

Надмірний стрес (наприклад, H₂O₂ > 0.5 mM) викликає інгібування росту й апоптоз [6, 16].

1.8. Обґрунтування доцільності проведення дослідження

1.8.1. Науково-практичне значення вивчення взаємозв'язку між ростом дріжджів та синтезом глутатіону

Глутатіон є ключовим антиоксидантом клітин дріжджів, який регулює їх життєздатність, стійкість до стресів та здатність до промислового культивування [1, 4]. Його значення зростає у зв'язку з потребами фармацевтичної, харчової та косметичної галузей, де він використовується як антиоксидант, захисний засіб та регулятор окисного гомеостазу [7].

Однак ефективність промислового виробництва глутатіону значною мірою залежить від здатності дріжджів синтезувати його у відповідь на умови культивування. Дані Nguyen та співавт. [25] демонструють варіативність кореляції між швидкістю росту та біосинтезом глутатіону у різних штамів, що унеможлиблює застосування універсального підходу. Це вимагає більш детального аналізу зв'язку між фазами росту, активністю ключових метаболічних шляхів та синтезом глутатіону [26].

Сучасні підходи метаболоміки та метаболічного моделювання дозволяють виявити вузькі місця та адаптивні реакції клітин. Вони дають змогу передбачати, як зміна умов середовища (джерела вуглецю, обмеження азоту, стреси) впливає на продукцію глутатіону [30, 33].

1.8.2. Перспективи оптимізації технологічних процесів

Технологічне значення має пошук ефективного балансу між ростом клітин і продукцією глутатіону. Контрольований режим живлення, наприклад, регульоване дозування глюкози чи джерел азоту, забезпечує підвищення продукції GSH на 40–55% [27, 28]. Ефективною є стратегія багатостадійного культивування, яка дозволяє розділити фази росту та індукції синтезу.

При цьому критично важливим є врахування фазової специфіки: глутатіон синтезується інтенсивніше у фазах уповільненого росту або початку стаціонарної фази, коли активуються антиоксидантні системи [6, 14].

1.8.3. Генетична та системна інженерія як інструмент підвищення продуктивності

Молекулярно-генетичні підходи дають змогу спрямовано регулювати біосинтез глутатіону. Модифікація шляхів, що контролюють розподіл ресурсів між ростом і вторинним метаболізмом (зокрема TORC1, АМПК), дозволяє збільшити вихід глутатіону без значного зниження швидкості росту [29, 30].

Експериментальні дослідження [29, 33] показали ефективність поєднання метаболічної інженерії з комп'ютерним моделюванням для створення штамів з підвищеним рівнем GSH. Проте така оптимізація потребує врахування конкретних умов культивування та середовища.

1.8.4. Прикладне та економічне обґрунтування

Глобальний ринок глутатіону демонструє стабільне зростання, що створює попит на нові біотехнологічні рішення [31]. Скорочення виробничих витрат та підвищення продуктивності можливе шляхом адаптації технологій до штамоспецифічних реакцій росту і стресу [32].

Оптимізація середовищ, контроль живлення, температурного режиму та аерації дозволяє знизити витрати до 25%, що робить дослідження взаємозв'язку між ростом і глутатіоногенезом надзвичайно перспективним з практичного боку [28].

Глобальний ринок глутатіону у 2022 році оцінювався приблизно у 850 млн доларів США, з прогнозом зростання до 1.35 млрд доларів до 2028 року (CAGR \approx 7.9%) [31]. Основні сектори застосування:

- фармацевтика – понад 45% від обсягу споживання;
- харчові добавки та функціональні продукти – 30%;
- косметика та дерматологія – 15%;
- ветеринарія й інші галузі – 10%.

Ключові виробники глутатіону у світі:

- Kyowa Hakko Bio Co., Ltd. (Японія) – лідер у ферментативному та мікробіологічному синтезі;
- Shandong Jincheng (Китай);
- KOHJIN Life Sciences;
- Evonik Industries – займаються розробкою біотехнологічних платформ.

Азійсько-Тихоокеанський регіон займає понад 50% ринку, з інтенсивним розвитком біофармацевтичної промисловості та БАДів у Китаї, Японії та Кореї.

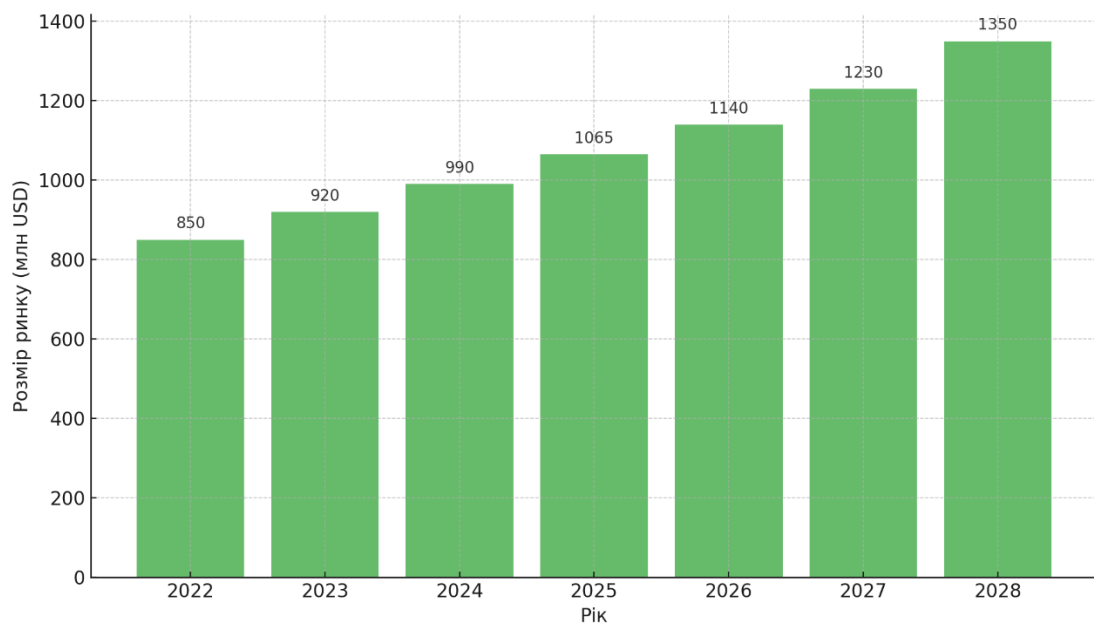


Рис. 1.4. Динаміка світового ринку глутатіону (2022-2028) [32]

Порівняння методів синтезу: мікробіологічного та хімічного

Метод отримання	Основні характеристики	Собівартість (USD/кг)	Екологічність	Якість продукту
Хімічний синтез	5–7 стадій, застосування токсичних реагентів, необхідність рацемізації	\$850–1100	Низька	Рацемічна суміш
Мікробіологічний	Ферментативний або ферментативно-рекомбінантний шлях у дріжджах або <i>E. coli</i>	\$500–650	Висока	L-форма (біоактивна)

У зв'язку з жорсткішими вимогами до екологічності та безпеки (особливо в ЄС), попит на мікробіологічний глутатіон стабільно зростає.

Стратегії оптимізації виробництва глутатіону

Метод оптимізації	Ефект на вихід GSH (%)	Зниження собівартості (%)	Примітка
Надекспресія GSH1 + GSH2	+60–80	–15–25	Витрати на генетичну інженерію окупаються за 2–3 цикли
Двофазне культивування	+50–60	–20	Зниження витрат на середовище
Комбінація амінокислот-попередників	+30–50	–10–15	Не потребує складної модифікації
Контрольований осмотичний стрес	+25–40	–10	Мінімальні капіталовкладення

У випадку масштабного виробництва (1000 L ферментер), оптимізація технології може зменшити собівартість на \$100–200/кг, що при середній ринковій ціні дає 20–30% прибутковості з одиниці продукції.

1.8.5. Необхідність комплексного підходу

Аналіз сучасної літератури свідчить про фрагментарність підходів до вивчення взаємозв'язку між ростом дріжджів і синтезом глутатіону. Зазвичай дослідження фокусуються лише на окремих аспектах – генетичних, фізіологічних або технологічних.

Системний підхід, що інтегрує дані з генетики, біохімії, процесної інженерії та моделювання, дозволить розробити ефективні стратегії створення високопродуктивних штамів та умов для їхнього культивування. Саме таке міждисциплінарне дослідження й становить предмет цієї роботи.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Дріжджові штами та загальний план експерименту

У ході дослідження було використано 5 промислових штамів дріжджів роду *Saccharomyces*: Штам 1, Штам 2, Штам 3, Штам 4, Штам 5 (зразок з ринку), штами 1-4, які отримані в інноваційному центрі з досліджень та розробок ПрАТ «Компанія Ензим». Вибір штамів ґрунтувався на їхньому потенціалі до накопичення біомаси та синтезу глутатіону в лабораторних умовах.

Дослідження проводилось у чотири основні етапи (серії експериментів):

- Серія 1: Вибір штаму з переліку наявних штамів у лабораторії в порівнянні з конкурентним зразком з ринку.
- Серія 2: Порівняння впливу тривалості культивування (21 та 48 годин) на інтенсивність росту та синтез глутатіону для кожного з двох штамів обраних після першої серії.
- Серія 3: Вивчення впливу температурного режиму (30 °C та 33 °C) та модифікацій складу поживного середовища (додавання NaCl, FeSO₄, CaCl₂) на рівень синтезу глутатіону обраним штамом, який показав вищі показники росту та продуктивності у першій серії.
- Серія 4: Дослідження впливу додавання різних комбінацій попередників біосинтезу глутатіону у середовище на обраному штамі.

Для кожної серії дослідів було закладено достатню кількість біологічних повторів (деталізація у п. 2.5), що забезпечувало репрезентативність та достовірність отриманих даних.

Обладнання, яке використовувалось під час дослідів: дозатори (Sartorius Biohit), аналітичні ваги (Sartorius segura224-1s), пробірки, колби, фалькони, мірні циліндри, рН метр (Mettler Toledo S23030019034 Desktop Conductivity Meter), шейкери (Orbital Shaker-Incubator ES-20, New Brunswick Innova 44 Inc Shaker), ламінарний бокс (Streamline class II biological safety cabinet – E series), спектрофотометр (Thermo Fisher Scientific), рідинний хроматограф (Shimadzu

LC-20), вологомір (МА R “Radwag”), рефрактометри, автоклав, центрифуга (SIGMA 6-16S).

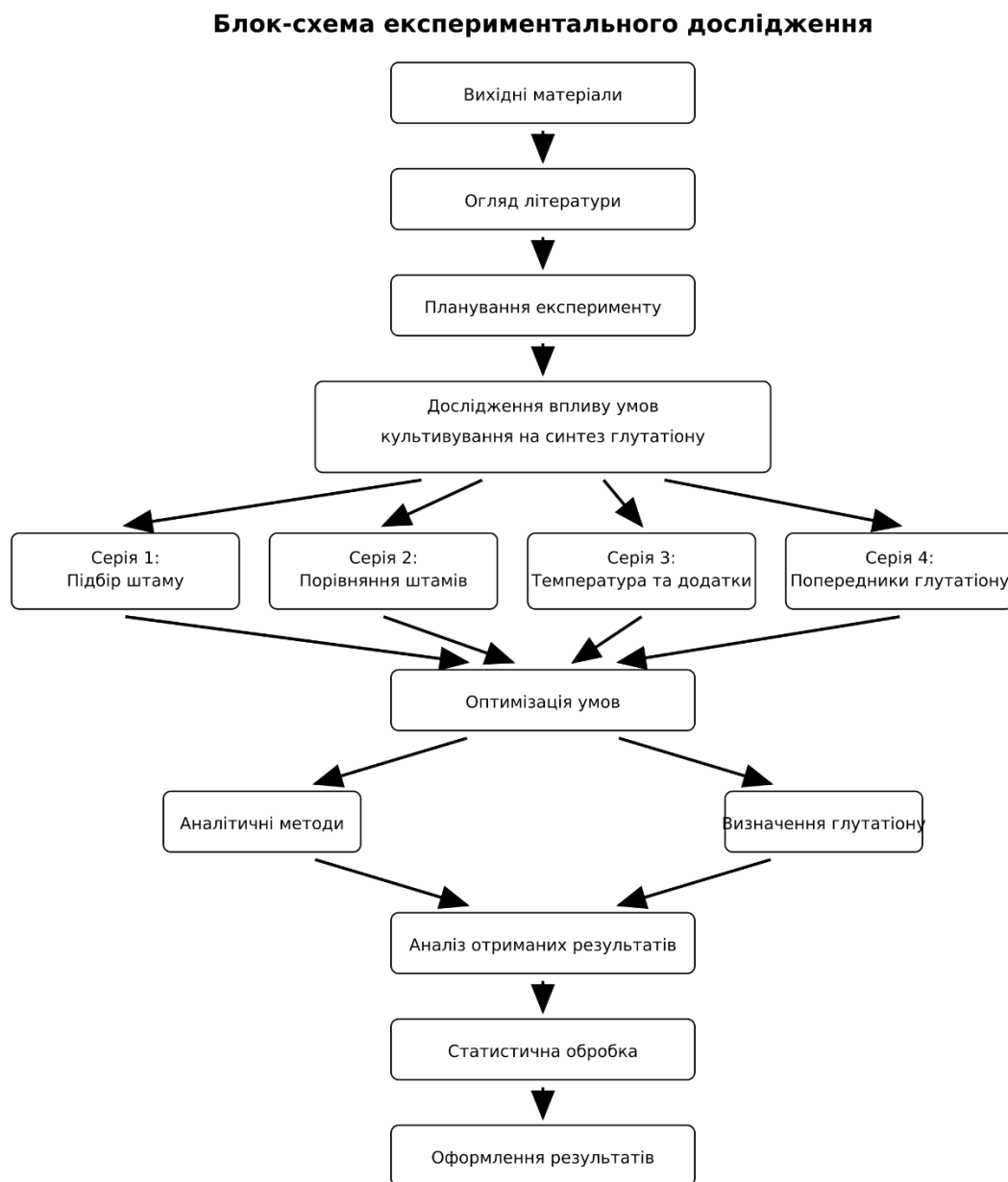


Рис. 2.1. Загальна схема експерименту

2.2. Склад поживного середовища та експериментальні варіації

Усі експериментальні дослідження проводились із використанням базового середовища, що є стандартом для лабораторії, де здійснювались культивування дріжджів. В основі рецептури – 5% вуглеводне джерело (меляса)

з додаванням аміачної води, фосфатної кислоти, а також мікроелементів: магній ($MgSO_4$), цинк ($ZnSO_4$), купрум ($CuSO_4$). Загальне значення рН регулювали до 5.5 із використанням нітратної кислоти. Стерилізацію поживних середовищ проводили у автоклаві при температурі 121 °С, тиску 1 бар протягом 30 хв.

Для однієї дослідної колби об'ємом 200 мл компоненти додавались у таких об'ємах:

- вода – 168 мл;
- меляса – 29.41 мл;
- аміачна вода – 1.16 мл;
- фосфатна кислота – 0.275 мл;
- $MgSO_4$ – 145 мкл (конц. 29 г/100 мл);
- $ZnSO_4$ – 36 мкл (конц. 9.2 г/100 мл);
- $CuSO_4$ – 7 мкл (конц. 1.6 г/100 мл);
- Суміш вітамінів – 29 мкл.

У рамках третьої серії експериментів, середовище модифікувалось шляхом додавання однієї з наступних солей:

- $NaCl$ – для імітації осмотичного стресу,
- $FeSO_4$ – для дослідження впливу іонів заліза,
- $CaCl_2$ – як джерело кальцію.

Кожна сіль додавалась окремо – $FeSO_4$ додавався на початку культивування в колбі, тоді як $CaCl_2$ та $NaCl$ (для уникнення токсичного впливу на ранніх етапах) додавались за 3 години до кінця культивації, при цьому загальний склад середовища залишався ідентичним до контрольного. Така варіативність дозволяла оцінити вплив кожного мікроелементу на продуктивність дріжджів та синтез глутатіону.

2.3. Умови культивування

Культивування дріжджів проводилось у два етапи: початкова інокуляція з чашок Петрі у пробірки, а потім масштабування у колби з подальшим відстеженням ростових параметрів.

На першому етапі колонії штамів інокулювали у пробірки, що містили 3 мл стандартного поживного середовища. Пробірки інкубували у шейкері при 30 °С протягом 24 годин при 200 об/хв. Після завершення інкубації вимірювали оптичну щільність суспензії (OD600) та використовували ці дані для нормалізації посівного матеріалу.

На другому етапі культури з OD = 1 переносили у колби об'ємом 500 мл, які містили 200 мл поживного середовища. Культивування проводили в умовах безперервного аераційного перемішування у лабораторних шейкерах при 200 об/хв. Залежно від серії експерименту, варіювали такі параметри:

- Тривалість культивування:
 - *Серія 2*: 21 та 48 годин.
 - *Серії 1,3,4*: 21 година фіксовано для всіх умов.
- Температура культивування:
 - *Серія 1,2,4*: постійно 30 °С.
 - *Серія 3*: порівняння температур 30 °С та 33 °С.

В процесі культивування здійснювався забір проб у контрольні часові точки для визначення OD600 (10, 21, 28, 34, 48 година для другої серії та 10, 18 та 21 година для третьої), рН, вмісту глутатіону (спектрофотометрично), а також вмісту цукру (рефрактометрично), спирту (HPLC), формольного числа (титруванням) та нарощеної абсолютно сухої біомаси (АСБ).

2.4. Аналітичні методи

Для комплексної оцінки фізіолого-біохімічного стану дріжджових культур протягом культивування були застосовані наступні методи аналізу:

2.4.1. Визначення оптичної щільності (OD600)

Визначення щільності дріжджової суспензії проводили за допомогою спектрофотометричного методу. OD вимірювали на довжині хвилі 600 нм у кюветах з оптичною довжиною шляху 1 см. Зразки відбирались в стерильних

умовах по 50 мкл з подальшим додаванням 950 мкл дистильованої води (загальне розведення становило 1:20). Отримані значення за допомогою спектрофотометра використовували як індикатор росту біомаси у часі.

2.4.2. Визначення рН середовища

Зміни кислотності фіксували по завершенню культивування для кожної з серій дослідів шляхом прямого вимірювання рН в культуральному середовищі за допомогою каліброваного рН-метру. Це дозволяло моніторити потенційні зсуви у метаболічній активності дріжджів.

2.4.3. Визначення вмісту цукру та спирту

Цукор і спирт визначали рефрактометричним методом. Зразки були відібрані з супернатанту під час сепарації культуральної рідини, після чого наносили на поверхню призми рефрактометра. Метод має обмежену точність, однак дозволяє здійснювати порівняльний аналіз між зразками.

2.4.4. Визначення вмісту етилового спирту методом ВЕРХ (HPLC)

Для більш точної оцінки концентрації етилового спирту, що утворюється в результаті дріжджової ферментації, додатково проводили кількісне визначення етанолу методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Перед проведенням аналізу зразки попередньо фільтрували через мембранні фільтри діаметром 0.22 мкм, після чого вводили у систему ВЕРХ. Хроматографічний аналіз проводили на рідинному хроматографі Shimadzu LC-20 з використанням рефрактометричного детектора (RID).

Хроматографічні умови:

- Колонка: Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex), 300 × 7.8 мм
- Температура колонки: 60 °С
- Мобільна фаза: деіонізована вода
- Швидкість потоку: 0.6 мл/хв

- Об'єм ін'єкції: 10 мкл
- Час аналізу: ~15 хв на зразок

Калібрувальна крива будувалась на основі стандартних розчинів етанолу у діапазоні концентрацій 0.5–5% (v/v). Кількісний вміст спирту в зразках розраховували за площею піків із використанням відповідного коефіцієнта калібрування. Концентрація виражалась у відсотках об'ємної частки (v/v).

Використання ВЕРХ дозволило уточнити результати рефрактометричних вимірювань та виявити можливі варіації концентрації спирту в залежності від штаму, температури культивування та складу середовища.

2.4.5. Визначення формольного числа

Формольне число (показник азотовмісних сполук) визначали титриметричним методом для якого використовувалась культуральна рідина об'ємом 10 мл, яка в подальшому розводилась до 100 мл за допомогою дистильованої води. Показник використовували для додаткової оцінки метаболічної активності дріжджів у різних умовах культивування (як показник не засвоєної аміачної води).

2.4.6. Визначення абсолютно сухої біомаси (АСБ)

АСБ обчислювали на основі визначення вологості дріжджового осаду після сепарації за допомогою вологоміра, що дозволяло порівнювати рівень накопиченої біомаси між умовами.

2.4.7. Визначення глутатіону (GSH) за методом DTNB

Вміст глутатіону визначали спектрофотометрично з використанням реагенту Еллмана (DTNB).

Екстракція проводилась наступним чином:

- 2 г клітинної біомаси зважували у фалькони по 15 мл, додавали 8 мл 0.1 М HCl.

- Суспензію інкубували у водяній бані при 100 °C протягом 60 хв.
- Після охолодження проби центрифугували при 8000 об/хв протягом 3 хв.

Для реакції використовували 100 мкл екстракту, до якого додавали 4.9 мл реактиву DTNB (суміш 800 мкл DTNB та буферу TE8, доведеного до 100 мл). Після інкубації 10 хв проводили вимірювання при довжині хвилі 412 нм, з використанням контрольного зразка (HCl).

Побудова калібрувальної кривої за стандартними розчинами глутатіону дозволяла розрахувати концентрацію GSH у зразках у відсотковому співвідношенні до АСБ, з урахуванням вологості, визначеної попередньо вологоміром.

2.5. Статистична обробка результатів

Для забезпечення достовірності отриманих даних та оцінки варіабельності показників усі експерименти виконувалися з біологічними повтореннями. У всіх серіях на кожну комбінацію припадало по три колби.

Після завершення експериментів проводилась математична обробка даних:

- Розраховували середні значення (M) та стандартне відхилення (SD).
- Побудова графіків середніх значень із похибками (стовпчикові або точкові діаграми) здійснювалась для всіх ключових параметрів: OD600, рН, глутатіон, АСБ, формольне число, вміст цукру та спирту.
- Обробка здійснювалась у Microsoft Excel із використанням вбудованих статистичних функцій та графічних засобів.

Результати вважались статистично значущими при $p \leq 0.05$, якщо не зазначено інше.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Підбір штаму з найкращими показниками синтезу глутатіону та росту.

На першому етапі дослідження було проведено скринінг п'яти штамів дріжджів з метою визначення їх здатності до росту та синтезу глутатіону в стандартному середовищі культивування. Оцінка проводилася за двома показниками: оптична щільність при 600 нм (OD600) після 21 години культивування, що відображає загальну біомасу, та вміст глутатіону у відсотках від сухої біомаси.

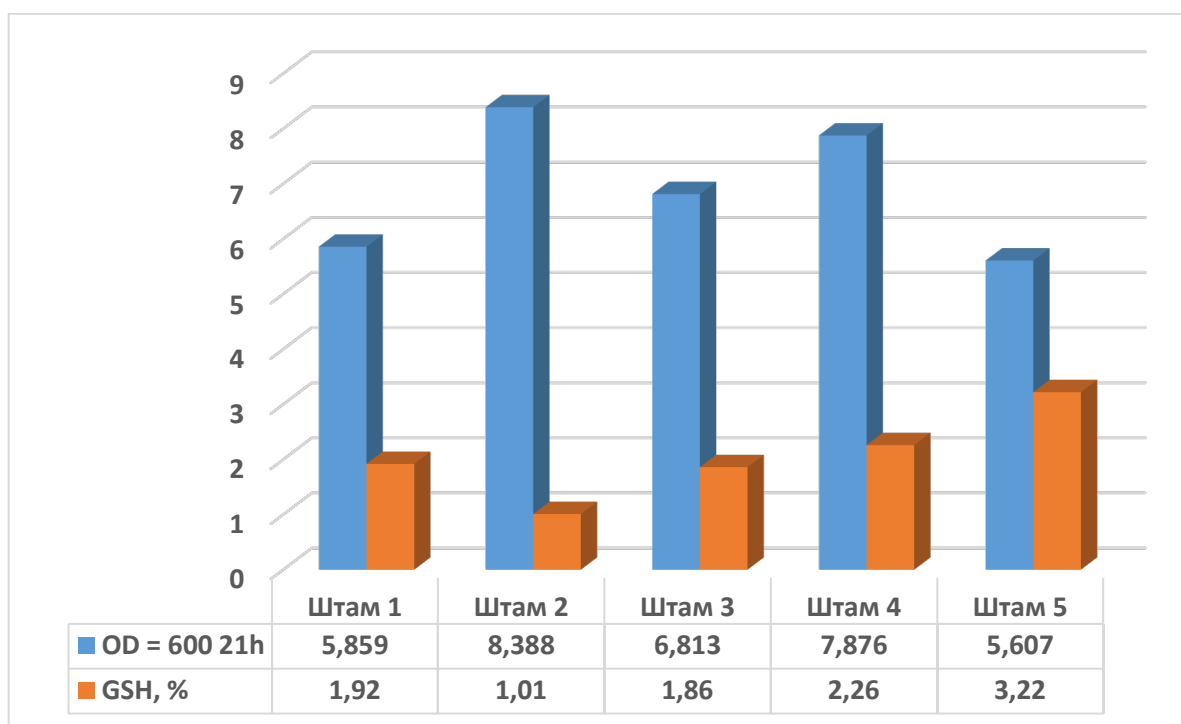


Рис. 3.1. Оптична густина (OD 600 нм) та вміст GSH (%) різних штамів на стандартному середовищі при 30°C

Аналіз отриманих даних свідчить, що найвищу концентрацію глутатіону (3,22%) має зразок з ринку Штам 5, у той час як найвищу біомасу – у Штаму 2 (OD600 = 8,388). Водночас Штам 1, який продемонстрував помірні значення обох показників (OD600 = 5,859; GSH = 1,92%), був обраний як основний об'єкт для подальших досліджень. Основною причиною такого вибору є те, що Штам 1 є внутрішнім наробітком лабораторії, в якій проводилося дослідження, та наразі

використовується як базовий продуцент глутатіону. Його генетична стабільність, передбачуваність біосинтетичних властивостей та наявність історії культивування роблять його зручним для масштабованих біотехнологічних застосувань.

Штам 2, незважаючи на невисоку здатність до синтезу глутатіону (1,01%), демонструє значну біомасу при культивуванні. Цей штам належить до роду *Saccharomyces*, представники якого добре охарактеризовані у науковій літературі, мають передбачувану фізіологію та широко використовуються в біотехнології. З огляду на це, Штам 2 був залучений до частини подальших досліджень як порівняльна контрольна культура.

Штам 3, попри схожі до Штаму 1 характеристики, є його попередником і має нижчі показники синтезу глутатіону (1,86%). Через це його подальше використання в експериментальній частині було визнано недоцільним.

Штам 4 показав досить високий рівень синтезу глутатіону (2,26%) при значній біомасі ($OD_{600} = 7,876$). Проте цей штам при масштабуванні показав гірші ростові характеристики у порівнянні зі штамом 1.

Штам 5, який мав найвищий рівень глутатіону (3,22%), є штамом з ринку з яким не можна продовжувати роботу і масштабування. З цієї причини він також не розглядався як кандидат для подальшого використання.

Таким чином, для подальших серій експериментів були обрані Штам 1 як основний об'єкт дослідження та Штам 2 як контрольний штам з високим потенціалом до накопичення біомаси, що дозволяє здійснювати порівняльний аналіз у різних умовах культивування.

3.2. Динаміка росту дріжджів на різних середовищах

Оцінка інтенсивності росту дріжджових клітин здійснювалась за допомогою визначення оптичної щільності (OD_{600}) на різних часових точках культивування. У рамках другої серії експерименту проводилось паралельне вирощування двох штамів: Штам 1 та Штам 2 на стандартному середовищі з тривалістю культивування 21 та 48 год.

Результати показали, що Штам 2 мав вищу оптичну щільність упродовж усього періоду культивування, що свідчить про його кращу здатність до накопичення біомаси. Зокрема, на 48-й годині OD600 для Штаму 2 становив у середньому 9,25, тоді як для Штаму 1 – 7,16.

Також спостерігалось, що динаміка росту обох штамів мала типовий S-подібний характер:

- Фаза експоненційного росту – 10–21 година,
- Фаза уповільнення – 34 година,
- Фаза виходу на стаціонарну – 48 година.

На часовій точці 21 година, яка була обраною для першого визначення глутатіону, OD600 становив:

- Штам 2 – 6,93,
- Штам 1 – 5,142.

Вищий OD600 Штаму 2 на всіх часових точках вказує на вищу швидкість росту та метаболічну активність, що визначає його як перспективний для накопичення біомаси. Штам 1, який має гірші ростові характеристики спрямований на кращій синтез глутатіону, результати на. За рахунок спрямування метаболізму на синтез глутатіону дріжджі частково втрачають свою швидкість росту.

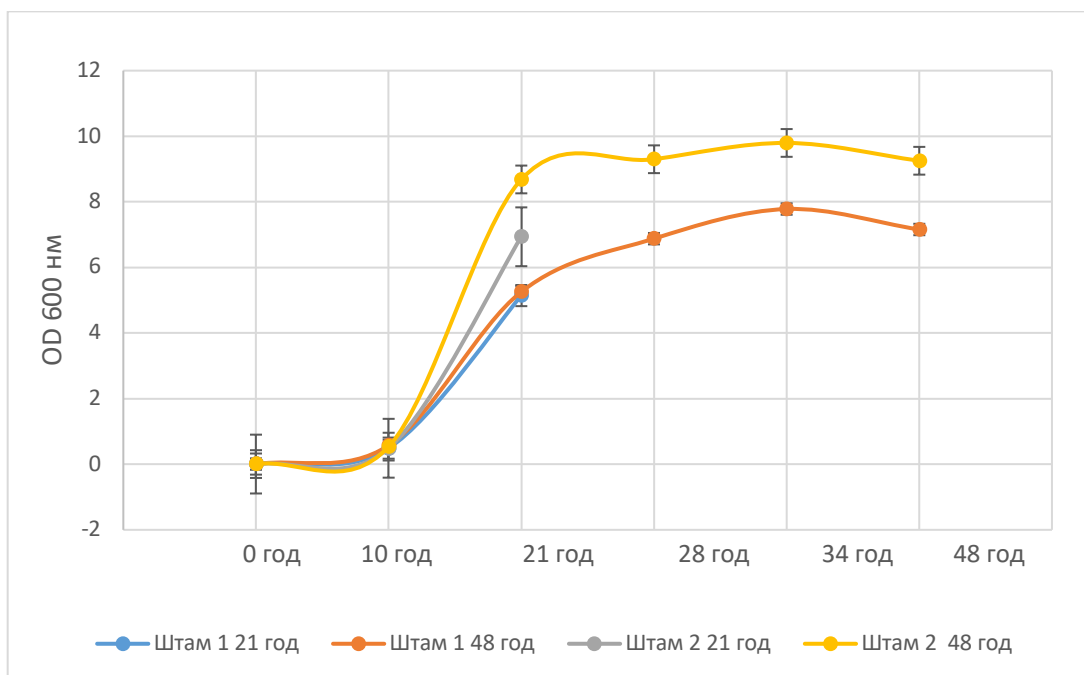


Рис. 3.2. Динаміка росту обраних штамів

3.3. Зміни супровідних фізико-хімічних показників (рН, АСБ, формольне число)

У процесі культивування дріжджів разом із визначенням оптичної щільності проводився аналіз ряду фізико-хімічних параметрів, які дозволяють оцінити загальний метаболічний стан клітин: рН середовища, абсолютно суха біомаса (АСБ) та формольне число.

Зміни рН середовища

Аналіз кінцевих значень рН показав, що у процесі росту дріжджів середовище підкислювалось у обох штамів, що є типовим результатом обміну речовин та продукування органічних кислот (початкове рН 5.5).

- Для Штаму 1 рН на 48 год становив 4.68,
- Для Штаму 2 – 4.77.

Хоча різниця між показниками є незначною, вона підтверджує стабільну тенденцію до зниження рН при зростанні біомаси, що корелює з фазою активного метаболізму.

Абсолютно суха біомаса (АСБ)

АСБ була розрахована на основі вологості дріжджового концентрату після завершення культивування:

- Штам 1: 0.868 г / 200 мл,
- Штам 2: 1.029 г / 200 мл.

Отже, Штам 2 накопичував більше сухої біомаси, що підтверджує його вищу продуктивність порівняно з Штамом 1, і відповідає вищому OD₆₀₀, визначеному у попередньому підрозділі.

Формольне число

Формольне число використовувалось як додатковий індикатор вмісту азотовмісних речовин (аміногруп), що може свідчити про незасвоєний азот у середовищі (початкове формольне 6,5-7).

- Штам 1: 4.1 умовних одиниць,
- Штам 2: 3.9 умовних одиниць.

Хоча відмінність незначна, показник дещо вищий у Штаму 2, що також пояснюється загальною вищою метаболічною активністю цього штаму (більше біомаси тому більше засвоєно азоту).

Таблиця 3.1.

Значення супровідних фізико-хімічних показників

	Формольне	АСБ, г	pH
Штам 1 21h	5,3	0,750	4,67
Штам 1 48h	4,1	0,868	4,68
Штам 2 21h	4,6	0,980	4,63
Штам 2 48h	3,9	1,029	4,77

3.4. Оцінка метаболічної активності (вміст цукру та спирту)

Метаболічну активність дріжджових клітин оцінювали за рівнем споживання вуглеводів (залишковий цукор) і утворення основного метаболіту – етилового спирту. Для цього проводили вимірювання вмісту цукру рефрактометричним методом та кількісне визначення етанолу методом ВЕРХ.

Вміст залишкового цукру

Вміст цукру в культуральному середовищі після 48 год культивування склав:

- Штам 1: 6%,
- Штам 2: 6%.

Уточнення концентрації спирту методом ВЕРХ

З метою підтвердження отриманих результатів застосовано високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ), яка дозволила уточнити об'ємний вміст етанолу:

- Штам 1: 2.43% (%/l),
- Штам 2: 2.46% (%/l).

Вміст цукру та спирту в культуральній рідині

	Цукор (%, рефрактометр)	Спирт (%/л, HPLC)
Штам 1 21h	6	2,37
Штам 1 48h	6	2,43
Штам 2 21h	6	2,62
Штам 2 48h	6	2,46

3.5. Порівняння синтезу глутатіону у двох штамів і обґрунтування вибору для подальших дослідів

Ключовим критерієм оцінки біотехнологічного потенціалу дріжджових штамів у даному дослідженні був рівень синтезованого глутатіону. Вміст відновленої форми GSH визначали на 21-й та 48-й годинах культивування за допомогою методу DTNB, а результати виражали у відсотках від АСБ.

21 година культивування

- Штам 1: 1.85%,
- Штам 2: 1.17%.

48 година культивування

- Штам 1: 1.89%,
- Штам 2: 1.10%.

Таким чином, Штам 1 стабільно демонстрував вищі показники вмісту глутатіону на обох часових точках. Це свідчить про його вищу редокс-активність та потенціал до синтезу антиоксидантних сполук, незважаючи на нижчу інтенсивність росту та метаболічну активність порівняно з Штамом 2.

Показники OD600, АСБ та спиртопродукції вказували на кращу загальну біомасоутворювальну здатність Штаму 2, однак з огляду на профіль цільового метаболіту – глутатіону, саме Штам 1 був обраний для подальшого дослідження в 3 та 4 серія експериментів.

Аналіз рівнів глутатіону на різних часових точках показав, що продовження культивування після 21 години не призводило до підвищення концентрації глутатіону в обох штамів. Навпаки, в окремих випадках спостерігалось незначне зниження його вмісту. Така динаміка, ймовірно, пов'язана з переходом культур у постекспоненційну або стаціонарну фазу росту, під час якої метаболічна активність клітин знижується, а ресурси спрямовуються на підтримку життєздатності, а не на біосинтез відновлених тіолів.

Це підтверджує, що максимальний рівень синтезу глутатіону досягається у фазі активного росту (приблизно до 21-ї години), і подальше культивування не є доцільним з точки зору підвищення виходу цільового продукту. Відтак, саме цю часову точку було обрано як оптимальний момент для зняття зразків у подальших експериментах.

Це рішення ґрунтувалось на пріоритеті якісного синтезу цільової сполуки, а не лише швидкості росту, що відповідає практичним задачам біотехнологічного виробництва глутатіону.

3.6. Вплив температури культивування на синтез глутатіону

На основі результатів другої серії експерименту, для подальших досліджень було обрано Штам 1, який показав вищу здатність до синтезу глутатіону порівняно з контрольним штамом. Наступним етапом було дослідити, як температурний режим культивування впливає на основні фізіолого-біохімічні характеристики дріжджів, зокрема на біосинтез глутатіону.

Параметри експерименту

Штам культивували при двох температурах:

- 30 °C (контрольні умови)
- 33 °C (підвищений температурний режим)

Усі досліді тривали 21 годину, що відповідало фазі максимальної продукції глутатіону за попередніми результатами.

Результати

Згідно з отриманими даними, температура культивування мала позитивний та відтворюваний вплив на рівень синтезу глутатіону.

- За температури 30 °C вміст глутатіону становив у середньому 1.72%,
- За 33 °C – 2.04%.

Підвищення температури призвело до зростання продукції глутатіону на $\approx 18.1\%$, що свідчить про активацію відповідних ферментних систем або посилення окисного стресу, що стимулює накопичення антиоксидантних сполук, таких як GSH.

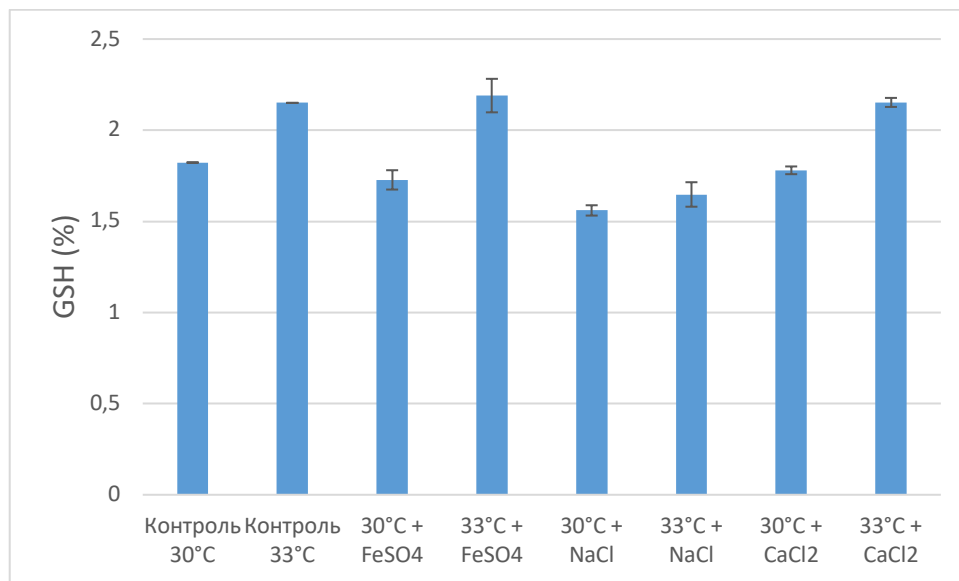


Рис. 3.3. Рівень GSH Штаму 1 при вирощуванні його при різних температурах та з додаванням різних солей.

3.7. Вплив мікроелементів (NaCl, FeSO₄, CaCl₂) на синтез глутатіону

Оскільки основною метою роботи було виявити умови, що оптимізують біосинтез глутатіону дріжджовими клітинами, було оцінено вплив додавання мікроелементів до середовища: хлориду натрію (NaCl), сульфату заліза (FeSO₄) і хлориду кальцію (CaCl₂).

Кожен з компонентів додавався окремо:

- FeSO₄ (1мг/л) – на початку культивування,
- NaCl (1% від загального об'єму середовища) і CaCl₂ (кінцева концентрація в середовищі – 0,5 мМ) – за 3 години до завершення

процесу (тобто після 18-ї години), що дозволяло знизити потенційний токсичний вплив на ранніх стадіях росту.

Результати синтезу глутатіону (21 години, 30 °C):

- Контроль (стандартне середовище): 1.82%
- +NaCl: 1.56%
- +CaCl₂: 1.78%
- +FeSO₄: 1.73%

Результати синтезу глутатіону (21 години, 33 °C):

- Контроль (стандартне середовище): 2.15%
- +NaCl: 1.65%
- +CaCl₂: 2.15%
- +FeSO₄: 2.19%

Таблиця 3.3.

Вміст глутатіону при культивуванні з додаванням солей при різних температурах

Умови культивування	Вміст глутатіону (%)
Контроль 30°C	1,82
Контроль 33°C	2,15
30°C + FeSO ₄	1,73
33°C + FeSO ₄	2,19
30°C + NaCl	1,56
33°C + NaCl	1,65
30°C + CaCl ₂	1,78
33°C + CaCl ₂	2,15

Аналіз впливу

Результати показали, що ефективність впливу кожного з мікроелементів на синтез глутатіону залежала від температури культивування.

За температури 30 °C:

- Додавання NaCl спричинило помітне зниження вмісту глутатіону (до 1.56%) порівняно з контролем (1.82%), що свідчить про негативний вплив осмотичного стресу на редокс-метаболізм дріжджів.
- CaCl₂ виявився нейтральним або слабкопозитивним модифікатором, оскільки концентрація GSH залишалась на рівні, близькому до контролю (1.78%).
- Додавання FeSO₄ показало невелике зниження продукції глутатіону (1.73%), проте значно менш виражене, ніж у випадку з NaCl.

За температури 33 °C:

- Загальний рівень синтезу глутатіону зростав, що відповідає результатам попереднього підрозділу.
- NaCl знову викликав зниження вмісту GSH до 1.65%, що підтверджує стійкий пригнічувальний ефект натрію за обох температур.
- CaCl₂ забезпечив той самий рівень глутатіону, що й контроль (2.15%), що може свідчити про позитивний вплив кальцію у поєднанні з підвищеною температурою.
- FeSO₄ за температури 33 °C виявився найефективнішим серед усіх мінеральних добавок, забезпечивши максимальний рівень GSH – 2.19%, що на $\approx 2\%$ перевищує контроль. Це може бути зумовлено участю заліза у ферментативних шляхах біосинтезу глутатіону, або ж стимуляцією антиоксидантних відповідей клітини внаслідок помірного окисного стресу.

Таким чином, додавання FeSO₄ за температури 33 °C виявилось найперспективнішим підходом до підвищення продукції глутатіону, тоді як NaCl стабільно негативно впливав на синтез, незалежно від температурного режиму. CaCl₂ виявився нейтральним за температури 30 °C і дозволяв утримувати рівень GSH без змін при 33 °C.

3.8. Зв'язок між ростом (OD, рН, АСБ) і глутатіоногенезом у третій серії експериментів

Для глибшого розуміння фізіолого-біохімічних умов, за яких дріжджові клітини синтезують найбільшу кількість глутатіону, було проаналізовано кореляцію між основними параметрами росту – оптичною щільністю (OD600), рН середовища та абсолютно сухою біомасою (АСБ) – і рівнем глутатіону за результатами третьої серії експерименту.

Загальні тенденції

- Найвищі значення OD600 та АСБ спостерігались у контрольних зразках за температури 33 °С та при додаванні CaCl₂ і FeSO₄, що свідчить про позитивний вплив цих умов на ріст культури.
- Найнижчі показники OD були зафіксовані при додаванні NaCl, що корелювало із пригніченням росту, зниженням АСБ та зменшенням рівня синтезу глутатіону.

Таблиця 3.4.

Фізико-хімічні показники Штаму 1, при культивуванні з різною температурою та з додаванням солей

Умови культивування	Цукор (%)	Формольне число	АСБ (г)	рН	Спирт (%/л)
Контроль 30°C	6	3,5	0,832	4,7	2,71
Контроль 33°C	6	3,6	0,658	4,77	2,67
30°C + FeSO ₄	6	3,4	0,794	4,73	2,67
33°C + FeSO ₄	6	3,1	0,751	4,82	2,68
30°C + NaCl	7	3,9	0,742	4,52	2,69
33°C + NaCl	7	4	0,702	4,58	2,68
30°C + CaCl ₂	6	3,9	0,810	4,71	2,69
33°C + CaCl ₂	6	4,1	0,780	4,81	2,66

Зв'язок OD ↔ GSH

Загалом між біомасоутворенням та глутатіоногенезом прослідковується позитивна тенденція, однак вона не була строго лінійною:

- Наприклад, при додаванні CaCl_2 OD залишався високим, але рівень GSH не перевищував контроль;
- У випадку з FeSO_4 , навіть при дещо нижчих показниках OD, концентрація глутатіону була найвищою, що може свідчити про активацію специфічних шляхів антиоксидантного захисту, а не просто кореляцію з ростом.

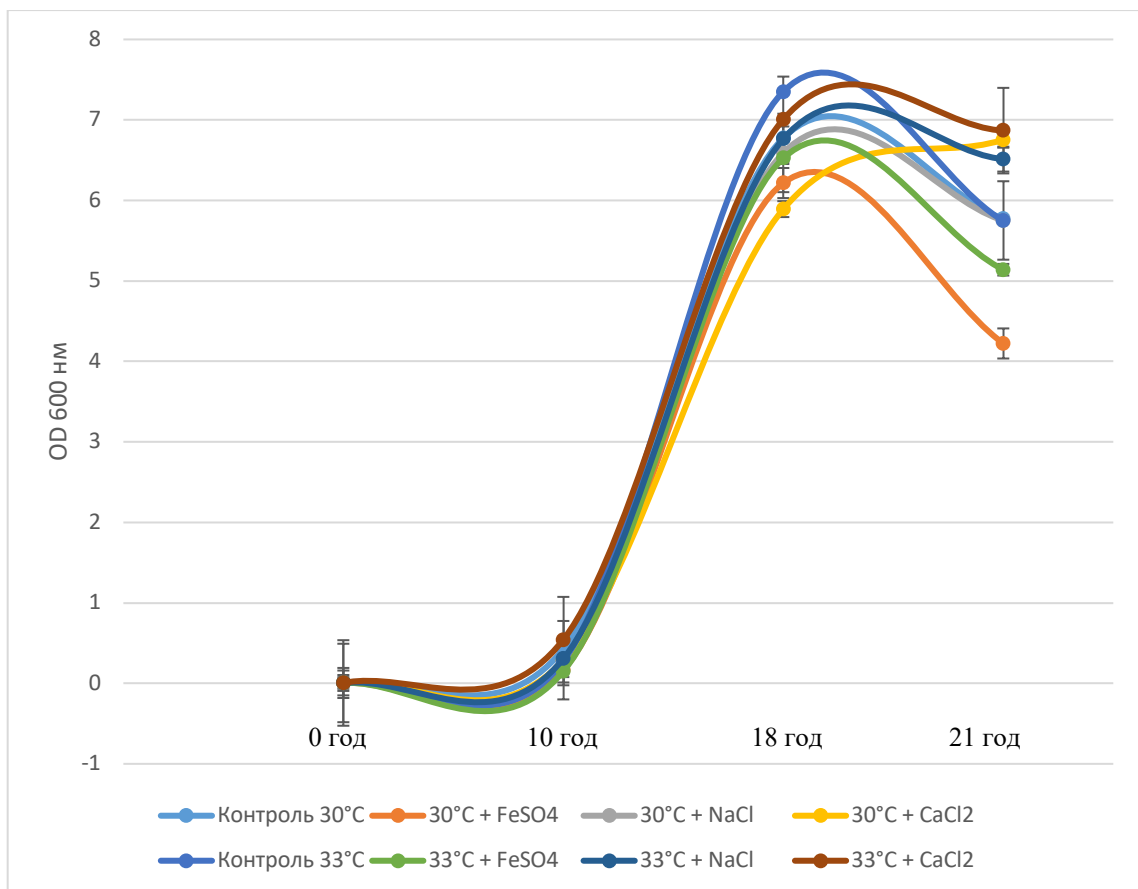


Рис. 3.4. Динаміка росту Штаму 1 при різних умовах вирощування

Зв'язок pH ↔ GSH

- Усі умови культивування супроводжувались помірним зниженням pH до значень 4.5–4.7, незалежно від температури або доданих солей.

- Встановити чіткий взаємозв'язок між кінцевим рН і синтезом глутатіону не вдалося; однак найнижчий рН спостерігався при активному споживанні субстрату та утворенні спирту, що, вірогідно, супроводжувалось і вищою метаболічною активністю.

3.9. Дослідження синтезу глутатіону Штамом 1 із додаванням різних комбінацій попередників біосинтезу глутатіону

Для встановлення впливу амінокислот-попередників на рівень синтезу глутатіону було проведено серію експериментів із використанням Штаму 1. Культивування здійснювали протягом 21 годин з додаванням різних комбінацій глутамату, цистеїну та гліцину за однакових умов рН (5,5), температури та аерації. Оцінку біомаси здійснювали за оптичною щільністю (OD600), рівень глутатіону визначали спектрофотометрично та виражали у відсотках від сухої біомаси.

Результати показали, що найвищий рівень глутатіону (2,31% від сухої біомаси) спостерігався у варіанті з додаванням цистеїну, глутамату та гліцину одночасно, що свідчить про синергетичну дію усіх трьох амінокислот у стимуляції біосинтезу трипептиду. Високі значення також були отримані при використанні комбінації цистеїну з гліцином (2,29%) та цистеїну з глутаматом (2,16%), що підкреслює ключову роль цистеїну як лімітуючого попередника глутатіону.

Додавання окремих амінокислот забезпечувало помірне підвищення продукції глутатіону: цистеїн окремо (2,18%), глутамат окремо (2,06%), тоді як найнижчі рівні синтезу були зафіксовані у варіанті з додаванням лише гліцину (1,85%) та у контрольному зразку без додавання попередників (1,74%). Варто зазначити, що комбінація глутамату з гліцином без цистеїну показала відносно низький результат (1,97%), що підтверджує критичну важливість цистеїну для ефективного синтезу глутатіону.

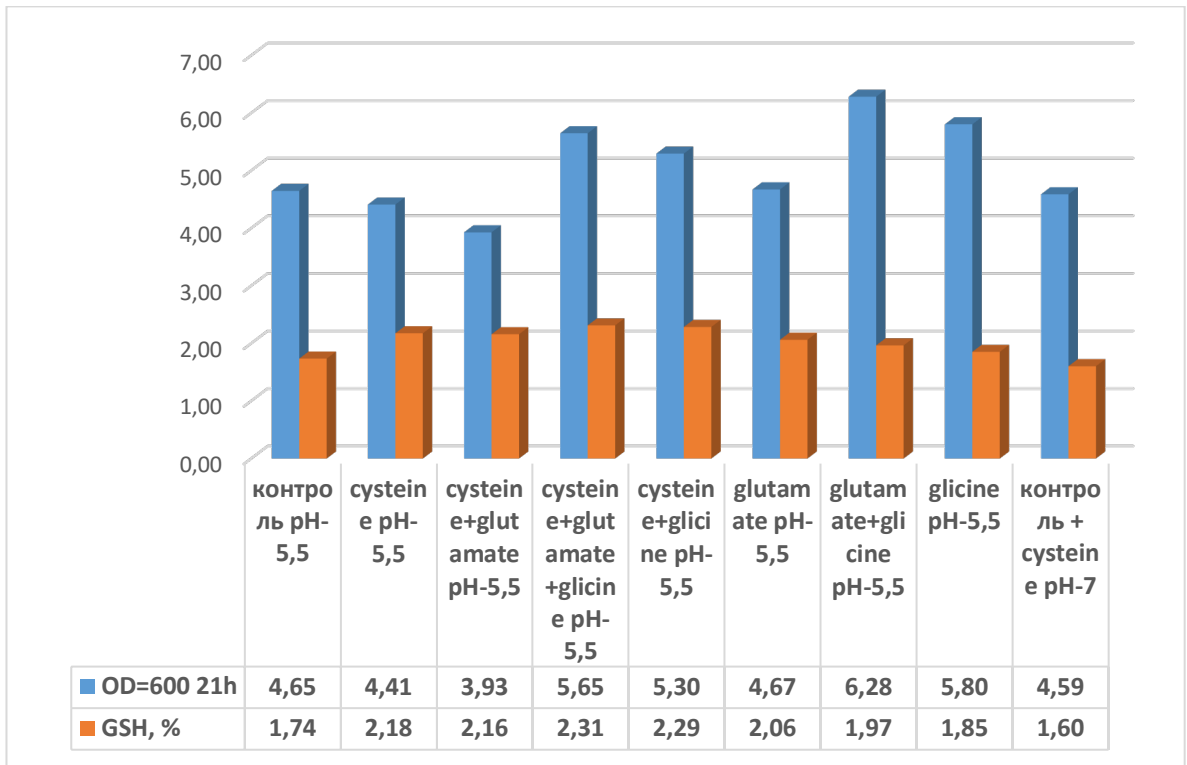


Рис. 3.5. Ріст і рівень GSH Штаму 1 при вирощуванні його у колбах на м'ясному середовищі із додаванням різних комбінацій попередників біосинтезу глутатіону

ВИСНОВКИ

1. Здійснено огляд наукових публікацій щодо біологічної ролі глутатіону, особливостей його синтезу в дріжджах і впливу умов культивування на продуктивність штамів-продуцентів.
2. Для проведення експериментальної частини дослідження було обрано Штам 1, що характеризується високим рівнем життєздатності та здатністю до стабільного синтезу глутатіону за умов лабораторного культивування.
3. Встановлено, що оптимальний час культивування для максимального накопичення глутатіону становить 21 годину, що відповідає завершенню експоненціальної фази росту дріжджів.
4. Збільшення температури до 33 °C призводить до підвищення синтезу глутатіону на $\approx 18.1\%$.
5. Отримані результати показали такий вплив неорганічних сполук на синтез глутатіону: FeSO_4 за температури 33 °C сприяє максимальному підвищенню синтезу GSH; NaCl має пригнічувальну дію на синтез глутатіону; CaCl_2 не впливав на рівень GSH.
6. Встановлено, що найвищий рівень синтезу глутатіону (2,31% від сухої біомаси) досягається при одночасному додаванні усіх трьох попередників (цистеїн + глутамат + гліцин), що на 33% перевищує контрольний варіант без додавання амінокислот.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (eds.). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Vol. 1–3. Amsterdam: Elsevier, 2011. 2354 p. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00001-X (дата звернення: 18.05.2025).
2. D. Mattanovich, M. Sauer, B. Gasser. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – Vol. 13, Art. 34. DOI: 10.1186/1475-2859-13-34 (дата звернення: 18.05.2025).
3. V. D. Longo, G. S. Shadel, M. Kaerberlein, B. K. Kennedy. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Metabolism*. – 2012. – Vol. 16, № 1. – P. 18–31. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.06.002 (дата звернення: 18.05.2025).
4. Y. Li, G. Wei, J. Chen. Glutathione: a review on biotechnological production // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – Vol. 66, № 3. – P. 233–242. DOI: 10.1007/s00253-004-1751-y (дата звернення: 18.05.2025).
5. D. Thomas, Y. Surdin-Kerjan. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1997. – Vol. 61, № 4. – С. 503–532. URL: <https://doi.org/10.1128/MMBR.61.4.503-532.1997> (дата звернення: 18.05.2025).
6. D. Grabowska, A. Chelstowska. The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 16. – С. 13984–13988. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m210076200> (дата звернення: 18.05.2025).
7. P. D. Adamis et al. The role of glutathione transferases in cadmium stress // *Toxicology Letters*. – 2004. – Vol. 154, № 1–2. – С. 81–88. URL: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.07.003> (дата звернення: 18.05.2025).
8. S. A. Mahmud, T. Hirasawa, H. Shimizu. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2010. – Vol. 109, № 3. – С. 262–266. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.08.500 (дата звернення: 18.05.2025).

9. G. G. Perrone, C. M. Grant, I. W. Dawes. Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Biology of the Cell*. – 2005. – Vol. 16, № 1. – С. 218–230. DOI: 10.1091/mbc.E04-07-0560 (дата звернення: 18.05.2025).
10. C. M. Grant. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions // *Molecular Microbiology*. – 2001. – Vol. 39, № 3. – С. 533–541. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02283.x (дата звернення: 18.05.2025).
11. M. J. Penninckx. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts // *FEMS Yeast Research*. – 2002. – Vol. 2, № 3. – С. 295–305. DOI: 10.1016/S1567-1356(02)00081-8 (дата звернення: 18.05.2025).
12. D. Mendoza-Cózatl, H. Loza-Tavera, A. Hernández-Navarro, R. Moreno-Sánchez. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2005. – Vol. 29, № 4. – С. 653–671. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.09.004 (дата звернення: 18.05.2025).
13. J. Kumar, M. I. Sharma, A. K. Tyagi. Yeast Rim11 kinase responds to glutathione-induced stress by regulating the transcription of phospholipid biosynthetic genes // *Molecular Biology of the Cell*. – 2023. – Vol. 34, № 4. – С. 1–13. DOI: 10.1091/mbc.E23-03-0116 (дата звернення: 18.05.2025).
14. J. W. Lee, H. Y. Kim, S. H. Lee, Y. J. Kim. Strategies to maintain redox homeostasis in yeast cells with impaired fermentation-dependent NADPH generation // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 17. – С. 9296. DOI: 10.3390/ijms25179296 (дата звернення: 18.05.2025).
15. Wangsanut, T., & Pongpom, M. (2022). The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10645. <https://doi.org/10.3390/ijms231810645>
16. Kobayashi, J., Sasaki, D., Hara, K. Y., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2022). Metabolic engineering of the L-serine biosynthetic pathway improves glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 21, 153. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01880-8>

17. Schmacht, M., Lorenz, E., Stahl, U., & Senz, M. (2017). Medium optimization based on yeast's elemental composition for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(5), 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.011>
18. Zhang, T., Wen, S. H., & Tan, T. W. (2007). Optimization of the medium for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 42(3), 454–458. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.003>
19. Alfafara, C. G., Miura, K., Shimizu, H., Shioya, S., & Suga, K. (1992). Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 141–146. <https://doi.org/10.1007/BF00178160>
20. Musatti, A., Manzoni, M., & Rollini, M. (2013). Post-fermentative production of glutathione by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in compressed and dried forms. *New Biotechnology*, 30(2), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.024>
21. Wen, S., Zhang, T., & Tan, T. (2005). Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. *Process Biochemistry*, 40(11), 3474–3479. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.027>
22. Rollini, M., & Manzoni, M. (2006). Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 41(7), 1501–1505. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.011>
23. Takagi, H. (2010). Metabolic regulatory mechanisms and physiological roles of glutathione in yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(2), 253–264. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1576500>
24. Wei, G. Y., Whang, D. H., & Chen, G. (2008). Overproduction of glutathione by L-cysteine addition and a temperature-shift strategy. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(3), 347–353. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-007-0191-9>
25. Liang, G., & Liao, X. (2008). Optimization of amino acids addition for efficient production of glutathione in *Candida utilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 40(1), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.04.020>

26. Qiu, Z., Deng, Z., Tan, H., Zhou, S., & Cao, L. (2015). Engineering the robustness of *Saccharomyces cerevisiae* by introducing bifunctional glutathione synthase gene. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(4), 537–542. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1573-6>
27. Hara, K. Y., Aoki, N., Kobayashi, J., Kiriya, K., Nishida, K., Araki, M., & Kondo, A. (2015). Improvement of oxidized glutathione fermentation by thiol redox metabolism engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9771–9778. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6847-z>
28. Kiriya, K., Hara, K. Y., & Kondo, A. (2013). Oxidized glutathione fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* engineered for glutathione metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7399–7404. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5074-8>
29. Kiriya, K., Hara, K. Y., & Kondo, A. (2012). Extracellular glutathione fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel glutathione exporter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 1021–1027. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4075-3>
30. Lorenz, E., Schmach, M., Stahl, U., & Senz, M. (2015). Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 216, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.016>
31. Xiong, Z.-Q., Guo, M.-J., Guo, Y.-X., Chu, J., Zhuang, Y.-P., & Zhang, S.-L. (2009). Efficient extraction of intracellular reduced glutathione from fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Bioresource Technology*, 100(2), 1011–1014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.018>
32. Xiong, Z.-Q., Guo, M.-J., Guo, Y.-X., Chu, J., Zhuang, Y.-P., & Zhang, S.-L. (2008). Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed-batch glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* T65 in industrial complex medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4), 409–413. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.409>
33. Xiong, Z.-Q., Guo, M.-J., Guo, Y.-X., Chu, J., Zhuang, Y.-P., Wang, N.-S., & Zhang, S.-L. (2010). RQ feedback control for simultaneous improvement of GSH yield and GSH

- content in *Saccharomyces cerevisiae* T65. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(7), 598–602. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.003>
34. Sasaki, K., Hara, K. Y., Kawaguchi, H., Sazuka, T., Ogino, C., & Kondo, A. (2016). Nanofiltration concentration of extracellular glutathione produced by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(1), 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.013>
35. Hara, K. Y., Aoki, N., Kobayashi, J., Kiriyama, K., Nishida, K., Araki, M., & Kondo, A. (2015). Improvement of oxidized glutathione fermentation by thiol redox metabolism engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9771–9778. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6847-z>
36. Kuge, S., Jones, N., & Nomoto, A. (1997). Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. – *EMBO Journal*. – Т. 16, – № 7. – С. 1710–1720. URL: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.7.1710> (дата звернення: 18.05.2025).
37. Thomas, D., & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – Т. 61, – № 4. – С. 503–532. URL: <https://doi.org/10.1128/MMBR.61.4.503-532.1997> (дата звернення: 18.05.2025).
38. Kaiser, P., Su, N. Y., Yen, J. L., Ouni, I., & Flick, K. (2006). The yeast ubiquitin ligase SCFMet30: connecting environmental and intracellular conditions to cell division. – *Cell Division*. – Т. 1, – Art. 16. URL: <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-16> (дата звернення: 18.05.2025).
39. Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., & Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). – *EMBO Journal*. – Т. 15, – № 9. – С. 2227–2235. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC450147/> (дата звернення: 18.05.2025).
40. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., & Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. – *Journal of Biological Chemistry*. – Т. 274, – № 23. – С. 16040–16046. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16040> (дата звернення: 18.05.2025).

41. Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. – *Cell*. – Т. 124, – № 3. – С. 471–484. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016> (дата звернення: 18.05.2025).
42. Beck, T., & Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. – *Nature*. – Т. 402, – № 6762. – С. 689–692. URL: <https://doi.org/10.1038/45287> (дата звернення: 18.05.2025).
43. Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. – *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – Т. 66, – № 2. – С. 300–372. URL: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002> (дата звернення: 18.05.2025).
44. Thevelein, J. M., & de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. – *Molecular Microbiology*. – Т. 33, – № 5. – С. 904–918. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x> (дата звернення: 18.05.2025).
45. Alejandro-Osorio, A. L., Huebert, D. J., Porcaro, D. T., et al. (2009). The histone deacetylase Rpd3p is required for transient changes in genomic expression in response to stress. – *Genome Biology*. – Т. 10, – № 5. – Art. R57. URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-r57> (дата звернення: 18.05.2025).
46. Till, P., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2018). A current view on long noncoding RNAs in yeast and filamentous fungi. – *Applied Microbiology and Biotechnology*. – Т. 102, – № 17. – С. 7319–7331. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9187-y> (дата звернення: 18.05.2025).
47. Biterova, E. I., & Barycki, J. J. (2010). Structural basis for feedback and pharmacological inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* glutamate cysteine ligase. – *Journal of Biological Chemistry*. – Т. 285, – № 19. – С. 14459–14466. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.104802> (дата звернення: 18.05.2025).
48. Meister, A. (1995). Glutathione biosynthesis and its inhibition. – *Methods in Enzymology*. – Т. 252. – С. 26–30. URL: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52005-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52005-8) (дата звернення: 18.05.2025).

49. Ohtake, Y., & Yabuuchi, S. (1991). Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Yeast*. – Т. 7, – № 9. – С. 953–961. URL: <https://doi.org/10.1002/yea.320070907> (дата звернення: 18.05.2025).
50. Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., et al. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. – *Molecular Biology of the Cell*. – Т. 9, – № 12. – С. 3273–3297. URL: <https://doi.org/10.1091/mbc.9.12.3273> (дата звернення: 18.05.2025).
51. Tu, B. P., Kudlicki, A., Rowicka, M., & McKnight, S. L. (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. – *Science*. – Т. 310, – № 5751. – С. 1152–1158. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1120499> (дата звернення: 18.05.2025).
52. Wu, A., & Moye-Rowley, W. S. (1994). GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for *yAP-1* transcriptional regulation. – *Molecular and Cellular Biology*. – Т. 14, – № 9. – С. 5832–5839. URL: <https://doi.org/10.1128/mcb.14.9.5832-5839.1994>
53. Kiriyaama, K., Hara, K. Y., & Kondo, A. (2013). Extracellular glutathione fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel glutathione exporter. – *Applied Microbiology and Biotechnology*. – Т. 97, – № 4. – С. 1629–1638. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4075-3> (дата звернення: 18.05.2025).
54. Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. – *Journal of Biotechnology*. – Т. 127, – № 3. – С. 335–347. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012> (дата звернення: 18.05.2025).
55. Yan, C., Lee, L. H., & Davis, L. I. (1998). *Crm1p* mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. – *EMBO Journal*. – Т. 17, – № 24. – С. 7416–7429. URL: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7416> (дата звернення: 18.05.2025).
56. Jensen, E. D., Ferreira, R., Jakočiūnas, T., et al. (2017). Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial gRNA strategies. – *Microbial Cell Factories*. – Т. 16, – Art. 46. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0664-2> (дата звернення: 18.05.2025)

57. Wu, A., & Moye-Rowley, W. S. (1994). GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for γ AP-1 transcriptional regulation. – *Molecular and Cellular Biology*. – Т. 14, – № 9. – С. 5832–5839. URL: <https://doi.org/10.1128/mcb.14.9.5832-5839.1994> (дата звернення: 18.05.2025)
58. Hara, K. Y., Kiriya, K., Inagaki, A., et al. (2012). Improvement of glutathione production by metabolic engineering the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Applied Microbiology and Biotechnology*. – Т. 94, – № 5. – С. 1313–1319. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3841-y> (дата звернення: 18.05.2025)
59. Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., & Anraku, Y. (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Journal of Bacteriology*. – Т. 170, – № 6. – С. 2683–2686. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2683-2686.1988> (дата звернення: 18.05.2025)
60. Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. – *FEMS Microbiology Reviews*. – Т. 29, – № 4. – С. 653–671. URL: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.004> (дата звернення: 18.05.2025)
61. Reinke, A., Chen, J. C., Aronova, S., & Powers, T. (2006). Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. – *Journal of Biological Chemistry*. – Т. 281, – № 42. – С. 31616–31626. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m603107200> (дата звернення: 18.05.2025)
62. Maeta, K., Izawa, S., & Inoue, Y. (2005). Methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis, functions as a signal initiator of the high osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade and calcineurin/Crz1-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Journal of Biological Chemistry*. – Т. 280, – № 1. – С. 253–260. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m408061200> (дата звернення: 18.05.2025)
63. Smith, A., Ward, M. P., & Garrett, S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. – *EMBO Journal*. – Т. 17, – № 13. – С. 3556–3564. URL: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3556> (дата звернення: 18.05.2025)

64. Sambade, M., Alba, M., Smardon, A. M., et al. (2005). A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants. – *Genetics*. – Т. 170, – № 4. – С. 1539–1551. URL: <https://doi.org/10.1534/genetics.105.042812> (дата звернення: 18.05.2025)
65. Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. – *Nature Chemical Biology*. – Т. 8, – № 6. – С. 536–546. URL: <https://doi.org/10.1038/nchembio.970> (дата звернення: 18.05.2025).
66. Win, M. N., & Smolke, C. D. (2007). A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – Т. 104, – № 36. – С. 14283–14288. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.0703961104> (дата звернення: 18.05.2025).
67. Nielsen, J., & Keasling, J. D. (2016). Engineering Cellular Metabolism. – *Cell*. – Т. 164, – № 6. – С. 1185–1197. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.004> (дата звернення: 18.05.2025).
68. Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. – *Nature Protocols*. – Т. 1, – № 6. – С. 3159–3165. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378> (дата звернення: 18.05.2025).
69. Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. – *Nature Protocols*. – Т. 1, – № 6. – С. 3159–3165. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378> (дата звернення: 18.05.2025).
70. Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. – *Free Radical Biology and Medicine*. – Т. 30, – № 11. – С. 1191–1212. URL: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4) (дата звернення: 18.05.2025).