

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

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДОСЛІДЖЕННЯ КІЛЕРНИХ СПОЛУК СЕКРЕТУЮЧИХ
ДРІЖДЖАМИ РОДУ *PICNIA* ПРИ РІЗНИХ УМОВАХ ЇХ
КУЛЬТИВУВАННЯ**

Допущена до захисту

Кваліфікаційна робота

«__» _____ 2023р.

студента 4 курсу, кафедри молекулярної

біології та біотехнології, група БТ-41,

Чепіги Дмитра Анатолійовича

Науковий керівник:

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Завідувач кафедри

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Голова ЕК _____

Оцінка « _____ »

«__» _____ 2023р

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

В роботі досліджували вплив різних поживних середовищ на ріст культури дріжджів і продукцію кілерів *Pichia*, для майбутнього використання даних сполук для зниження швидкості псування харчових продуктів зокрема пресованих дріжджів і продовження їх терміну зберігання.

Дослідженням встановлено, що оптимальна тривалість культивування дріжджів *Pichia* становить 3 дні, додавання солі K_2HPO_4 до живильного середовища, що містить певні мікроелементи, і до середовища без додавання солей, покращує накопичення біомаси дріжджів на третій день вирощування на 4 % та 15 % відповідно порівнюючи з контролем. Для покращення середовища на основі меляси можна рекомендувати використання суміші солей ($FeSO_4$, $NaCl$ та K_2HPO_4). Дослідження також показало, що середовище на основі глюкози призвело до збільшення росту у три рази, ніж середовище на основі сахарози.

Культура дріжджів *Pichia* виявилася ефективною для пригнічення росту білої цвілі, тоді як надосадова рідина з культуральної рідини дріжджів (супернатант) не чинила інгібуючої дії на тестовані культури.

Робота включає 47 сторінок, містить 1 таблицю, 9 рисунків. Список використаних джерел містить 40 джерел, з них 40 іноземних.

Ключові слова: *Pichia*, культивування, середовище, дріжджі, кілерні сполуки.

SUMMARY

The study aimed to investigate the influence of different nutrient media on the growth of yeast culture and the production of *Pichia* killers, for the future use of these compounds to reduce the rate of deterioration of food products, in particular pressed yeast, and extend their shelf life.

The study found that the optimal duration of cultivation of *Pichia* yeast is 3 days, the addition of K_2HPO_4 salt to the nutrient medium containing certain microelements and to the medium without the addition of salts, gives an improvement in the accumulation of yeast biomass on the third day of cultivation by 4% and 15%, respectively, compared to the control. It is possible to recommend the use of a mix of salts ($FeSO_4$, $NaCl$ and K_2HPO_4) to improve the molasses based medium. The study also showed that the glucose-based medium resulted in over three times as much growth as sucrose-based medium.

Pichia yeast culture was found to be effective in inhibiting the growth of white mold, while the yeast culture supernatant did not show any positive results.

The work includes 47 pages, contains 1 table, 9 figures. The list of used sources contains 40 sources, of which 40 are foreign.

Key words: *Pichia*, cultivation, medium, yeast, killer compounds.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Використання дріжджів у біотехнології.....	8
1.1.1. Можливі напрямки використання.....	8
1.1.2. Види дріжджів, які використовуються у біотехнології	9
1.1.3. Кілерні сполуки в дріжджах	11
1.2. Характеристика та особливості структурно-функціональної організації клітин роду <i>Pichia pastoris</i>	13
1.2.1. Мітохондрії дріжджів.....	14
1.2.2. Ендоплазматичний ретикулум дріжджів.....	15
1.2.3. Апарат Гольджі дріжджів	15
1.2.4. Система пероксисом дріжджів	16
1.3. Механізми екскреторної активності клітин дріжджів	17
1.3.1. Везикулярний механізм екскреції.....	18
1.3.2. Вакуолярний механізм	19
1.3.3. Механізм множинної лікарської стійкості дріжджів	20
1.4. Фактори регуляції екскреторної активності.....	21
1.5. Що відомо про секретом <i>Saccharomyces cerevisiae</i> та <i>Pichia pastoris</i> ?	23
1.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.5.2. <i>Pichia pastoris</i>	24
1.6. Методи дослідження секретома	25
1.6.1. Серійний аналіз експресії генів.....	25
1.6.2. Використання ДНК мікрочіпів.....	26
1.6.3. Мас-спектрометрія.....	27
1.6.4. Секвенування РНК.....	27
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	29
2.1. Загальна схема експерименту	29
2.2. Приготування поживного середовища	30

2.3. Перевірка кілерної активності	30
2.3.1. Блочковий тест під час росту культури.....	30
2.3.2. Тест активності кілерних сполук в супернатанті	30
2.4. Культивування та підбір оптимального середовища	31
2.4.1. Посів культури “газоном”	31
2.4.2. Посів виснажуючим штрихом	31
2.4.3. Посів рідкої культури в пробірку.....	31
2.4.4. Посів рідкої культури в колби.....	31
2.4.5. Вимірювання оптичної щільності.....	33
2.4.6. Сепарація дріжджів від середовища	33
2.5. Статистична обробка даних	34
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	35
3.1. Визначення оптимальної тривалості вирощування <i>Pichia</i>	35
3.2. Вплив солей Fe, Na та K на швидкість росту культури.....	36
3.3. Оптимізація стандартного середовища для культивування хлібопекарських дріжджів під вирощування <i>Pichia</i>	38
3.4. Ріст на багатих поживних середовищах	39
3.5. Перевірка дріжджів роду <i>Pichia</i> та отриманого супернатанту після їх культивування на предмет пригнічення росту білої цвілі	40
3.5.1. Перевірка даних дріжджів на предмет пригнічення росту білої цвілі	40
3.5.2. Перевірка супернатанту на предмет пригнічення росту білої цвілі	41
ВИСНОВКИ.....	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	43

ВСТУП

Відомо, що мікроорганізми у тому числі дріжджі в процесі життєдіяльності екскретують велику кількість різноманітних сполук. Формування секретом культуурою дріжджів залежить від умов культивування та мікробного співтовариства в якому знаходяться дріжджі. Серед компонентів секретом важливу роль у формуванні мікробних угруповань відіграють токсичні або кілерні сполуки. Вони пригнічують зростання інших клітин, але не впливають на самих продуцентів [1].

Вперше дріжджі-кілери були виявлені в 1963 р. Бівенном і Маковером і показали, що екзотоксин представлені білками або глікопротеїнами. Дослідження впливу умов культивування на екскрецію кілерних факторів дріжджів мають велике значення в біотехнології, оскільки ці сполуки можуть проявляти свою токсичну дію і на клітини еукаріотів [2].

Для виробництва секретованих білків *P. pastoris* може бути найкращим вибором через його обмежену ендогенну секрецію білка та кількість різних доступних штамів з дефіцитом протеази. Однак повної користі від *P. pastoris* можна досягти лише за умови його культивування в суворо визначених умовах.

У зв'язку з цим у роботі досліджували активність кілерних сполук, що виділяються у середовище дріжджами роду *Pichia*, при різних поживних середовищах.

Метою дослідження було дослідити можливість зменшити псування продукту та подовжити термін зберігання за допомогою кілерних сполук, які можуть бути отримані з дріжджів роду *Pichia*.

Завдання: дослідити кілерні сполуки, що секретуються дріжджами рода *Pichia*, були поставлені такі завдання:

1. Визначити оптимальну кількість днів культивування *Pichia*.
2. Вплив солей Fe, Na та K на швидкість росту культури.
3. Покращити стандартне середовища для культивування хлібопекарських дріжджів під вирощування *Pichia*.
4. Дослідити ріст на багатих поживних середовищах.
5. Перевірити дані дріжджі та отриманий супернатант після їх культивування на предмет пригнічення росту білої цвілі.

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Використання дріжджів у біотехнології

Дріжджі є важливим інструментом у біотехнології завдяки їхній здатності виконувати різноманітні функції, такі як бродіння, синтез білка та виробництво біопалива.

Одним із найпоширеніших видів дріжджів є *Saccharomyces cerevisiae*, який широко використовується у виробництві пива, вина та хліба. Він також був розроблений для виробництва біопалива, такого як етанол і бутанол. Вид *Candida utilis*, використовується у виробництві мікробних ліпідів як стійка альтернатива пальмовій олії [3].

Крім того, дріжджі використовуються як модельні організми в наукових дослідженнях, зокрема в генетиці та молекулярній біології. *S. cerevisiae* широко використовується для вивчення фундаментальних клітинних процесів, таких як реплікація ДНК і синтез білка [4].

Універсальність дріжджів і легкість вирощування робить їх цінними інструментами в біотехнології та наукових дослідженнях.

1.1.1. Можливі напрямки використання

Kluyveromyces marxianus є сприятливим хазяїном для виробництва позаклітинних білків завдяки його здатності рости на різних недорогих субстратах, таких як відпрацьований сульфітний розчин, патока та сироватка. Крім того, цей вид має природну здатність виділяти ферменти та рости на кількох полісахаридах, що робить його перспективним для виробництва біоінгредієнтів та промислових ферментів [5].

Особливо цікавою є здатність *K. marxianus* до виділення інулінази, яка експресується за допомогою сильного промотора та є одним з основних білків, що виділяються в культуральну рідину. Крім того,

можливість одночасної деградації лактози та виробництва біомаси та промислових ферментів робить *K. marxianus* перспективним хазяїном для виробництва різноманітних продуктів [6].

Одноклітинні мікроорганізми можуть бути вигідними для заміни білків сільськогосподарського походження для харчових продуктів або кормів завдяки високій швидкості розмноження та високому вмісту білка (30–80% білка в перерахунку на суху вагу). Великомасштабне виробництво мікробної біомаси може бути доцільним завдяки здатності мікроорганізмів використовувати різні недорогі джерела вуглецю, включаючи відходи [5,7].

Олія з мікроорганізмів або мікробні ліпіди розглядаються як потенційні замітники рослинних олій і тваринних жирів для виробництва невикопного біопалива (тобто біодизеля) і олійних хімікатів, оскільки властивості олії подібні за типами, структурою та складом жирних кислот [5].

1.1.2. Види дріжджів, які використовуються у біотехнології

Schizosaccharomyces pombe використовують як для фундаментальних досліджень біології еукаріот так і для отримання гетерологічних білків. *S. cerevisiae* і *Schiz. pombe* є модельними еукаріотичними системами для вивчення базової біології, і ці дослідження поширилися на біотехнологію. Також зазначено, що цих два види дріжджів мають понад 200 спільних генів, які є гомологічними людським та пов'язаних із захворюваннями, включаючи 23 гени, пов'язані з раком людини. *S. cerevisiae* та *Schiz. pombe* були використані для досліджень, за які Лі Хартвеллу та Полу Нерсу була присуджена Нобелівська премія з медицини 2001 року. Ці дріжджі й надалі використовуватимуться для з'ясування фундаментальних проблем біології еукаріот та для розуміння біології та хвороб людини [8].

Schwanniomyces occidentalis є членом *Saccharomycetales* і використовується у біотехнології для вироблення гідролітичних ферментів, зокрема амілази, яка здатна розщеплювати крохмаль з різних джерел, включаючи картоплю, ячмінь, кукурудзу, пшеницю та інші. *Schwan. occidentalis* використовується для виробництва цукру, цукрових сиропів, етанолу та отримання білка. Також дріжджі виробляють білки-вбивці та протигрибкові речовини і використовуються для біоконтролю небажаних грибів [9].

Debaryomyces hansenii, мають біотехнологічний потенціал у різноманітних областях, вони належать до ліпідонакопичуючих або «масляних» дріжджів. Деякі з цих дріжджів можуть накопичувати 20-70% своєї біомаси у вигляді ліпідів. Їх здатність накопичувати велику кількість ліпідів відкриває комерційний потенціал для виробництва ліпідів або «одноклітинних олій», виробництва біодизеля, а також накопичення високоцінних розчинних у жирах дрібних хімічних речовин, таких як каротиноїди, поверхнево-активні речовини та ароматизатори [10].

Kluveromyces — аскоміцетоподібні дріжджі, що виробляють β -галактозидазу (лактазу), яка дозволяє використовувати лактозу, властивість, яка має особливе значення для молочної промисловості. *Kluveromyces spp.* можна вирощувати на недорогих субстратах і відходах, що містять лактозу, таких як сироватка. Цей рід дріжджів також має промисловий потенціал для виробництва білка, екзополісахаридів і хімічних речовин [11].

Yarrowia lipolytica має унікальну фізіологічну здатність використовувати поліспирти, органічні кислоти та довголанцюгові вуглеводні як субстрати. Вона виробляє високі рівні ліполітичних ферментів та органічних кислот (наприклад, пірувату, лимонної кислоти та ізоцитрату), а також високоцінні сполуки, включаючи лактони як ароматизатори. Ферменти, включаючи цитохром P450 і ліпази, комерційно

використовуються в біотрансформаціях стероїдів, синтезі фармацевтичних проміжних продуктів і виробництві тонких хімічних речовин. *Y. lipolytica* також може бути як джерело білка з ліпідних субстратів, таких як сира нафта та вуглеводні [12].

Xanthophyllomyces dendrorhous є базидіальними дріжджами, які виробляють високоцінний каротиноїд астаксантин, що є одним з найпоширеніших каротиноїдів у біосфері і використовується у харчовій промисловості [13].

1.1.3. Кілерні сполуки в дріжджах

Білок токсину-кілера з *Pichia membranifaciens* СУС 1106 має видиму молекулярну масу 18 кДа, а дріжджі *Hansenula trakii* виділяють білок з невеликою молекулярною масою (10,7 кДа). Токсин РМКТ2, що продукується *P. membranifaciens* СУС 1086, є білком з уявною молекулярною масою 30 кДа. Крім того, виявлено, що токсини подібні за своєю поведінкою при різних значеннях рН і температури. Показано, що стабільність більшості токсинів-кілерів сильно залежить від кислих значень рН (рН < 5,5–6,0) і низьких температур (<20–25 °С) [14,15].

Штами-кілери *S. cerevisiae* продукують і виділяють білкові токсини, які є летальними для чутливих штамів того самого або спорідненого виду дріжджів, їх згруповано в три типи: токсин-кілер 1 (К1), токсин-кілер 2 (К2) і токсин-кілер 28 (К28), а також виявлено новий токсин-кілер (Klus), який знищує раніше відомі штамми-кілери *S. cerevisiae*, на додаток до інших видів дріжджів. Фенотип вбивці передається вірусом дволанцюгової РНК середнього розміру (dsRNA) у *S. cerevisiae* [14,16].

Зимоцин, що продукується *Kluveromyces lactis*, проявляє пригнічуючі властивості на ріст широкого спектру дріжджів із *Candida*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* і *Zygosaccharomyces*, а також некілерних штамів *K. lactis*. Було помічено, що дріжджі

Brettanomyces/Dekkera, які спричиняють помутніння, каламутність і сильний неприємний присмак у винах і підвищують кислотність, можуть бути ефективно знищені токсином-кілером (Kwkt), що виробляється *Kluveromyces wickerhamii* [14,17].

Було показано, що вид *Pichia* можуть виробляти більше смертоносних токсинів, ніж будь-які інші види дріжджів. Токсин-кілер РМКТ1, що виробляється *Pichia membranifaciens* СУС 1086, діє шляхом порушення електрохімічних градієнтів плазматичної мембрани, що призводить до загибелі чутливих клітин, а токсин-кілер, що виробляється *P. membranifaciens* СУС 1106, має активність проти *Botrytis cinerea*.

P. membranifaciens СУС 1086 також виділяє токсин-убивцю (РМКТ2), який інгібує різноманітні дріжджі та гриби, що викликають псування, чим представляють агрономічний інтерес. РМКТ2 здатний пригнічувати *Botrytis bruxellensis*, тоді як *S. cerevisiae* є повністю стійким до цього токсину, що вказує на те, що РМКТ2 можна використовувати у ферментації вина, щоб уникнути розвитку псувальних дріжджів без шкідливого впливу на ферментаційний штам.

Дріжджовий штам *Pichia anomala* DBVPG 3003 виділяє токсин-кілер (Pikt), який має протигрибкову дію проти *Brettanomyces/Dekkera* [14].

Токсини-убивці, що виробляються *Williopsis sp.* мають широкий спектр вбивства. Виявлено, що новий токсин-кілер, який виділяє *Williopsis saturnus* DBVPG 4561, має широку антимікотичну дію, а токсин-кілер із культури дріжджів *W. saturnus* WC91-2 мав високу кілінгову активність щодо патогенних штамів дріжджів. Дріжджі-кілери *W. saturnus* можуть ефективно використовуватися, як біоконсервант для контролю псування сиру [14,18].

1.2. Характеристика та особливості структурно-функціональної організації клітин роду *Pichia pastoris*

На даний момент послідовності геномів штамів *Pichia pastoris* були опубліковані, відомо що розміри геномів трьох різних секвенованих штамів дуже схожі (9,5 Mbp), а також кількість генів (~5300).

Крім того, послідовності кодування дуже схожі. У середньому вони ідентичні на рівні амінокислотної послідовності до 91,5%. Некодуючі послідовності є більш розбіжними, хоча промотори та термінатори функціонують у всіх досліджених на даний момент штаммах.

Секвенування підтвердило наявність чотирьох хромосом, визначених за допомогою гель-електрофорезу в імпульсному полі, і перебудову хромосом між *P. pastoris* і *Komagataella phaffii* [19].

Однією з найбільш помітних характеристик клітин *P. pastoris* є склад їхньої клітинної стінки, який багатий на маннопротеїни та β -глюкани. Маннопротеїни - це глікопротеїни, які відіграють ключову роль у клітинній адгезії та захисті від стресів навколишнього середовища, тоді як β -глюкани є полісахаридами, які сприяють жорсткості та цілісності клітинної стінки.

Клітини *P. pastoris* також мають унікальну систему пероксисом, яка необхідна для метаболізму метанолу та жирних кислот та високий ступінь внутрішньоклітинної компартменталізації зі спеціалізованими органелами, такими як ендоплазматичний ретикулум (ЕР) і комплекс Гольджі, які відіграють ключову роль у переробці та секреції білка.

ЕР відповідає за згортання та модифікацію білка, тоді як комплекс Гольджі бере участь у сортуванні та транспортуванні білка до поверхні клітини або позаклітинного середовища [20].

Клітини *Pichia pastoris* є еукаріотичними і тому містять мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, унікальну систему пероксисом та інші пов'язані з мембраною органели.

1.2.1. Мітохондрії дріжджів

Мітохондрії *P. pastoris* здатні активно окислювати доданий зовні НАДН. Слабке окислення лактату ізольованими мітохондріями *P. pastoris* свідчить про те, що в цих мітохондріях відсутня лактатдегідрогеназа, звернена до міжмембранного простору, яка живить електронами цитохром с, який присутній, наприклад, у *Saccharomyces cerevisiae* [21].

Кардіоліпін, спеціальний фосфоліпід, що складається з двох головних груп і чотирьох жирних ацильних ланцюгів, в основному міститься у внутрішній мітохондріальній мембрані (ВММ). Було показано, що кардіоліпін необхідний для оптимальної активності комплексів I, III, IV і V великих дихальних ланцюгів і кількох переносників мітохондріальних субстратів.

Тому, кардіоліпін необхідний для функціонування та структури ВММ. Крім того, він відіграє важливу роль у мітохондріальному апоптотичному шляху. Подібно до мітохондрій інших типів клітин, кардіоліпін значно збагачений у ВММ *P. pastoris*.

Основними фосфоліпідами обох мітохондріальних мембран незалежно від джерела вуглецю, що використовується для культивування клітин, були фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін. Характерною властивістю зовнішньої мітохондріальної мембрани (ЗММ) є високий вміст фосфатидилінозиту.

ЗММ являє собою гладку оболонку, збагачену ліпідами, з пороутворюючими білками, тоді як сильно складчаста ВММ багата білком, що містить переважно ферменти дихального ланцюга.

Фосфатидилінозитол присутній в ЗММ у великій кількості, тоді як кардіоліпін і фосфатидилетаноламін збагачені в ВММ [22].

1.2.2. Ендоплазматичний ретикулум дріжджів

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є субклітинною органелою, де багато білків синтезується та сортується в різні субклітинні місця призначення, а також у позаклітинний простір. Він забезпечує оптимальне та унікальне середовище для згортання білків, збірки та утворення дисульфідних зв'язків перед впливом на позаклітинний простір.

Коли еукаріотичні клітини зазнають стресу в просвіті ЕР, вони реагують на зниження рівня стресу в короткостроковій перспективі через процес, відомий як реакція розгорнутого білка (РРБ). У відповідь на накопичення розгорнутих білків у ЕР швидкість загальної ініціації трансляції послаблюється, індукується експресія резидентних білків-шаперонів і протейнових фолдаз ЕР, компартмент ЕР проліферує, і ЕР - асоційована деградація активується до усунення неправильно згорнутих білків.

Шляхом маніпулювання рівнями резидентних шаперонів ЕР і факторів транскрипції, залучених до РРБ, було виявлено поліпшення секреції *P. pastoris* для ряду білків.

Сигнальні пептиди для транслокації білка можна розділити на два окремі класи: котрансляційні, в яких пребілок синтезується одночасно з транслокацією ЕР, і посттрансляційні, в яких пребілок повністю синтезується та вивільняється з рибосоми перед транслокацією ЕР [23].

1.2.3. Апарат Гольджі дріжджів

У багатьох типах клітин, починаючи від водоростей і закінчуючи ацинарними клітинами підшлункової залози, деякі або всі сайти ЕР безпосередньо прилягають до цис-грані стеків Гольджі. *Pichia pastoris* містить органиели Гольджі, а *Saccharomyces cerevisiae* рідко демонструє

складену структуру, але існує переважно як окремі цистерни, розсіяні по всій цитоплазмі.

Якщо Гольджі справді є відростком ЕР, то деякі варіації в структурі Гольджі можуть бути наслідком відмінностей в організації ЕР. Організація ЕР також принципово відрізняється у двох дріжджів. *P. pastoris* містить дискретні сайти ЕР, а *S. cerevisiae* функціонує як ЕР.

Групи цистерн Гольджі можна легко побачити в клітинах *P. pastoris*, причому кожна група містить близько чотирьох цистерн. Раніше опубліковані зображення *P. pastoris* показали стеки Гольджі біля ядра. Структури Гольджі можуть утворюватися, виростаючи з ядерної оболонки, яка становить велику частку ЕР у брунькувальних дріжджах.

Електронна мікроскопія тонкого зрізу вказує на те, що типова клітина *P. pastoris* містить кілька окремих стопок Гольджі, лише деякі з яких розташовані поблизу ядра. Інші стеки Гольджі знаходяться поруч із периферичними елементами ЕР, які лежать під плазматичною мембраною [24].

1.2.4. Система пероксисом дріжджів

Пероксисоми — це різноманітні органели, пов'язані з однією мембраною, які повсюдно зустрічаються в еукаріотичних клітинах. Особливістю дріжджових пероксисом є їх здатність індукувати ріст на середовищах, що містять алкани, жирні кислоти або метанол.

Пероксисоми *P. pastoris*, вирощені на середовищах, що містять метанол або олеїнову кислоту, показали чіткі та різні структури білка. У клітинах, вирощених на метанолі, АОХ був найпомітнішим білком у загальних клітинних екстрактах і особливо в пероксисомній фракції.

Найпомітніші поліпептиди пероксисом з клітин, вирощених з олеїною кислотою як єдиним джерелом вуглецю, були ідентифіковані за

допомогою мас-спектрометричного аналізу як ацил-КоА-оксидаза, 3-кетоацил-КоА-тіолаза, пероксисомальна каталаза і багатофункціональний білок β -окислення, який виявляє активність 3-гідроксіацил-КоА дегідрогенази, 2-еноіл-КоА гідратази та 3-гідроксіацил-КоА епімерази

Фосфоліпідний аналіз обох препаратів показав, що подібно до пероксисомальних мембран із *S. cerevisiae* фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін були основними фосфоліпідами пероксисом *P. pastoris* незалежно від джерела вуглецю, використаного для культивування.

Подібно до *S. cerevisiae* основним стеролом *P. pastoris* є ергостерин. Ергостерол також був переважаючим стеролом, виявленим у пероксисомах, незалежно від середовища, що використовується для індукції цієї органели. У *P. pastoris*, вирощених на олеїновій кислоті, відсоток ергостеролу був дещо вищим як у загальних клітинних екстрактах, так і в пероксисомах, ніж у відповідних фракціях клітин, вирощених на метанолі [25].

1.3. Механізми екскреторної активності клітин дріжджів

Незважаючи на те, що деякі чужорідні білки добре експресуються в культурах *P. pastoris* при вирощуванні у колбах, рівні експресії зазвичай є низькими порівняно з тим, що можна отримати під час культивування в ферментері.

Однією з причин необхідності культивування у ферментері є те, що лише в контрольованому середовищі ферментера можна виростити організм до високої щільності клітин (>100 г/л сухої біомаси або 500 OD600 Од/мл). Особливо для секретованих білків концентрація продукту в середовищі приблизно пропорційна концентрації клітин у культурі [26].

У дріжджах секреторні білки переміщуються до ендоплазматичного ретикулуму (ЕР), де вони згортаються за допомогою шаперонів, потім

переміщуються до системи Гольджі для обробки, а далі назовні через секреторні везикули.

Для посилення вивільнення продукту назовні клітини було доведено, що клітини, сконструйовані для розпушеної клітинної стінки шляхом виключення основного зшиваючого ферменту Gas1 або інших ферментів, що модифікують клітинну стінку.

Одним із найважливіших екскреторних шляхів дріжджових клітин є вакуолярна система. Вакуоля відіграє ключову роль у регуляції іонного та поживного балансу в клітині.

Іншим механізмом екскреторної активності дріжджових клітин є система множинної лікарської стійкості (МЛС). Транспортери МЛС – це мембранні білки, які розпізнають і виводять широкий спектр токсичних сполук, включаючи ліки, барвники та важкі метали.

Дріжджові клітини також мають систему позаклітинних везикул, які беруть участь у виведенні різних речовин, у тому числі білків і ліпідів. Ці везикули, звані екзосомами, утворюються з плазматичної мембрани і містять різноманітний діапазон молекул вантажу [27,28].

1.3.1. Везикулярний механізм екскреції

Є докази того, що Aqr1 постійно циркулює між внутрішніми мембранами та поверхнею клітини. Ці докази пропонують дві можливі моделі функції Aqr1.

Перша модель функції демонструє, що Aqr1 буде активним на плазматичній мембрані як обмінник амінокислот/ H^+ . Його постійний цикл між плазмою та внутрішніми мембранами може забезпечити засіб контролю його активності.

У другій моделі показано, що Aqr1 природним чином присутній у мембрані внутрішньоклітинних везикул і діятиме головним чином як

амінокислота/ H^+ антипортер для завантаження цих везикул амінокислотами, присутніми у відносно високій концентрації в цитозолі.

Потім амінокислоти виділяються в зовнішнє середовище шляхом екзоцитозу. Білок Aqr1, який досяг плазматичної мембрани через екзоцитоз, потім швидко інтерналізуватиметься назад у внутрішні везикули, і це вимагатиме попереднього повсюдного поширення транспортера, як показано для ендоцитозу багатьох білків плазматичної мембрани.

На підтримку цієї моделі ми виявили, що накопичення Aqr1 на поверхні клітини за допомогою мутації *pr1/rsp5* також знижує здатність клітин опосередковувати Aqr1-залежну екскрецію амінокислот. Таким чином, ця друга модель передбачає, що екзоцитоз буде основним механізмом, за допомогою якого амінокислоти виділяються в дріжджах.

Подібна модель нещодавно була запропонована для транспорту ауксину в рослинах. Таким чином, у дріжджах об'ємна екскреція кількох сполук, присутніх у надлишковій концентрації в цитозолі (наприклад, первинних і вторинних метаболітів, іонів тощо), може бути принаймні частково опосередкована узгодженою дією везикулярних H^+ -антипортерів і екзоцитозу [29].

1.3.2. Вакуолярний механізм

Повідомлялося, що АТФ-залежний відтік глутамату або аспартату був дефіцитним у везикулах клітин *avt6Δ5*, і ми спостерігали, що відтік глутамату був нормальним у везикулах з клітин *avt3Δ*, *avt4Δ* та *avt3Δavt4Δ*.

Avt3p і *Avt4p* є вакуолярними експортерами амінокислот для різноманітних амінокислот, за винятком глутамату та аспартату. Обидва, ймовірно, є симпортерами протонів/амінокислот, оскільки АТФ-залежна діяльність інгібується конканаміцином А. *Avt4p*, але не *Avt3p*, ймовірно, бере участь у транспортуванні основних амінокислот із вакуолей.

Нещодавні аналізи структурно-функціональних зв'язків транспортерів виявили функціональну важливість збережених заряджених амінокислотних залишків у трансмембранних доменах. Збережений залишок глутамату в передбачених шостих трансмембранних спіралях є важливим для виведення амінокислот із вакуолей.

Висока активність поглинання основних амінокислот, що працюють в умовах, багатих поживними речовинами, може перевищити зміну активності вакуолярної екструзії в результаті порушення AVT4. Крім того, дуже ймовірно, що активність Avt4p регулюється в залежності від умов харчування. Було припущено, що транскрипція гена AVT4 індукується при азотному голодуванні.

Комплексна ідентифікація вакуолярних транспортерів амінокислот і дослідження їхньої субстратної специфічності та регуляції важливі для розуміння значення компартменталізації вакуолярних амінокислот в еукаріотичних клітинах.

Ці результати свідчать про те, що Avt4p бере участь у вакуолярному транспорті різних амінокислот, опосередковуючи експорт основних амінокислот, а також інших нейтральних [30].

1.3.3. Механізм множинної лікарської стійкості дріжджів

МЛС базується на системі мембранно-асоційованих білків-транспортерів багатьох лікарських засобів, які функціонують як ефлюксні насоси, і факторів транскрипції, які регулюють експресію цих білків.

Білки-транспортери МЛС можна розділити на дві суперродини: ABC (АТФ-зв'язуюча касета) і ОФС (основна фасилітаторна суперродина). Гени ATR1 і FLR1 кодують білки, що належать до суперродини основних фасилітаторів МЛС, тоді як ген YAP1 кодує транскрипційний фактор bzip (застібка лейцину в базовій області), що належить до сімейства AP-1, і

відіграє важливу роль у множинній резистентності та реакції на окислювальний стрес *S. cerevisiae*.

Вважається, що Atr1p є високогідрофобним мембранним білком з декількома мембранними областями. Він бере участь у виведенні 3-АТА з клітини. ATR1 є цільовим геном для факторів транскрипції Yap1p і Gcn4p. Як і очіувалося, трансформант А продемонстрував підвищену резистентність до 3-АТА та 4-NQO [31].

1.4. Фактори регуляції екскреторної активності

Повідомлялося, що виведення спермідину може каталізуватися переносником кількох лікарських засобів *Bacillus subtilis* (Blt). Таким чином, припустили, що транспортер поліаміну в дріжджах може мати певну подібність послідовності до Blt, і шукали такі амінокислотні послідовності в білках, кодованих дріжджовим геномом.

У результаті досліджень було ідентифіковано чотири гени, які кодують поліамінні транспортні білки від TPO1 до TPO4. При експресії з хромосом ці білки розташовувалися на плазматичній мембрані. При експресії з мультикопійного вектора ці білки були в основному розташовані на плазматичній мембрані, але з деякою локалізацією на вакуолярній мембрані.

TPO1 складається з 586 амінокислотних залишків і має 12 передбачуваних трансмембранних сегментів. Транспортування поліаміну TPO1 залежало від рН. Поглинання поліамінів відбувалося при рН 8,0, тоді як виведення поліамінів відбувалося при рН 5,0. Оскільки дріжджові клітини зазвичай ростуть при кислому рН, TPO1 функціонує як білок екскреції для поліамінів.

Серед чотирьох транспортерів поліамінів ті, що кодуються TPO2 і TPO3, були специфічними для сперміну, тоді як ті, що кодуються TPO1 і TPO4, розпізнавали путрезин, спермідин і спермін.

Крім того, сортування білка TPO1 до плазматичної мембрани було посилено фосфорилюванням Ser342 цАМФ-залежними протеїнкіназами 1 і 2. Таким чином, як поглинання, так і виведення поліамінів TPO1 регулюються фосфорилюванням і дефосфорилюванням.

Також до регуляції екскреторної активності можна віднести вплив температури. Нездатність виявити індуковані рівні амілолітичної активності в середовищі культур, вирощених при 37°C, частково пов'язана з термічною інактивацією та інактивацією внаслідок струшування. Ці два сприяючі фактори не залежать від клітини, виключаючи асоційований з клітиною інгібітор, який індукується термічно.

Але частину невдачі слід приписати подіям перед появою позаклітинної амілолітичної активності. Є багато очевидних подій, які можуть відбутися до цього часу: екскреція (з периплазми в середовище), секреція (з цитоплазми в периплазму), активація ферментів, процесинг, індукція та синтез (включаючи транскрипцію та трансляцію генів амілази).

Термочутливість будь-якої з цих подій може призвести до термочутливості появи амілолітичної активності в культуральному середовищі. Тим не менш, дані спостереження можуть бути корисними для вивчення механізму та регуляції процесу виділення на молекулярному рівні.

Процеси розвитку є більш термочутливими, ніж події в мітотичному клітинному циклі багатьох грибкових систем. Термочутливість появи амілолітичної активності під час стаціонарної фази може відобразити потребу в подіях розвитку, які, загалом, є більш термочутливими, ніж події мітотичного клітинного циклу [32].

1.5. Що відомо про секретом *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia pastoris*?

Значна частина клітинного протеому визначається як секретом, який, зрештою, включає всі секретовані білки, або закріплені на поверхні клітини, або в позаклітинному середовищі, і білки, залучені в секреторний шлях. Секретовані білки як в еукаріотичних, так і в прокаріотичних клітинах виконують широкий спектр біологічних функцій, необхідних клітинам для виживання або адаптації до змін навколишнього середовища. Ці білки беруть участь у формуванні клітинної стінки, молекулярному обміні, поглинанні поживних речовин, патогенності та захисті від конкуруючих видів [33].

Рекомбінантний білок або виробляється в цитозолі, або секретується в супернатант культури, коли відповідний сигнал секреції зливається з 5'-кінцем цікавого гена. Найбільш широко використовуваним сигналом секреції є сигнал фактора спаровування α (MF α) *S. cerevisiae*, який, як було показано, є більш ефективним, ніж нативна лідерна послідовність кислої фосфатази *P. pastoris*.

У більшості випадків секреторне виробництво рекомбінантних білків є кращим, оскільки воно в більшості випадків призводить до середніх або високих концентрацій цілком чистого продукту в супернатанті культури. У цьому відношенні було показано, що *P. pastoris* секретує лише низькі рівні ендогенних білків (наприклад, 20–40 білків), зокрема, при культивуванні у відповідних умовах біореактора.

Поки клітини є життєздатними та неушкодженими, протеолітична активність супернатанту зазвичай низька, що добре корелює з низькою кількістю протеаз, виявлених у супернатантах культури під час досліджень секретомів [33,34].

1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae є добре вивченим модельним організмом, який використовується для виробництва різноманітних білків та інших сполук. Секреційний шлях у *S. cerevisiae* включає ендоплазматичний ретикулум (ЕР), апарат Гольджі та плазматичну мембрану. Білки синтезуються на рибосомах і транслокуються в ЕР, де вони згортаються і модифікуються. З ЕР білки транспортуються до апарату Гольджі, де вони далі обробляються та сортуються. Завершальним етапом, білки транспортуються до плазматичної мембрани і секретуються в позаклітинний простір.

Шлях секреції *S. cerevisiae* був детально вивчений, і було ідентифіковано багато генів і білків, залучених до цього процесу. Наприклад, шляхи Sec і SRP (частинки розпізнавання сигналу) важливі для транслокації білків у ЕР, тоді як локалізовані за Гольджі комплекси білок повторної збірки Гольджі і консервовані олігомерний Гольджі комплекси беруть участь в організації Гольджі та транспорті везикул [34].

1.5.2. *Pichia pastoris*

Метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris* успішно використовувалися для виробництва різних рекомбінантних гетерологічних білків людського, тваринного, рослинного, грибового, бактеріального та вірусного походження. Експресовані білки можуть вироблятися або внутрішньоклітинно, або позаклітинно, секреція рекомбінантних білків у *P. pastoris* має кілька переваг перед бактеріальними системами експресії.

Переваги включають шлях згортання, який дозволяє утворювати дисульфідні зв'язки, і посттрансляційні модифікації, які роблять білок здатним виконувати призначену функцію. Секреція рекомбінантних білків також обходить їх внутрішньоклітинне накопичення, важливе для токсичних білків. Важливо те, що секреція рекомбінантних білків спрощує їх очищення, уникаючи забруднення внутрішньоклітинними білками.

S. cerevisiae та *P. pastoris* мають чітко визначений шлях секреції, який включає ER, апарат Гольджі та плазматичну мембрану. Проте *P. pastoris* має деякі унікальні особливості, які роблять його особливо корисним для виробництва білка. Наприклад, *P. pastoris* може секретувати велику кількість гетерологічних білків у позаклітинний простір і має більш ефективну систему згортання та секреції білка, ніж *S. cerevisiae*.

У *P. pastoris* було ідентифіковано багато генів і білків, які беруть участь у процесі секреції. Наприклад, білкова дисульфідна ізомераза Pdi1p важлива для згортання білка в ER, тоді як локалізований у Гольджі білок Kre2p бере участь у глікозилюванні та сортуванні білків [34].

1.6. Методи дослідження секретому

Секретом — це повний набір білків, що виділяються клітиною або організмом, і він відіграє важливу роль у міжклітинному спілкуванні та передачі сигналів. Дослідження секретому спрямоване на ідентифікацію та характеристику білків, які секретуються клітинами або організмами, а також шляхів і механізмів, які регулюють їх секрецію.

Дослідження секретованих білків може бути проведено за допомогою репрезентативної колекції білків із позаклітинного матриксу та аналізу їх за допомогою мас-спектрометрії.

Альтернативним методом ідентифікації секретованих білків є сканування геному на наявність передбачуваних N-кінцевих пептидів, пов'язаних з ORF [33].

1.6.1. Серійний аналіз експресії генів

Серійний аналіз експресії генів — це техніка, яка вимірює глобальні моделі експресії генів. Це метод, заснований на послідовності, і для ідентифікації гена використовується коротка (9–10 bp) мітка. Зв'язування (конкатенація) цих коротких послідовностей підвищує ефективність ідентифікації невідомих транскриптів серійним способом.

У цьому методі спочатку із вхідного зразка виділяється РНК, а потім перетворюється на дволанцюгову кДНК за допомогою біотинільованих оліго(dT) праймерів. кДНК розщеплюється ферментом, що закріплює, а потім зв'язується з кульками стрептавідину. Реакційну суміш ділять навпіл і лінкери лігують. Потім він розщеплюється за допомогою міченого ферменту, утворюючи тупі кінці. Його знову лігують і ампліфікують за допомогою специфічних праймерів. Це розщеплюється за допомогою закріплюючого ферменту, і дітеги виділяються. Нарешті ці теги об'єднуються з подальшим клонуванням. Потім ці теги секвенуються за допомогою високопродуктивних секвенсорів [35,36].

1.6.2. Використання ДНК мікрочіпів

Мікрочіп ДНК використовується для вимірювання диференціальної експресії генів у різних тканинах, у нормальних і хворих станах, під час розвитку та/або за різних умов. Мікрочіпи можуть бути двох типів: олігонуклеотидні масиви (GeneChips) і масиви кДНК (плямисті масиви). У масивах олігонуклеотидів (Affymetrix, Nimblegen) олігонуклеотиди/зонди (~25 bp) синтезуються безпосередньо на чіпі у високій щільності. На ці масиви наносять мічені молекули РНК. Якщо відбувається гібридизація, генерується флуоресцентний сигнал.

Один із методів виявлення кольорів використовується для вимірювання експресії генів за допомогою цих масивів. У плямистому масиві кДНК-зонди синтезуються, а потім наносяться на предметні скла. Молекули РНК, помічені Cy3 і Cy5, гібридизуються в масив. Використовується двоколірний метод виявлення та вимірюється експресія генів. Мікрочіп ДНК також використовувався в дослідженнях секретома.

Нещодавно мікроматриці та біоінформатика були застосовані в сальниковій та підшкірній жировій тканині людини для ідентифікації секреторних білків [35,37].

1.6.3. Мас-спектрометрія

Тандемна мас-спектрометрія рідинної хроматографії (PX-МС/МС) — це аналітичний метод, у якому білки спочатку розділяються за допомогою рідинної хроматографії та виявляються за допомогою тандемної мас-спектрометрії на основі співвідношення маси до заряду. Існує два методи ідентифікації секреторних білків: методи на основі гелю та геленезалежні методи.

Гелеві методи включають двовимірний гель-електрофорез (2DE) і диференціальний гель-електрофорез, за яким слідує мас-спектрометрія.

PX-МС/МС використовували для ідентифікації секретомів у різних типах клітин. Одновимірний SDS-PAGE з подальшим PX-МС/МС є найбільш широко використовуваною технологією для ідентифікації клітинних секретомів у різних типах клітин як рослин, так і ссавців. Секретом жирових стовбурових клітин, індукований TNF α , був з'ясований за допомогою протеомічного підходу. Секреторні білки скелетних м'язів, стимульовані інсуліном, також були ідентифіковані за допомогою PX-МС/МС [35,38].

1.6.4. Секвенування РНК

Секвенування РНК є високопродуктивним методом для аналізу профілів транскриптомів організму. Комплементарна ДНК (кДНК) виготовляється з мРНК, фрагментується та виконується секвенування за допомогою різних технологій. Після того, як зчитування отримані, вони вирівнюються з еталонним геномом або збираються заново, і генерується карта транскриптому.

Зчитування може бути одностороннім або парним. Зазвичай можна отримати зчитування 30–400 bp. За допомогою цього методу можна отримати роздільну здатність однієї основи, і для цього потрібна дуже мала кількість РНК. Фонівий шум також дуже низький порівняно з

іншими методами, такими як мікрочіп ДНК. Секвенування РНК є дуже потужним інструментом для кількісного визначення мРНК, картографування сайту початку транскрипції, аналізу моделей сплайсингу і вимірювання змін експресії генів під час розвитку та за різних умов.

Секвенування РНК також можна застосувати для визначення профілю секретому певного типу клітин організму [35,39].

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Загальна схема експерименту

Об'єктом дослідження були дріжджі роду *Pichia*, отримані в R&D лабораторії ПрАТ “Компанії Ензим”. Цвіль яка була використана для визначення активності кілерних сполук, отримана з дріжджових брусків в R&D лабораторії ПрАТ “Компанії Ензим”. Загальна схема експерименту представлена нижче (рис.1):

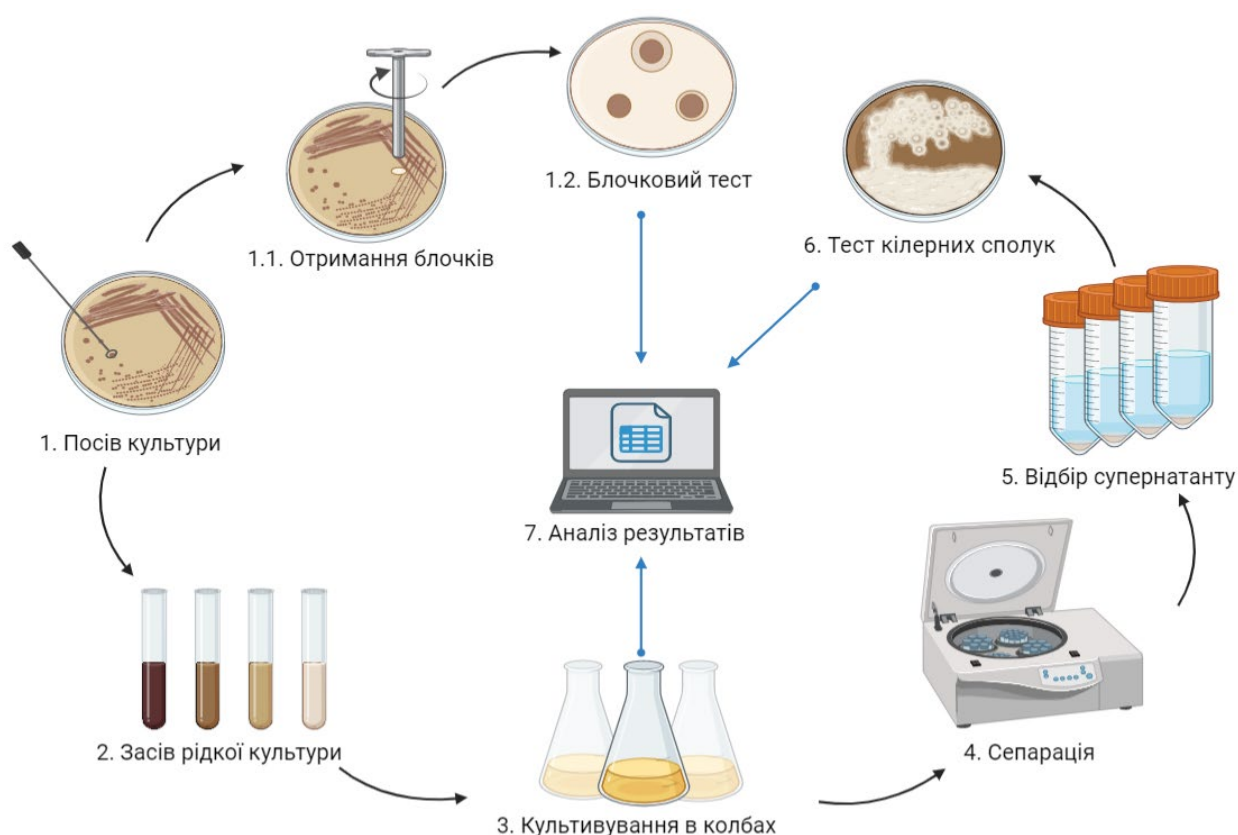


Рис. 1. Загальна схема експерименту

Загальна схема показує хід експерименту, який був зроблений мінімум в 2 повторах для кожного середовища та були взяті середні значення. Загалом метою експерименту було визначити кілерні властивості дріжджів роду *Pichia* та підібрати оптимальні умови росту даних дріжджів на різних поживних середовищах.

2.2. Приготування поживного середовища

Для приготування поживних середовищ використовували такі засоби та обладнання: дозатори, мірні циліндри, звичайні та аналітичні ваги, рН метр. Всі середовища готували згідно рецептур (таблиця 1) та розливали їх по 100 мл в колби об'ємом 500 мл. Стерилізацію поживних середовищ проводили у автоклаві при температурі 121 °С, тиску 1 бар протягом 30 хв.

2.3. Перевірка кілерної активності

2.3.1. Блочковий тест під час росту культури

Кілерну активність досліджували модифікованим методом як описано [40].

Визначення кілерної активності проводили методом агарових блоків. На чашку Петрі виливали тонкий шар 2 % агаризованого середовища. Окремо у пробірці готували м'який агар (0,7 %). Для цього змішали 5 мл середовища 1,4 % та 5 мл суспензії тест-культури цвілі, перемішали та одразу вилили на шар агару на чашці Петрі. З попередньо засіяних "газоном" чашок вирізали агарові блоки (діаметром 10 мм) та стерильно переносили на поверхню м'якого агару. Чашки культивували у термостаті при 30 °С, після чого вимірювали зону пригнічення росту. Спостереження проводили в кінці 2-го та 3-го днів. Оцінювали зону пригнічення навколо блоків досліджуваних штамів.

2.3.2. Тест активності кілерних сполук в супернатанті

Активність досліджували модифікованим методом як описано [40].

На чашку Петрі виливали тонкий шар 2 % агаризованого середовища. Окремо у пробірці готували м'який агар (0,7 %). Для цього змішали 5 мл середовища 1,4 % та 5 мл суспензії тест-культури цвілі, перемішали та одразу вилили на шар агару на чашці Петрі. Надосадову рідину після культивування дріжджів (супернатант) наносили на поверхню агару в об'ємі 2 мл суспензії та інкубували у термостаті при температурі

(30 °C). Спостереження проводили в кінці 1-го, 2-го та 3-го днів. Оцінювали можливість пригнічення росту цвілі (мм) супернатантом після культивування дріжджів.

2.4. Культивування та підбір оптимального середовища

2.4.1. Посів культури “газоном”

Посів “газоном” використовували для пересіву культури для зберігання та для методу агарових блоків. Для цього з однієї чашки Петрі металевою петлею відбирали частину культури і рівномірно розподіляли на поверхні агаризованого середовища іншої чашки. При культивуванні культура росла рівномірно.

2.4.2. Посів виснажуючим штрихом

Використовували для пересіву культури, щоб отримати окремі колонії, які використовували для засіву у пробірки. Металевою петлею відбирали невелику частину культури з однієї чашки і робили кілька паралельних штрихів в одному секторі чашки. Тоді петлю профламбовували і чашку повертали на кілька градусів і з розподіляли культуру з попередньої зони, роблячи кілька штрихів. Цю дію повторювали кілька разів. Таким чином, при культивуванні в останньому секторі утворюються ізольовані колонії.

2.4.3. Посів рідкої культури в пробірку

З чашки Петрі металевою петлею частину культури або спор перенесли у пробірки з рідким середовищем (4 мл) та інкубували у шейкері (Orbital Shaker-Incubator ES-20) при 25 °C та перемішуванні 200 rpm протягом 1-2 днів. Дана культура слугувала як засівний матеріал для наступних вирощувань у колбах.

2.4.4. Посів рідкої культури в колби

З пробірки брали частину культури (1 OD) та переносили у колби з рідким середовищем (100 мл) та культивували у шейкері (New Brunswick

Innova 44 Inc Shaker) при 25 °C та перемішуванні 200 грт протягом 3-5 днів. Рідка культура використовувалась для отримання супернатанту для подальшої перевірки кілерних властивостей.

Для вибору найбільш оптимального середовища для культивування з розрахунку отримання продукту готували 13 різних за складом середовищ (таблиця 1).

Таблиця 1. Склад поживних середовищ

№	Назва	Склад
1	Меясне 5%*	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%; MgSO_4 0,07%; ZnSO_4 0,02%; CuSO_4 0,003%.
2	Меясне 5% (-солі)	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%.
3	Меясне 5% + FeSO_4	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%; MgSO_4 0,07%; ZnSO_4 0,02%; CuSO_4 0,003%; + FeSO_4 0,5%.
4	Меясне 5% + NaCl	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%; MgSO_4 0,07%; ZnSO_4 0,02%; CuSO_4 0,003%; + NaCl 0,5%.
5	Меясне 5% + K_2HPO_4	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%; MgSO_4 0,07%; ZnSO_4 0,02%; CuSO_4 0,003%; + K_2HPO_4 0,5%.
6	Меясне 5% (-солі) + FeSO_4	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%; + FeSO_4 0,5%.
7	Меясне 5% (-солі) + NaCl	Меяса 15%; Аміачна вода 0,6%; H_3PO_4 0,14%; HNO_3 0,54%; піногасник 0,009%;

		+ NaCl 0,5%.
8	Мелясне 5% (-солі) + K₂HPO₄	Меляса 15%; Аміачна вода 0,6%; H ₃ PO ₄ 0,14%; HNO ₃ 0,54%; піногасник 0,009%; + K₂HPO₄ 0,5% .
9	Мелясне 5% + FeSO₄ + NaCl + K₂HPO₄	Меляса 15%; Аміачна вода 0,6%; H ₃ PO ₄ 0,14%; HNO ₃ 0,54%; піногасник 0,009%; MgSO ₄ 0,07%; ZnSO ₄ 0,02%; CuSO ₄ 0,003%; + FeSO₄ 0,5% + NaCl 0,5% + K₂HPO₄ 0,5% .
10	Мелясне 5% (-солі) + FeSO₄ + NaCl + K₂HPO₄	Меляса 15%; Аміачна вода 0,6%; H ₃ PO ₄ 0,14%; HNO ₃ 0,54%; піногасник 0,009%; + FeSO₄ 0,5% + NaCl 0,5% + K₂HPO₄ 0,5% .
11	Fermentation broth	Дріжджовий екстракт 1%; пептон 2%; глюкоза 2%; NaCl 2%; гліцерол 15%.
12	YPS рідке	Пептон 1,5%; сахароза 2%; дріжджовий екстракт 1%.
13	YPD рідке	Пептон 1,5%; глюкоза 2%; дріжджовий екстракт 1%.

*Мелясне 5% – відсоток цукру в середовищі.

**У всіх середовищах значення рН доводили до 4,5 за допомогою H₂SO₄ або KOH.

2.4.5. Вимірювання оптичної щільності

Для контролю біомаси під час культивування дріжджів використовували метод вимірювання оптичної щільності OD (optical density). Для цього в стерильних умовах відбирали зразок культуральної рідини в об'ємі 50 мкл у кювети кожного дня, додавали дистильовану воду 950 мкл, що в свою чергу дає розведення в 20 разів вимірюваного зразка. Вимірювання проводили на спектрофотометрі (Thermo Fisher Scientific) при довжині хвилі 600 нм. Зразком для занулення було відповідне поживне середовище, яке відбиралося у пластикову пробірку перед засівом колби.

2.4.6. Сепарація дріжджів від середовища

Після 3-х та 5-ти денного культивування культуральну рідину з біомасою дріжджів центрифугували 15 хвилин при 4500 об/хв. Отриманий

супернатант зливали в стерильні ємності на 50 мл для подальшого використання.

2.5. Статистична обробка даних

Експерименти проведені мінімум два рази з двома повторами для кожного експериментального варіанта. Представлені дані є середніми значеннями. Для статистичної обробки результатів досліджень використовували непараметричні методи варіаційної статистики.

Для характеристики отриманих вибірок використовували середнє, стандартне відхилення, стандартну помилку середнього, обсяг вибірки. Статистичну достовірність відмінностей між двома групами даних оцінювали за допомогою t-критерій Стьюдента (для малих і середніх вибірок, $n \leq 30$) за допомогою програмного пакету Microsoft Office Excel 2010.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення оптимальної тривалості вирощування *Pichia*

Протягом всіх досліджень проводився контроль оптичної щільності культур на різних середовищах, результати були усереднені та продемонстровані на графіку (рис. 2).

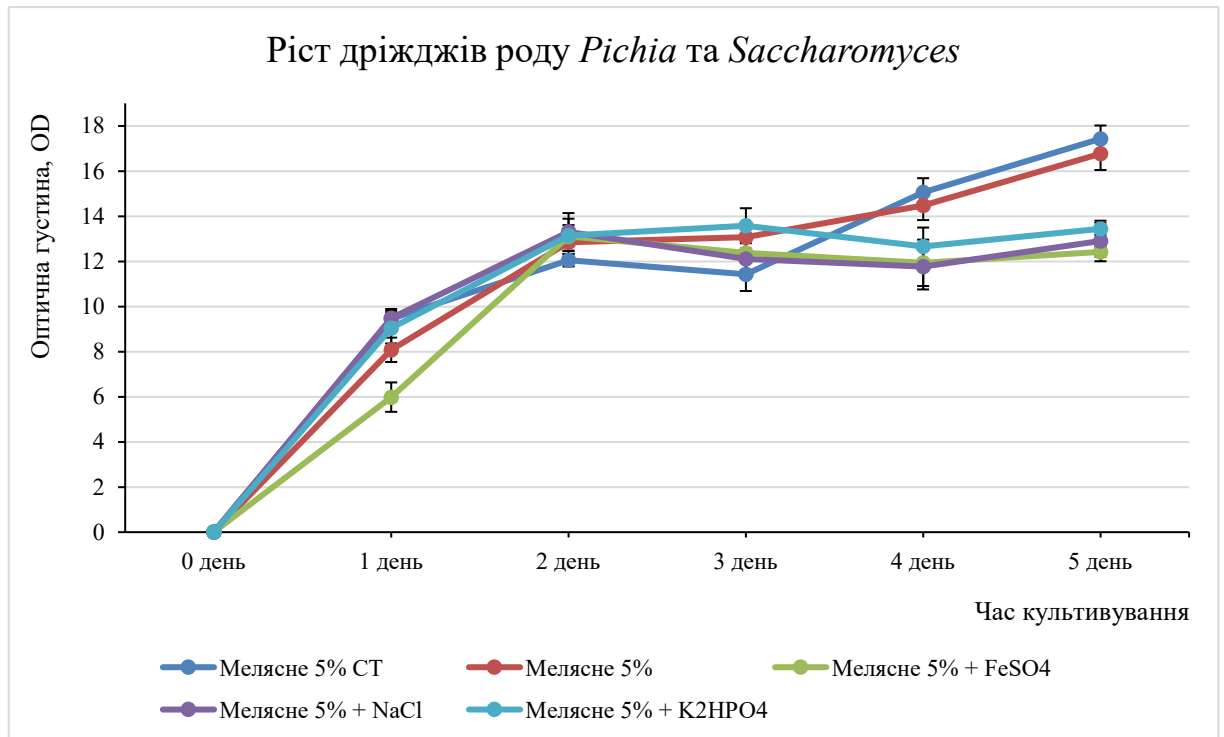


Рис. 2. Оптична щільність суспензії дріжджів роду *Pichia* та *Saccharomyces* (СТ) на різних поживних середовищах з 1-го по 5-й день культивування. Представлені середні значення з 4-х аналітичних повторностей.

На основі даного графіку видно, що обидва штами дріжджів мають однаковий початковий ріст. *Pichia* демонструє вихід на стаціонарну фазу росту культури на третій день культивування дріжджів. Для порівняння було взято хлібопекарський штам дріжджів (СТ), який показав трохи більший час росту.

Виходячи з інформації, яка описана в науковій літературі щодо отримання кілерних сполук, термін культивування три дні є

найоптимальнішим і це підтверджується отриманими результатами. Тому наступні експерименти були поставлені з тривалістю три дні.

3.2. Вплив солей Fe, Na та K на швидкість росту культури

Культивування дріжджів роду *Pichia* на мелясному середовищі з додаванням солей FeSO₄, NaCl та K₂HPO₄ протягом трьох днів впливає на швидкість росту культури (рис. 3. та 4).

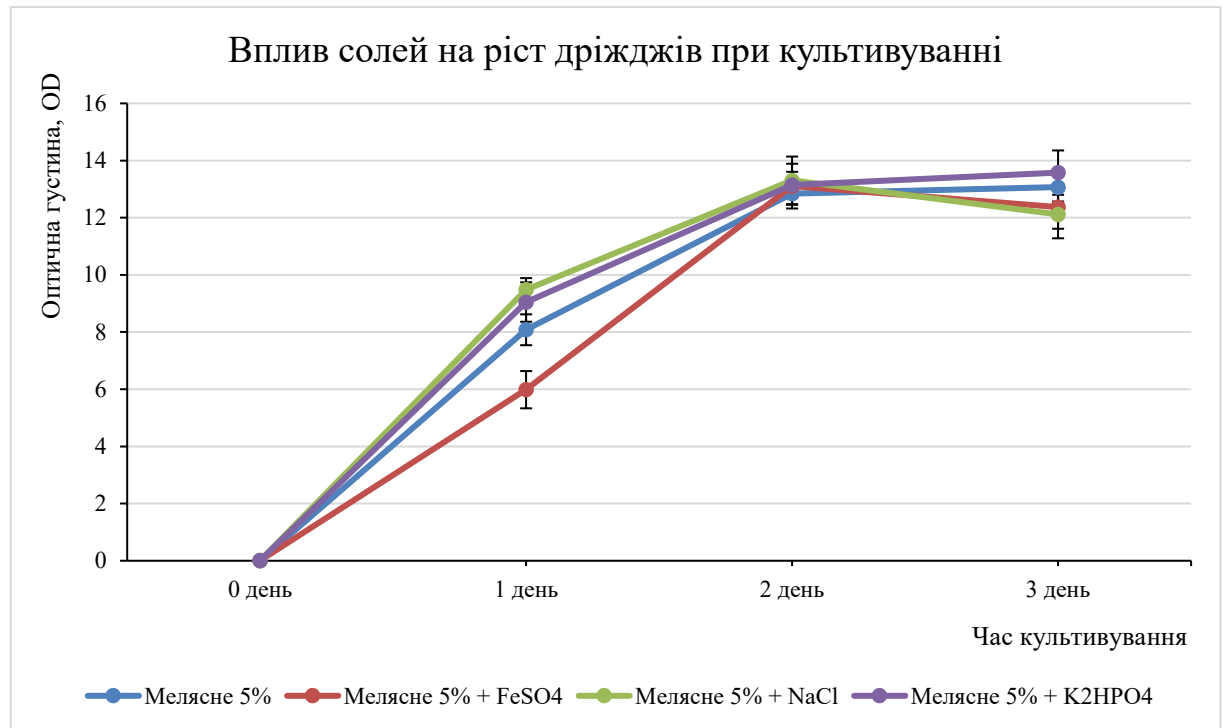


Рис. 3. Вплив додавання FeSO₄, NaCl та K₂HPO₄ в мелясне середовище (з солями)

Швидкість росту на перший день була вищою при додаванні NaCl та K₂HPO₄ по показниках OD 9,48 та 9,05 відповідно в порівнянні з мелясним 5% де показник OD був 8,08. На другий день результати накопиченої біомаси майже вирівнялися і становили приблизно 13 OD. На третій день можна виділити найкраще середовище з додаванням K₂HPO₄ показник OD був 13,57.

З метою дослідження впливу окремих солей FeSO_4 , NaCl та K_2HPO_4 на ріст дріжджів роду *Pichia*, додавали їх в мелясне 5% (-солі) середовище, результати показані на (рис. 4.).

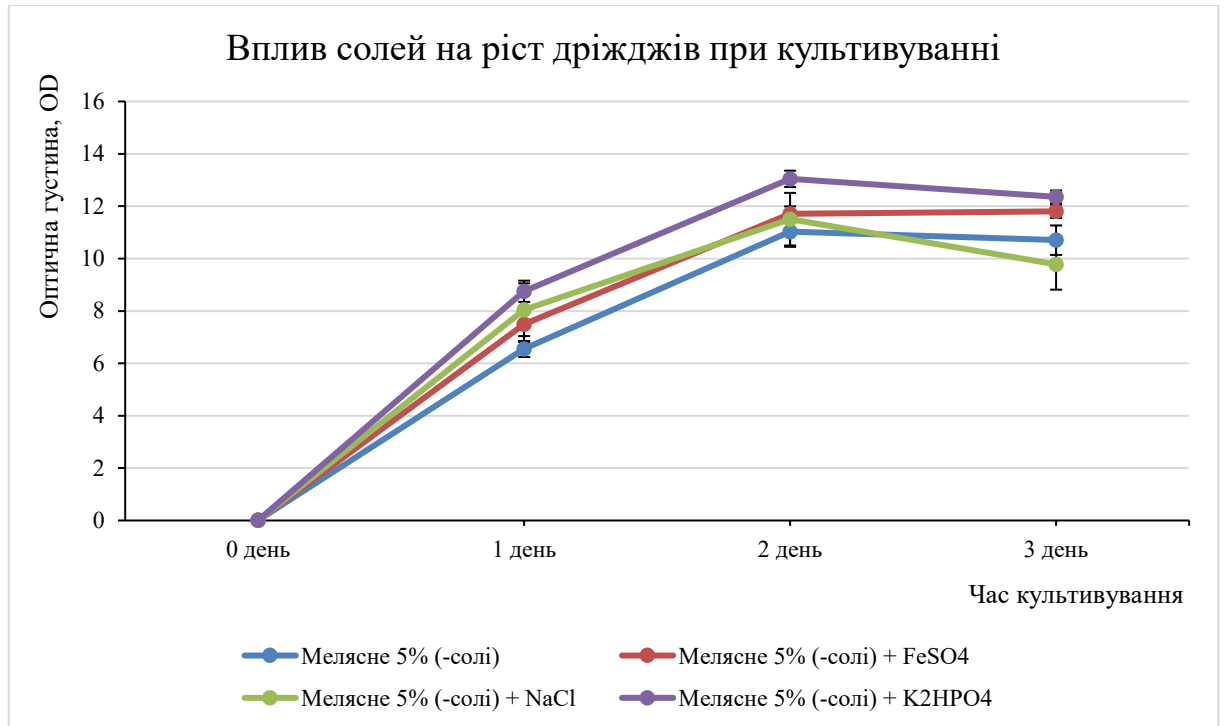


Рис. 4. Вплив додавання FeSO_4 , NaCl та K_2HPO_4 в середовище яке не містить стандартного набору солей

Швидкість росту на перший день була вищою при додаванні K_2HPO_4 та NaCl по показниках OD 8,75 та 8,04 відповідно в порівнянні з мелясним 5% де солі були взагалі відсутні показник OD був 6,54. На третій день можна виділити найкраще середовище з додаванням K_2HPO_4 показник OD був 12,35.

Таким чином, виходячи з отриманих даних цього експерименту ми бачимо, що додавання солі K_2HPO_4 до поживного мелясного середовища з солями та без, дає покращення у накопиченні біомаси мікроорганізму на третій день культивування на 4 % та 15 % відповідно порівнюючи з контролем. Різниця в показниках на третій день пояснюється тим, що в середовищі з солями наявні додаткові мікроелементи.

Додавання FeSO_4 не призвело до позитивних результатів, можна зробити припущення, що солі Fe не засвоюються мікроорганізмами в чистому вигляді та не є біодоступним для дріжджів.

3.3. Оптимізація стандартного середовища для культивування хлібопекарських дріжджів під вирощування *Pichia*

Отримані результати з вирощування на покращеному середовищі, яке містило суміш солей FeSO_4 , NaCl та K_2HPO_4 показані на (рис. 5).

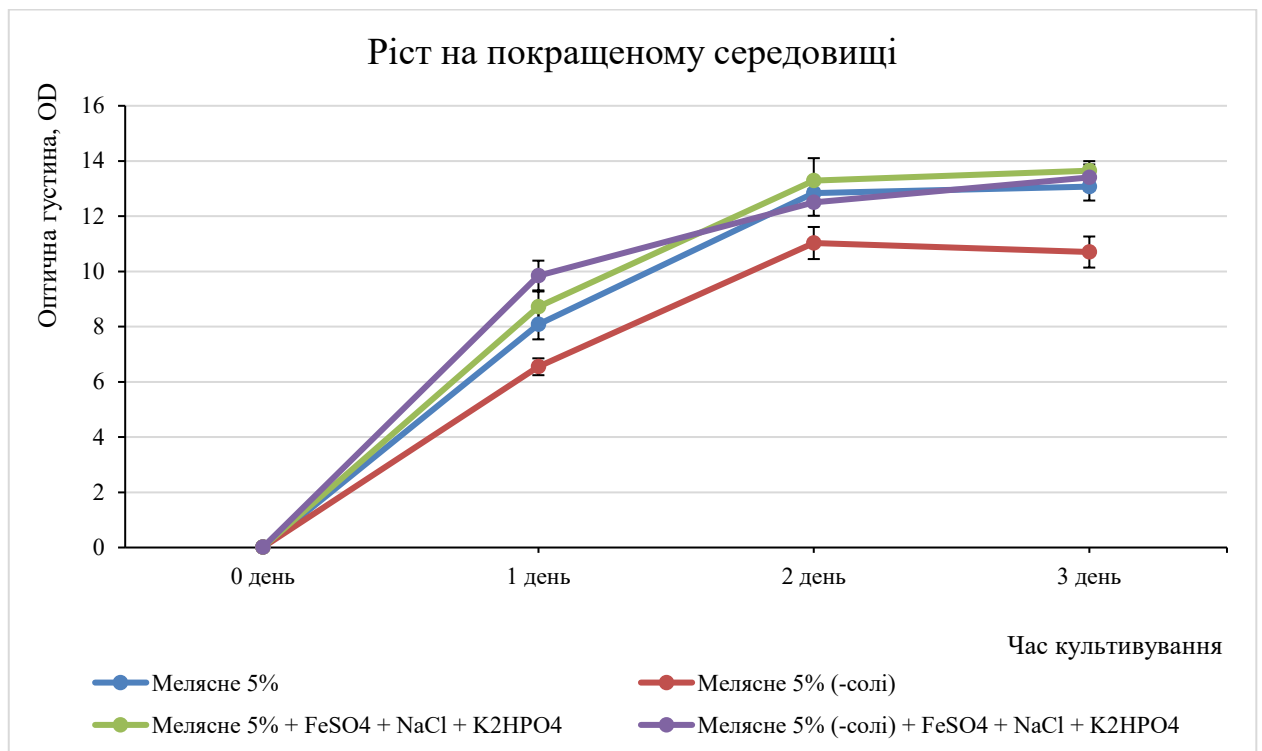


Рис. 5. Ріст на покращеному середовищі

Використання суміші солей, що були в попередньому експерименті дало позитивні результати. Додавання суміші до середовища з солями та до середовища в якому не було інших солей показали подібні значення OD 13,64 та 13,40 відповідно, тоді як звичайне середовище та середовище без солей мали OD 13,07 та 10,70 відповідно.

Середовище яке не мало в складі ніяких солей показало низьке значення OD 10,70 в порівнянні з іншими.

Можна зробити висновки, що використання тільки суміші цих солей (FeSO_4 , NaCl та K_2HPO_4) дає високий показник накопичення біомаси і ним можна замінити звичайний склад мелясного середовища.

3.4. Ріст на багатих поживних середовищах

Під час вирощування дріжджів на багатих поживних середовищах отримали результати, які зображені на графіку (рис. 6).

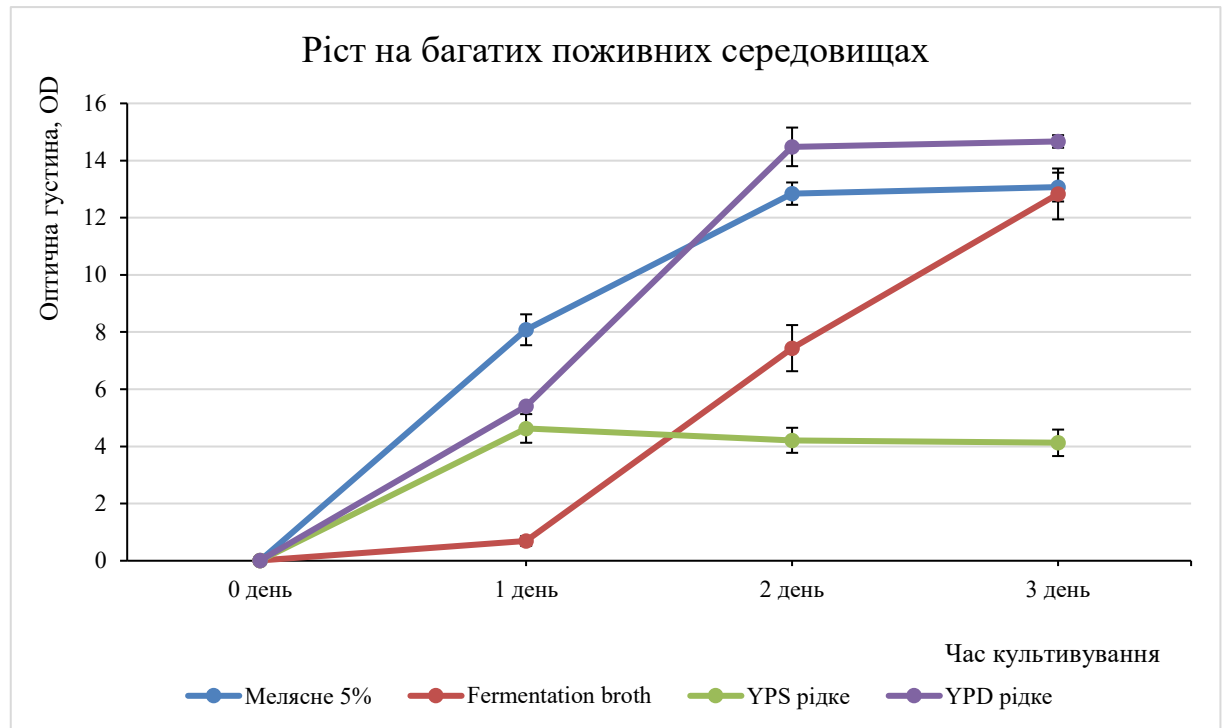


Рис. 6. Вирощування дріжджів роду *Pichia* на багатих органічними компонентами поживних середовищах (YPS та YPD)

З результатів зображених на графіку можна зробити висновок, що від молекулярної складності вуглеводів наявних в поживному середовищі залежить швидкість росту культури мікроорганізмів роду *Pichia*, оскільки середовище YPS, яке містить в складі тільки сахарозу (дисахарид), як джерело вуглеводів дало низький рівень біомаси відповідно до OD 4,12 на третій день культивування. А середовища які містили глюкозу (моносахариди) сприяли швидкому росту дріжджів і більшому накопиченню біомаси про що свідчать покази OD.

3.5. Перевірка дріжджів роду *Pichia* та отриманого супернатанту після їх культивування на предмет пригнічення росту білої цвілі

3.5.1. Перевірка даних дріжджів на предмет пригнічення росту білої цвілі

Проводили блочковий тест для перевірки штаму на предмет пригнічення росту білої цвілі (рис. 7 та 8).

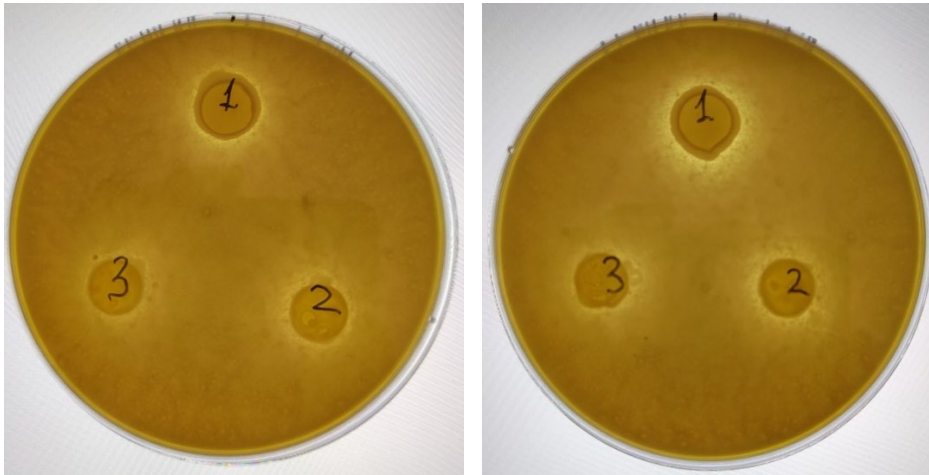


Рис. 7. Блочковий тест другий день: 1 - *Pichia*; 2 - СТ; 3 - К-339. Зліва на зображені перший повтор, справа - другий

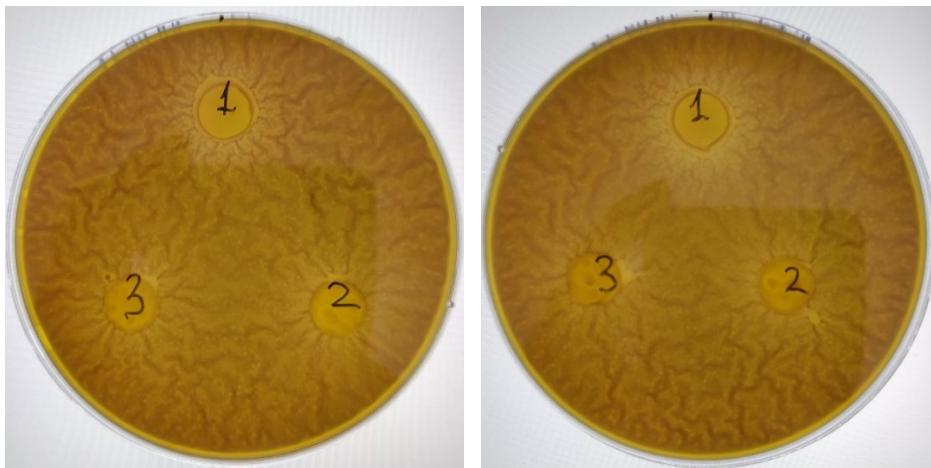


Рис. 8. Блочковий тест третій день: 1 - *Pichia*; 2 - СТ; 3 - К-339. Зліва на зображені перший повтор, справа - другий

Блоки з відповідними штамами дріжджів переносили на агар з білою цвіллю. Протягом трьох днів спостерігали за зоною пригнічення росту

цвілі навколо блоків, за контроль брали два штами хлібопекарських дріжджів (СТ та К-339) як показано на (рис. 7 та 8).

Під кінець експерименту на третій день (рис. 8) спостерігаємо розростання цвілі на чашці, але пригнічення довкола першого бруска залишається. Це свідчить про те, що дріжджі роду *Pichia* виділяють сполуки, які можуть пригнічувати ріст білої цвілі.

3.5.2. Перевірка супернатанту на предмет пригнічення росту білої цвілі

Пригнічення супернатантом проводили схожим методом, але на поверхню чашки наносили 2 мл супернатанту відповідного штаму дріжджів і спостерігали за пригніченням росту. На (рис. 9) показані результати в двох повторях для кожного зразка.

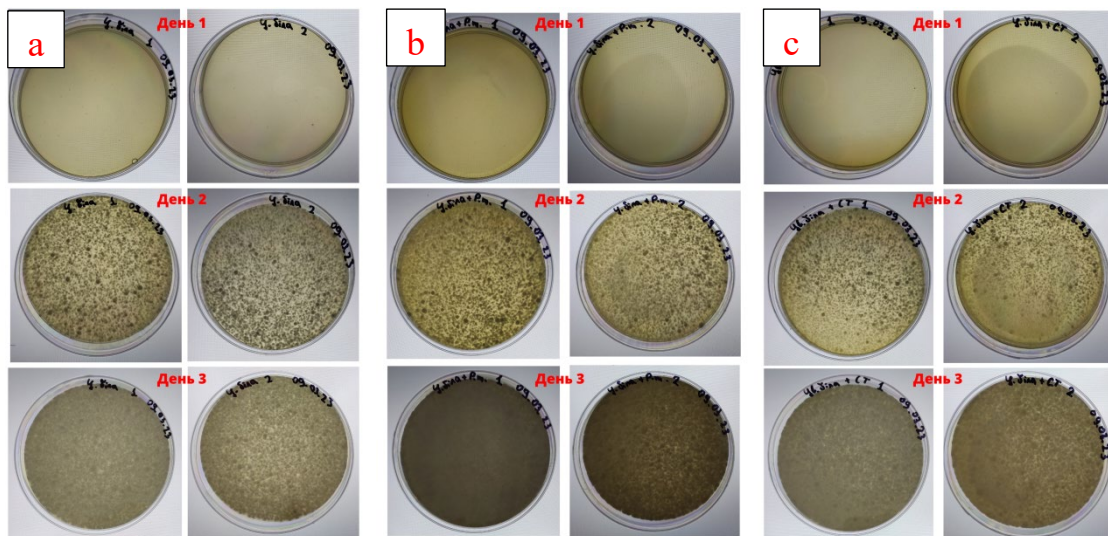


Рис. 9. Тест на пригнічення білої цвілі: а - без додавання супернатанту (контроль); б - додавання супернатанту Піхія; с - додавання супернатанту СТ

Отримані результати показали, що ріст білої цвілі не був пригнічений супернатантом, можна зробити припущення, що концентрація кілерних сполук в досліджуваному розчині була занадто низькою для цього.

ВИСНОВКИ

1. Оптимальним терміном культивування дріжджів роду *Pichia* для синтезу кілерних сполук є три дні, що підтвердило інформацію з літературних джерел.
2. Додавання солі K_2HPO_4 до поживного мелясного середовища, що містить стандартні солі та без їх додавання, дає покращення накопичення біомаси на третій день культивування у першому випадку на 4 %, у другому на 15 %.
3. Суміш солей ($FeSO_4$, $NaCl$ та K_2HPO_4) призвела до незначного підвищення біомаси дріжджів і може виступати альтернативою стандартній суміші солей у мелясному середовищі.
4. Додавання глюкози до середовища культивування призводить до збільшення накопичення біомаси дріжджів роду *Pichia* у 3 рази.
5. Культура дріжджів роду *Pichia* пригнічує ріст досліджуваних цвілевих грибів при вирощуванні на середовищі YPD протягом трьох днів за температури 30 °C.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Buerth, C., Heilmann, C. J., Klis, F. M., de Koster, C. G., Ernst, J. F., & Tielker, D. (2011). Growth-dependent secretome of *Candida utilis*. *Microbiology*, 157(9), 2493–2503.
2. Somers, J. M., & Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetical Research*, 13(01), 71.
3. Buijs, N. A., Siewers, V., & Nielsen, J. (2013). Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3), 480–488.
4. Claypool, S. (2013). The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Frontiers in Bioscience*, 18(1), 241.
5. Karim, A., Gerliani, N., & Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.
6. Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 339–354.
7. Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single Cell Protein—State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8.
8. Giga-Hama Y. 1997. Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: an attractive host for heterologous protein production. In Foreign Gene Expression in Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Giga-Hama Y, Kumagai H (eds). Springer-Verlag: Berlin; , 159
9. Wang, T.-T., Lee, C.-F., & Lee, B. H. (1999). The Molecular Biology of *Schwanniomyces occidentalis* Klocker. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19(2), 113–143.

10. Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437.
11. Van Ooyen, A. J. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M. A., Jacobs, D. I., Colussi, P. A., & Taron, C. H. (2006). Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 6(3), 381–392.
12. Waché, Y., Husson, F., Feron, G., & Belin, J.-M. (2006). Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 405–416.
13. Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J. L., & Barredo, J. L. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), 645–658.
14. Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, G.-Y., Wang, Z.-P., Li, Y., & Chi, Z.-M. (2013). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 222–234.
15. Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2017). The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. *Toxins*, 9(4), 112.
16. Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1822–1832.
17. Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), 77–82.
18. Buzzini, P., Corazzi, L., Turchetti, B., Buratta, M., & Martini, A. (2004). Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238(2), 359–365.

19. Küberl, A., Schneider, J., Thallinger, G. G., Anderl, I., Wibberg, D., Hajek, T., ... Pichler, H. (2011). High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *Journal of Biotechnology*, 154(4), 312–320.
20. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317.
21. Mar González-Barroso, M., Ledesma, A., Lepper, S., Pérez-Magán, E., Zaragoza, P., & Rial, E. (2006). Isolation and bioenergetic characterization of mitochondria from *Pichia pastoris*. *Yeast*, 23(4), 307–313.
22. Wriessnegger, T., Leitner, E., Belegatis, M. R., Ingolic, E., & Daum, G. (2009). Lipid analysis of mitochondrial membranes from the yeast *Pichia pastoris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(3), 166–172.
23. Damasceno, L. M., Huang, C.-J., & Batt, C. A. (2011). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31–39.
24. Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'Connor, J., Williamson, E. K., & Glick, B. S. (1999). Golgi Structure Correlates with Transitional Endoplasmic Reticulum Organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 145(1), 69–81.
25. Wriessnegger, T., Gubitz, G., Leitner, E., Ingolic, E., Cregg, J., Delacruz, B., & Daum, G. (2007). Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(4), 455–461.
26. Higgins, D. R., & Cregg, J. M. (n.d.). Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia Protocols*, 1–16.

27. Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2013). The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 872–914.
28. Li, C., Lin, Y., Zheng, X., Pang, N., Liao, X., Liu, X., ... Liang, S. (2015). Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology*, 15(1).
29. Velasco, I., Tenreiro, S., Calderon, I. L., & André, B. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Aqr1 Is an Internal-Membrane Transporter Involved in Excretion of Amino Acids. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1492–1503.
30. Sekito, T., Chardwiriyaapreecha, S., Sugimoto, N., Ishimoto, M., Kawano-Kawada, M., & Kakinuma, Y. (2014). Vacuolar transporter Avt4 is involved in excretion of basic amino acids from the vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(6), 969–975.
31. Alriksson, B., Horváth, I. S., & Jönsson, L. J. (2010). Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry*, 45(2), 264–271.
32. Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 506–512.
33. Huang, C.-J., Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Zhang, S., Old, L. J., & Batt, C. A. (2011). A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 235–247.
34. Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*.

35. Mukherjee, P., & Mani, S. (2013). Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(11), 2226–2232.
36. Cao, D., Polyak, K., Halushka, M. K., Nassar, H., Kouprina, N., Iacobuzio-Donahue, C., ... Argani, P. (2008). Serial analysis of gene expression of lobular carcinoma in situ identifies down regulation of claudin 4 and over expression of matrix metalloproteinase 9. *Breast Cancer Research*, 10(5).
37. Hoggard, N., Cruickshank, M., Moar, K.-M., Bashir, S., & Mayer, C.-D. (2012). Using Gene Expression to Predict Differences in the Secretome of Human Omental vs. Subcutaneous Adipose Tissue. *Obesity*, 20(6), 1158–1167.
38. Ul-Rehman, R., Rinalducci, S., Zolla, L., Dalessandro, G., & Di Sansebastiano, G. P. (2011). Nicotiana tabacum protoplasts secretome can evidence relations among regulatory elements of exocytosis mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, 6(8), 1140–1145.
39. Hackett, N. R., Butler, M. W., Shaykhiev, R., Salit, J., Omberg, L., Rodriguez-Flores, J. L., ... Crystal, R. G. (2012). RNA-Seq quantification of the human small airway epithelium transcriptome. *BMC Genomics*, 13(1), 82.
40. Amin, A. H., Subbaiah, T. V., & Abbasi, K. M. (1969). Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(9), 1067–1076.