

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

Bioloģijas fakultāte



LINDA ROZENFELDE

**LIMITĒTA SKĀBEKĻA APSTĀKĻOS KULTIVĒTA RAUGA
ANHIDROBIOZE UN TĀS BIOTEHNOLOĢISKIE PIELIETOJUMI**

PROMOCIJAS DARBS

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: mikrobioloģija

Rīga, 2017

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā Šūnu bioloģijas laboratorijā laika posmā no 2010.gada līdz 2017.gadam

Darbs sastāv no 151 lpp un nodaļām: anotācija, pētījuma aktualitāte un vispārējais raksturojums, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti un diskusija, secinājumi, zinātniskā darba aprobācija, literatūras saraksts.

Darba forma: disertācija bioloģijas nozarē, mikrobioloģijas. apakšnozarē

Darba zinātniskais vadītājs : **Aleksandrs Rapoport**s, *Dr.habil.biol.*, vadošais pētnieks (LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts Šūnu bioloģijas laboratorija)

Darba recenzenti:

1. *Dr.biol.*, **Uldis Kalnenieks**, Latvijas Universitāte
2. *Dr.sc.ing.*, **Tālis Juhna**, Rīgas Tehniskā universitāte
3. *Dr.biol.*, **Ilze Irbe**, Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2018. gada 1. februārī plkst.10:30, Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē, Jelgavas ielā 1, LU Bioloģijas zinātņu nozares specializētās promocijas padomes atklātā sēdē

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Bioloģijas zinātņu nozares specializētās promocijas padomes priekšsēdētājs

_____ / Uldis Kalnenieks /
(paraksts)

Promocijas padomes sekretāre

_____ / Daina Eze /
(paraksts)

ANOTĀCIJA

Promocijas darba gaitā izvērtētas iespējas uzlabot raugu *Saccharomyces cerevisiae* kultivētu limitēta skābekļa apstākļos izturību dehidratācijas-rehidratācijas procesā. Pētījumos izmantotas dažādas mūsdienīgas metodiskās pieejas – fluorescentā mikroskopija, caurstarojošā un skenējošā elektronu mikroskopija, atomspēku mikroskopija, Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija, Western blotting un citi. Darbā izpētīta dažādu vielu iespējamā ietekme uz šūnu rezistences palielināšanu - membrānu un proteīnu protektora trehalozes, antioksidantu prolīna un glutationa, kā arī sāls, dažādu cukuru un poliolu šķīdumu ar paaugstinātu osmotisko spiedienu iedarbība. Vislabākie rezultāti iegūti, izmantojot raugu šūnu inkubāciju 1M ksilīta un glicerīna šķīdumos. Šajos apstākļos sauso raugu izdzīvotība uzlabojās līdz pat 50 – 60%, kas nozīmē, ka arī raugu šūnas, kas izaudzētas limitēta skābekļa apstākļos var veiksmīgi pāriet anhidrobiozes stāvoklī. Pētījumos parādīts, ka šajos apstākļos ievērojami izmainās šūnu ķīmiskais sastāvs. To nukleīnskābju, proteīnu, lipīdu un ogļhidrātu saturs pietuvojas aerobi kultivētām tā paša celma raugu šūnām, kas ir rezistentas pret dehidratāciju-rehidratāciju. Noskaidrots, ka mainās arī šūnu virsmas īpašības un raksturlielumi. Tika novērotas izmaiņas šūnu virsmas struktūrā un šūnas sienas stingrības pieaugums. Parādīts, ka rauga ievērojamu izturības paaugstināšanos pret dehidratāciju-rehidratāciju pavada karstuma šoka proteīnu Hsp70 sintēze. Tas dod pamatu izvirzīt hipotēzi, ka viens no anaerobo raugu nestabilitātes iemesliem dehidratācijas procesā var būt saistīts ar šūnas proteīnu rezistences līmeni.

Tā kā viena no interesantākajām anaerobo sauso raugu izmantošanas iespējām ir saistīta ar etanola ražošanu, šī darba turpinājums tika virzīts uz ekonomiski izdevīga substrāta sagatavošanu raugu izmantošanai. Darbā tika parādīta iespēja izmantot celulozi saturošu substrātu pēc furfurola izdalīšanas, pielietojot akad. N.Vederņikova unikālu tehnoloģiju, kas izstrādāta Latvijas Valsts Koksnes Ķīmijas Institūtā. Pētījumos tika noskaidroti apstākļi enzimatiskās hidrolīzes procesam un papildus priekšapstrādes izmantošanas efektivitāte glikozes iznākuma uzlabošanai, kā arī iegūtā hidrolizāta un dehidratēto raugu izmantošanas iespējas etanola sintēzē.

Promocijas darbā novērotās likumsakarības raugu šūnu atbildes reakcijās uz inkubācijas priekšapstrādi, tika izmantotas biopesticīdu producentu fizioloģiskajai inženierijai. Izmantojot inkubāciju sāls šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu, izdevās paaugstināt biopesticīdu producentu - baktēriju *Pseudomonas aurantiaca* - antifungālo aktivitāti.

ANNOTATION

During doctoral thesis, there were examined ways to improve endurance of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cultivated at oxygen limited conditions in the process of dehydration-rehydration. The studies used a variety of modern methodological approaches - fluorescent microscopy, transmission and scanning electron microscopy, atomic force microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, Western blotting and others. There were researched possible effects of various substances on increasing cell resistance – effects of membrane and proteins protector trehalose, antioxidants proline and glutathione, as well as salt, various sugars and polyols solutions with high osmotic pressure. Best results were obtained by incubating yeast cells in 1 M xylitol and glycerol solutions. In these circumstances, dried yeast survival improved up to 50 - 60 %, which means that even yeast cells grown at oxygen limited conditions can successfully pass into the state of anhydrobiosis. Studies show that these circumstances significantly change the chemical composition of the cell. Their content of nucleic acids, proteins, lipids and carbohydrates approaches that of a yeast aerobically cultivated from the same strain of yeast cells which are resistant to dehydration-rehydration. It was found that cell surface properties and characteristics change as well. There were observed changes in the structure of cell surface and an increase of cell wall rigidity. It is shown that in yeast a significant increase in resistance against dehydration-rehydration is accompanied by synthesis of heat shock protein Hsp70. This gives a basis for the hypothesis that one of the causes for instability in anaerobic yeast in dehydration process may be related to the level of resistance of cell's proteins.

As one of the uses for anaerobic dry yeast is related to ethanol production, further research was directed to preparation of economically beneficial substrate with use of yeasts. In the thesis there has been shown a way to use cellulose-containing substrate after furfural extraction using acad. N.Vedernikovs' unique technology developed in the Latvian State Institute of Wood Chemistry. Studies identified conditions for enzymatic hydrolysis process and the effectiveness of the use of additional pre-treatment to improve the outcome of glucose for further ethanol production as well as possibilities of use of hydrolysate and dehydrated yeast at ethanol synthesis.

The observed regularities of yeast cell responses to incubation pre-treatment were used in physiological engineering of biopesticide producers. Using incubation in saline solutions with high osmotic pressure succeeded in raising biopesticide producers - bacteria *Pseudomonas aurantiaca* - antifungal activity.

SATURS

ANOTĀCIJA.....	3
ANNOTATION.....	4
SAĪSINĀJUMI.....	8
PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE UN VISPĀRĒJAIS RAKSTUROJUMS.....	10
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	14
1.1. Rauga šūnas uzbūve.....	14
1.1.1. Šūnas sienīņa.....	14
1.1.2. Šūnas citoplazmatiskā membrāna.....	18
1.1.3. Citoplazma.....	22
1.1.4. Kodols.....	24
1.1.5. Vakuola.....	26
1.1.6. Mitohondriji.....	28
1.1.7. Ribosomas.....	31
1.1.8. Endoplazmatiskais tīkls un Goldži komplekss.....	31
1.2. Anabioze.....	33
1.2.1. Anabiozes atklājuma pirmsākumi un tās nozīme.....	33
1.2.2. Dehidratācija un tās radītās izmaiņas šūnā.....	35
1.2.2.1. Šūnas organellu izmaiņas.....	35
1.2.2.2. Citoplazmatiskās membrānas izmaiņas un lipīdu fāzu pārejas.....	37
1.2.2.3. Oksidatīvais stress.....	38
1.3. Aizsargmehānismi rauga šūnās.....	40
1.3.1. Osmotiskā stresa aizsargsistēma un osmolīti.....	40
1.3.2. Antioksidantu un reparācijas sistēma.....	44
1.3.3. Karstuma šoka proteīnu aizsargsistēma.....	46
1.4. Mikroskopijas metodes raugu šūnu izpētē.....	50
1.4.1. Skenējošā elektronu mikroskopija.....	50
1.4.2. Caurstarojošā elektronu mikroskopija.....	52
1.4.3. Atomspēku mikroskopija.....	53
2. MATERIĀLI UN METODES.....	55
2.1. Limitēta skābekļa apstākļos augušu dzīvotspējīgu sausu raugu iegūšana.....	55
2.1.1. Izmantotie mikroorganismi un kultivēšanas apstākļi.....	55
2.1.2. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot osmolītus un sāli.....	55

2.1.3. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot trehalozi.....	56
2.1.4. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot antioksidantus.....	56
2.1.5. Mitruma noteikšana.....	56
2.1.6. Raugu šūnu rehidratācija.....	57
2.1.7. Raugu šūnu dzīvotspējas noteikšana.....	57
2.1.8. Trehalozes daudzuma noteikšana.....	57
2.2. Mikroskopijas pētījumi.....	57
2.2.1. Skenējošā elektronu mikroskopija.....	57
2.2.2. Caurstarojošā elektronu mikroskopija.....	58
2.2.2.1. Paraugu fiksācija.....	58
2.2.2.2. Paraugu atūdeņošana un ieslēgšana sveķos.....	58
2.2.2.3. Ultraplāno griezumū iegūšana un kontrastēšana.....	59
2.2.3. Atomspēku mikroskopija.....	59
2.3. Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas pētījumi.....	60
2.4. Karstuma šoka proteīnu Hsp70 pētījumi.....	60
2.4.1. Dezintegrācija un proteīna daudzuma noteikšana.....	60
2.4.2. Elektroforēze.....	60
2.4.3. Proteīnu pārnese.....	60
2.4.4. Inkubācija ar antivielām.....	61
2.4.5. Nitrocelulozes membrānas krāsošana.....	61
2.5. Biotehnoloģijai svarīgo mikroorganismu celmu metabolisma aktivācija.....	61
2.5.1. Izmantotie mikroorganismi un kultivēšanas apstākļi.....	61
2.5.2. Aktivācija izmantojot sāli.....	62
2.5.3. Baktēriju dehidratācija.....	62
2.5.4. Antifungālo metabolītu sintēzes novērtēšana.....	62
2.6. Atjaunojamo substrātu hidrolīze bioetanolā iegūšanai.....	63
2.6.1. Substrātu priekšapstrāde.....	63
2.6.2. Enzimātiskā hidrolīze.....	63
2.6.3. Autoklāvēšana un kavitācijas apstrāde.....	64
2.6.4. Glikozes daudzuma noteikšana.....	64
2.6.5. Etanola iegūšana izmantojot hidrolizātu.....	65
2.7. Datu statistiskā analīze.....	65
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	66
3.1. Limitēta skābekļa apstākļos augušu dzīvotspējīgu sausu raugu iegūšana.....	66
3.1.1. Raugu žāvēšana.....	66

3.1.1.1. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot osmolītus	66
3.1.1.2. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot sāli	71
3.1.1.3. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot trehalozi.....	72
3.1.1.4. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot antioksidantus.....	73
3.1.2. Mikroskopijas pētījumi	75
3.1.2.1. Skenējošā elektronu mikroskopija	75
3.1.2.2. Caurstarojošā elektronu mikroskopija.....	79
3.1.2.3. Atomspēku mikroskopija	82
3.1.3. Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas pētījumi	86
3.1.4. Karstuma šoka proteīnu Hsp70 pētījumi.....	90
3.1.5. Kopsavilkums par limitēta skābekļa apstākļos augušu dzīvotspējīgu sausu raugu iegūšanu.....	94
3.2. Biotehnoloģijai svarīgo mikroorganismu celmu metabolisma aktivācija.....	98
3.2.1. Metabolisma aktivācija izmantojot inkubāciju šķīdumā ar paaugstinātu osmotisko spiedienu	98
3.2.2. Metabolisma aktivācija izmantojot dehidratāciju	101
3.2.3. Metabolisma aktivācija izmantojot saharozi un trehalozi un dehidratāciju.....	102
3.2.4. Kopsavilkums par biotehnoloģijai svarīgo mikroorganismu celmu metabolisko aktivāciju	103
3.3. Atjaunojamo substrātu hidrolīze bioetanola iegūšanai	104
3.3.1. Bērza koksnes enzimatiskā hidrolīze	105
3.3.2. Kviešu salmu enzimatiskā hidrolīze	112
3.3.3. Rapšu salmu enzimatiskā hidrolīze	116
3.3.4. Etanola iegūšana no atjaunojamiem substrātiem	117
3.3.5. Kopsavilkums par atjaunojamo substrātu hidrolīzi bioetanola iegūšanai	119
4. SECINĀJUMI	122
5. ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA	124
6. LITERATŪRAS SARAKSTS	128

SAĪSINĀJUMI

ADF	adenozīna difosfāts
AFM	atomspēku mikroskops (<i>atomic force microscope</i>)
ASV	Amerikas Savienotās Valstis
ATF	adenozīna trifosfāts
Ccw	kovalenti saistītie šūnas sienas proteīni (<i>covalently linked cell wall proteins</i>)
CWP	šūnas sienas proteīni (<i>cell wall proteins</i>)
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
DTT	dithiothreitol (<i>dithiothreitol</i>)
ERES	endoplazmatiskā tīkla izejas vietas (<i>endoplasmic reticulum exit sites</i>)
FAD	flavīn adenīn dinukleotīds
FADH ₂	reducētā FAD forma
FTIR	Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
GTF	guanozīna trifosfāts
HOG	augstas osmolaritātes glicerīna ceļš (<i>high osmolarity glycerol pathway</i>)
HPLC	augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfs (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
Hsp 70	karstuma šoka proteīns 70 (<i>heat shock protein 70</i>)
L	lipīda radikālis
LOO	peroksilradikālis
LOOH	lipīda hidroperoksīds
LU	Latvijas Universitāte

LV KĶI	Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts
mtDNS	mitohondriālā DNS
NADPH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāts (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAF	nukleotīdu apmaiņas faktors
PIR	proteīni ar iekšējiem atkārtojumiem (<i>proteins with internal repeats</i>)
pre-mRNS	prematricas RNS
RNS	ribonukleīnskābe
rRNS	ribosomālā RNS
ROS	reaktīvie skābekļa veidi (<i>reactive oxygen species</i>)
RTU	Rīgas Tehniskā universitāte
SEM	skenējošais elektronu mikroskops (<i>scanning electron microscope</i>)
sHsp	mazie karstuma šoka proteīni (<i>small heat shock proteins</i>)
SDS	nātrija dodecil sulfāts (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
snRNA	mazās kodola RNS (<i>small nuclear RNA</i>)
snRNP	mazie kodola ribonukleoproteīni (<i>small nuclear RNP</i>)
TEM	transmisijas elektronu mikroskops (<i>transmission electron microscope</i>)
tRNS	transporta RNS
T _g	stiklošanās temperatūra (<i>glass transition temperature</i>)
T _m	fāzu pārejas temperatūra (<i>phase transition temperature; melting temperature</i>)

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE UN VISPĀRĒJAIS RAKSTUROJUMS

Bieži apkārtējā vide spēj radīt stresa faktorus, kas var izraisīt organismu nāvi vai arī ieslēgt noteiktus adaptācijas mehānismus dzīvotspējas nodrošināšanai. Ūdens zudums ir viens no apkārtējās vides stresa faktoriem, kas pavadījis dzīvus organismus visu evolūcijas laiku. Izprast šūnu jutību vai rezistenci pret ūdens zudumu ir nozīmīgi gan fundamentālajā mikrobioloģijā gan biotehnoloģijā. Papildus pamatzināšanām par šūnās notiekošajiem procesiem dehidratācijas laikā, komerciāli nozīmīgas ir arī zināšanas par to, kā pareizi žāvēt šūnas, lai tās varētu uzglabāt ilgstošu laika periodu. Daudzi pētījumi par dehidratācijas toleranci ir veikti izmantojot prokariotu šūnas, savukārt eikariotu šūnu pamatpētījumu objekts ir raugu šūnas *Saccharomyces cerevisiae*. Pateicoties tā salīdzinoši vieglajai kultivēšanai, pilnībā sekvenētajam un aprakstītajam genomam, eikariotu šūnas uzbūves, dzīves cikla un metabolisko ceļu līdzībai, tajā pat laikā izslēdzot medicīnas ētikas jautājumus par dzīvnieku šūnu eksperimentālo izmantošanu, tas aizvien biežāk un biežāk tiek izmantots kā modeļobjekts dažādos molekulārbioloģiskos un medicīniskos pētījumos (Doke and Dhawale, 2015; Pray, 2008; Engel and Cherry, 2013). LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta Šūnu bioloģijas laboratorijā, kas ieņem vienu no vadošajām pozīcijām raugu šūnu un anhidrobiozes izpētē, ir veikti pētījumi par iespēju paaugstināt aerobi kultivētu raugu izdzīvotību pēc dehidratācijas-rehidratācijas, tos pakļaujot noteiktai priekšapstrādei pirms dehidratācijas, taču šādu pētījumu nav par raugiem, kas kultivēti limitēta skābekļa apstākļos. Zināms, ka limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu izdzīvotība ir ļoti zema un to nav iespējams ievērojami palielināt pat izmantojot lēno rehidratāciju. Taču iegūt šādu raugu dzīvotspējīgus sausos preparātus būtu īpaši nozīmīgi priekš tādām nozarēm, kā, piemēram, bioetanolā ražošana.

Tajā pašā laikā, pamatojoties uz Apvienoto Nāciju aprēķiniem ir zināms, ka, cilvēku daudzums pasaulē no 2016.gada 7,4 miljoniem sasniegs 11,2 miljonus 2100.gadā (World population prospects, 2017). Tas viennozīmīgi veicina aizvien augstāku enerģijas pieprasījumu un tā rezultātā vajadzība pēc jēlnaftas, oglēm un gāzes aizvien pieaug, kas ietekmē arī to cenu. Pie tam, apmēram 70 % no visiem pasaules naftas krājumiem ir jau iztērēti un 3% no atlikušā daudzuma ik gadu izmanto tagad (Kerr, 1998). Saproto fosilo enerģijas produktu pieejamības nenoteiktību, aizvien aktuālāks paliek jautājums par atjaunojamo enerģiju veidu apgūšanu. Biodeģviela ir atjaunojamā enerģija, kurai šobrīd tiek pievērsta vislielākā uzmanība. Biodeģvielas dominējošās atjaunojamās enerģijas ir bioetanol, biodīzelis un biogāze. Visvairāk lietotā atjaunojamā enerģija transporta sektorā ir bioetanol.

Brazīlija un ASV šobrīd ir lielākie bioetanolā ražotāji pasaulē un kopā šis valstis aizņem 89% no vispasaules bioetanolā tirgus. Gandrīz viss bioetanolā tiek ražots izmantojot pārtikas izejvielas – Brazīlijā tās ir cukurniedres, ASV – labības graudi, bet tajā pašā laikā pasaulē jau tagad zemkopība nevar nodrošināt vienlaicīgi pārtikas un bioetanolā ražošanu (Limayema and Rieke, 2012). Tādējādi vēl aktuālāks kļūst jautājums par “jauno” pieejamo nepārtikas izejvielu – hemilignocelulozes biomasas - izmantošanu šajās tehnoloģijās, kas nekonkurē ar pārtikas produktiem un tai pat laikā ļauj izmantot dažādus lauksaimniecības vai augu valsts atkritumus videi draudzīgā ilgtspējīgā procesā. Tomēr vislielākā problēma bioetanolā ražošanā no hemilignocelulozes materiāliem ir diezgan liels C_5 savienojumu daudzums, kuru līdz šim laikam neizdodas izmantot etanolā ražošanā un lielu daudzumu no izejvielas vajag nolaist notekūdeņos. Tas būtiski ietekmē gan ekoloģiju, gan ekonomiku. Papildus tam C_5 cukuru saturošais šķīdums satur raugu augšanas inhibitoru – furfurolu, kurš veidojas no pentozēm celulozes priekšapstrādes procesā (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000). Savukārt furfurola izdalīšana no substrāta vienmēr veda pie celulozes C_6 savienojumu paliekošās daļas neatgriezeniskas destrukcijas, un rezultātā tā vairāk nebija izmantojama bioetanolā ražošanā. Tajā pašā laikā furfurols ir ļoti vērtīgs un perspektīvs produkts dažādu ķīmisko savienojumu ražošanai, aizvietojojt tagad izmantojamo naftu. Mūsu pētījumos tiek izmantota unikāla patentēta Prof. N. Vedernikova pieeja (LR patents Nr. 13676 no 20.07.2008), kuras rezultātā iespējams apvienot abus procesus, tādējādi no C_5 savienojumiem iegūstot furfurolu, savukārt lignocelulozes atlikumu pēc furfurola iegūšanas izmantot kā izejmateriālu tālāki bioetanolā iegūšanai mikrobioloģiskā ceļā.

Saprotams, ka no industriālo mikroorganismu darbības ir atkarīga bioprocesu kvalitāte un biotehnoloģijas efektivitāte kopumā. Tādējādi ir svarīgi arī atrast veidus kā intensificēt mikroorganismu darbību, lai nodrošinātu maksimālu bioprocesa rezultātu. Piemēram, mikroorganismu dehidratācija ir saistīta ar dažādām intracelulārām izmaiņām molekulārā, strukturālā un šūnu līmenī, tādējādi novērojama metabolisko procesu aktivācija, kas normālos apstākļos parasti nav novērojami. Šie efekti nav saistīti tikai ar pastiprinātu aizsargsistēmu darbību, bet arī var tikt novērota augšanas un fermentācijas procesu un produktu ieguves aktivācija (Beker and Rapoport, 1987; Rapoport *et al.*, 1997; Bekers *et al.*, 2000). Iegūtās zināšanas par dehidratācijas ietekmi uz dažādu metaboliskos procesu aktivāciju ir svarīgas ne tikai raugu šūnu izmantošanai biotehnoloģijā, bet arī citu organisma šūnu pielietojumam, piemēram, antifungālās aktivitātes paaugstināšanai.

Promocijas **darba mērķi** ir atrast iespējas paaugstināt limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu rezistenci dehidratācijas-rehidratācijas procesā un izpētīt šo raugu zemās rezistences iemeslus. Izmantojot iegūto informāciju, noskaidrot iespēju ietekmēt citu

mikroorganismu biotehnoloģisko aktivitāti. Kā arī parādīt iespēju izmantot celulozi un hemicelulozi saturošos lauksaimniecības un ražošanas atlikumus pēc furfurola izdalīšanas glikozes iegūšanai, kas nepieciešama tālākai raugu izmantošanai bioetanolā ražošanā.

Darba **mērķu** sasniegšanai izvirzīti šādi **uzdevumi**:

- 1) Izpētīt raugu šūnu dzīvotspējas palielināšanas iespējas pēc dehidratācijas-rehidratācijas, tās pirms žāvēšanas pakļaujot inkubācijai cukuru, poliolu un sāls šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu;
- 2) Izpētīt raugu šūnu dzīvotspējas palielināšanas iespējas pēc dehidratācijas-rehidratācijas, tās pirms žāvēšanas pakļaujot inkubācijai trehalozes un antioksidantu šķīdumos;
- 3) Izpētīt raugu šūnu dzīvotspējas palielināšanas iespējas pēc dehidratācijas-rehidratācijas, pievienojot antioksidantus barotnei pirms kultivēšanas;
- 4) Izpētīt šūnu virsmas un ultrastruktūras izmaiņas dehidratācijas-rehidratācijas rezultātā;
- 5) Izpētīt šūnu bioķīmiskā sastāva izmaiņas dehidratācijas-rehidratācijas rezultātā;
- 6) Izpētīt karstuma šoka proteīnu sintēzi raugu šūnās;
- 7) Novērtēt dehidratācijas un inkubācijas metodes ietekmi uz baktēriju antifungālo aktivitāti;
- 8) Noskaidrot iespēju izmantot lignocelulozes materiālu pēc furfurola izdalīšanas efektīvai enzimatiskai hidrolīzei lai iegūtu glikozi tālākai bioetanolā ražošanai;
- 9) Noskaidrot papildus priekšapstrādes (autoklāvēšana, kavitācija) ietekmi uz enzimatiskās hidrolīzes efektivitāti;
- 10) Noskaidrot etanola sintēzes iespējas izmantojot enzimatiskās hidrolīzes rezultātā iegūto hidrolizātu.

Šo uzdevumu veikšanai darbā izmantotas sekojošas metodes: Klasiskās mikrobioloģijas metodes; Spektrofotometrija; Luminiscences mikroskopija; Skenējošā un caurstarojošā elektronmikroskopija; Atomspēku mikroskopija; Augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija; Elektroforēze (Western blotting); Enzimātiskās metodes.

Promocijas darba novitāte un zinātniskais nozīmīgums:

- 1) Pirmo reizi parādīta iespēja paaugstināt limitēta skābekļa apstākļos augušu rauga šūnu dzīvotspēju pēc dehidratācijas-rehidratācijas tās pakļaujot inkubācijai ksilīta un glicerīna šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu;

- 2) Noskaidrota inkubācijas šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu metodes izmantošanas efektivitāte baktēriju metabolisma regulācijā;
- 3) Izstrādāti tehnoloģijas pamati efektīvas enzimatiskās hidrolīzes nodrošināšanai pamatojoties uz optimālu hidrolīzes apstākļu, kā arī papildus priekšapstrādes metožu izmantošanu.

Promocijas darba tēmas aktualitāte un izstrāde ir saistīta ar dalību 7 projektos:

- 1) „Baktēriju-producentu fizioloģiskās aktivācijas paņēmieni izstrāde un ieviešana biopesticīdu ražošanā ar mērķi paaugstināt to darbības efektivitāti un stabilitāti” Latvijas-Baltkrievijas sadarbības projekts, 2007 - 2011
- 2) “Bezatlíkuma tehnoloģija bioetanola un citu vērtīgu produktu ieguvei no lapkoku koksnes” ERAF projekts, 2011 - 2013
- 3) „Jaunu biopesticīdu preparatīvo formu, ar paaugstinātu aktivitāti un stabilitāti, izstrāde ar mērķi palielināt bioloģiskās lauksaimniecības efektivitāti” Latvijas-Baltkrievijas sadarbības projekts, 2012 - 2013
- 4) „Bioetanola un furfurola kopīgas iegūšanas no kviešu salmiem biotehnoloģiskie pamati” ERAF projekts, 2014 - 2015
- 5) „Raugu anhidrobioze un tās netradicionālie pielietojumi biotehnoloģijā” LZP projekts 2013 - 2016
- 6) "Pētījums par anhidrobiozes izraisīto rauga iekššūnu izmaiņām, kuras varētu būt nozīmīgas biomedicīnā un biotehnoloģijā" Latvijas-Lietuvas-Taivānas zinātniskās sadarbības atbalsta fonda projekts 2016 - 2018
- 7) “Jaunas pieejas izstrādāšana vienlaicīgai bioetanola, furfurola un citu vērtīgu produktu bezatlíkuma iegūšanai no vietējiem zemkopības pārpalikumiem” ERAF projekts 2017- 2019

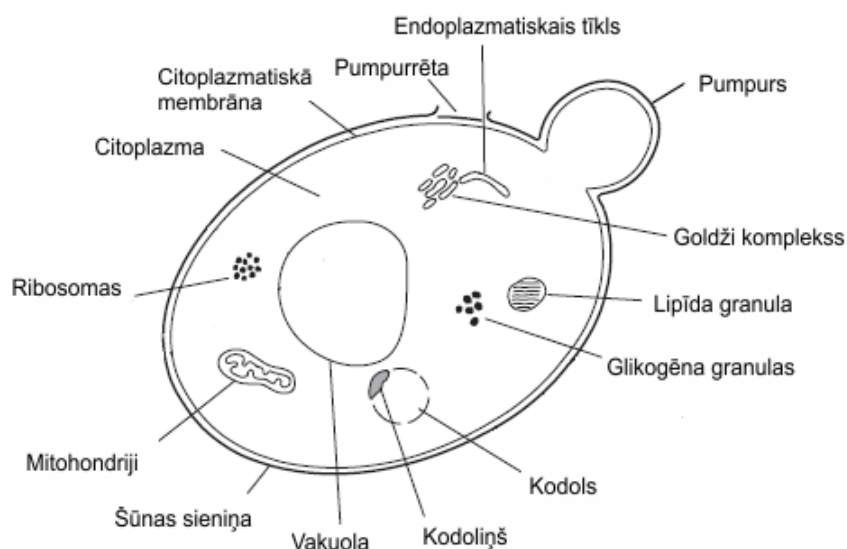
Promocijas darba aizstāvēšanai izvirzītās tēzes:

- 1) Raugs *Saccharomyces cerevisiae* kultivēts limitēta skābekļa apstākļos var tikt sekmīgi pārvests anhidrobiozes stāvoklī;
- 2) Inkubācijai izvēlētajam savienojumam ir nozīme raugu šūnu dzīvotspējas saglabāšanā;
- 3) Inkubācijas metodes izmantošana dod iespēju paaugstināt baktēriju antifungālo aktivitāti;
- 4) Priekšapstrādātie lignocelulozi saturošie lauksaimniecības un rūpniecības atlikumi nodrošina perspektīvu izejmateriālu glikozes iegūšanai enzimatiskās hidrolīzes ceļā tālākai etanola sintēzei.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Rauga šūnas uzbūve

Ar terminu „raugi” apzīmē visus augstākās kārtas sēņu organismus, kas augšanas fāzē atrodas viensūnas formā un vairojas ar sporām vai daloties. Tipiskām rauga šūnām ir ovāla, retāk apaļa, cilindriskā vai sirpjveidīga forma. Raugu šūnu garums var būt ļoti atšķirīgs dažādiem celmiem, sākot no 2-3 μm , beidzot ar 20 – 50 μm , bet platums vidēji no 1 – 10 μm (Walker, 1998). Rauga šūnas uzbūves pamatelementi ir šūnas sienīņa, citoplazmatiskā membrāna, citoplazma un tajā ieslēgtie organoīdi - kodols, vakuola, Goldži komplekss, endoplazmatiskais tīkls, ribosomas, mitohondriji. Rauga šūnas shematiskais atainojums parādīts 1.attēlā.

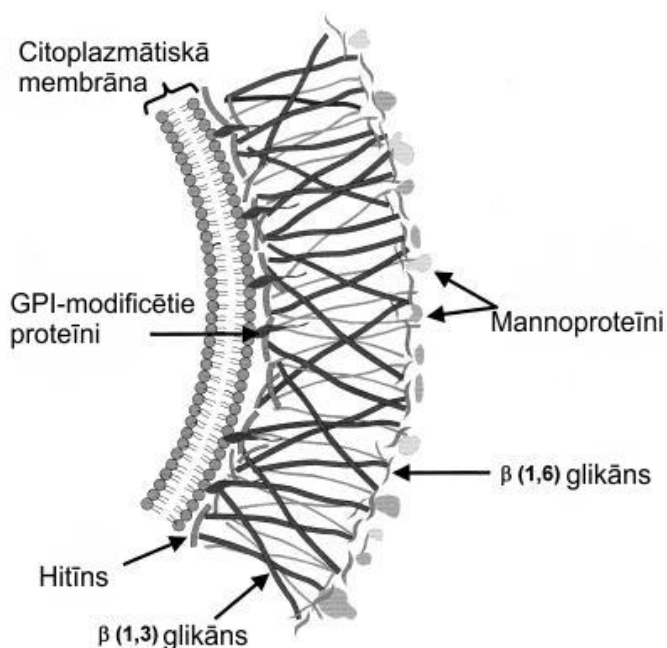


1.attēls. Rauga šūnas uzbūve (Briggs *et al.*, 2004)

1.1.1. Šūnas sienīņa

Rauga šūnas sienīņai ir nozīmīga loma šūnas eksistencē un šūna patērē ievērojamu daudzumu metaboliskās enerģijas tās veidošanai. Atkarībā no augšanas apstākļiem, šūnas sienīņas sausā masa var sastādīt 10 – 25% no kopīgās šūnas masas (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003). Šūnas sienīņas galvenās funkcijas ir sekojošas: 1) tā stabilizē šūnas iekšējo osmotisko spiedienu; 2) aizsargā šūnu pret fizikāliem stresiem; 3) nodrošina šūnas formu; 4) satur proteīnus, kas regulē caurlaidību un nodrošina aizsardzību pret potenciāli kaitīgām makromolekulām (Klis *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2000; De Nobel *et al.*, 1990).

Rauga *Saccharomyces cerevisiae* šūnas sienīņa ir veidota galvenokārt no polisaharīdiem (~85%) un proteīniem (~15%) (Nguyen *et al.*, 1998). Sienīņas mehānisko izturību nodrošina tās iekšējais slānis, kas sastāv no β 1,3 – glikāna un hitīna un sastāda vidēji 50 – 60 % no šūnas sienas sausā svara. Iekšējais slānis darbojas kā karkass priekš šūnas aizsargājošā ārējā slāņa, kas sastāv no glikolizētiem mannoproteīniem, kas ir izvirzīti apkārtējā vidē un iesaistīti šūna-šūna mijiedarbībās, kā arī limitē nevēlamu proteīnu piekļūšanu iekšējam slānim un plazmas membrānai (Cappellaro *et al.*, 1994; Reynolds and Fink, 2001; De Nobel *et al.*, 1990). Šūnas sienīņas shematisks attēlojums parādīts 2. attēlā.



2.attēls. Rauga šūnas sienīņas shematisks attēlojums (Selitrennikoff, 2001)

Šūnas virsmas proteīnu ogļhidrātu sānu ķēdes satur daudzus fosfodiesteru tiltiņus, kas nodrošina šūnas virsmai negatīvu lādiņu. Šīs sānu ķēdes ir atbildīgas par šūnas sienīņas hidrofilajām īpašībām un ir iesaistītas ūdens piesaistīšanā un aizsardzībā pret izzūšanu (Jigami and Odani, 1999).

Galvenais šūnas sienīņas polisaharīds ir mēreni zarotais β 1,3 – glikāns, kas sastāv no vidēji 1500 glikozes monomēriem (Fleet, 1991). Sānu ķēžu klātbūtnes dēļ, β 1,3 – glikāna molekulas var tikai lokāli saistīties ar ūdeņraža saitēm, veidojot nepārtrauktu, trīsdimensionālu tīklojumu. Šis tīkls ir ļoti elastīgs un ievērojami pagarināts normālos osmotiskos apstākļos. Kad šūnas tiek pārnestas uz hipertonusu šķīdumu, tās ātri saraujas un var zaudēt līdz pat 60 % no to sākotnējā tilpuma. Saraušanās ir pilnībā atgriezeniska, kad

šūnas tiek ievietotas sākotnējā šķīduma vidē (Klis *et al.*, 2002). Šūnas sienas elastība atspoguļo β 1,3 – glikānu molekulu struktūru, kura ir fleksibla, plastiska un ar spirālveidīgu formu, kā stieples atspere, kas var eksistēt dažādos pagarinājuma stāvokļos (Klis *et al.*, 2002, Krainer *et al.*, 1994). β 1,3 – glikānu molekulu nereducējošie gali var funkcionēt kā kovalentas piesaistes vietas citiem polisaharīdiem.

β 1,3 – glikānu tīkla ārpusē var atrast izteikti sazarotas β 1,6 – glikānu ķēdes. Pretēji β 1,3 – glikāna struktūrai, β 1,6 – glikāns ir īsāks un sastāv vidēji no 350 glikozes monomēriem, tam ir amorfa struktūra un tas darbojas kā līme veidojot kovalentas krusteniskas saites ar β 1,3 – glikānu, hitīnu un mannoproteīniem (Kollar *et al.*, 1997).

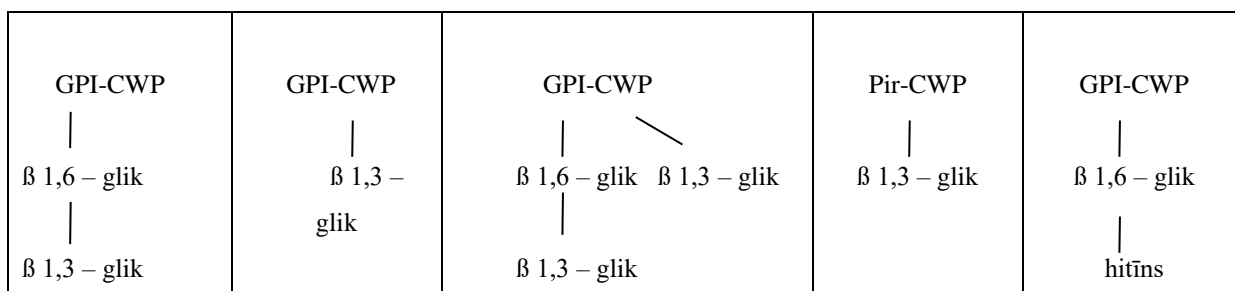
β 1,3 – glikānu tīklojuma iekšienē atrodas hitīna ķēdes. Hitīns ir lineārs polimērs, kas sastāv no β -1,4-saistīta N-acetilglikozamīna. Tas veido mikrofibrillas, kas ir saistītas ar ūdeņraža saitēm. Hitīns ir vismazāk pārstāvētais komponents raugu *S.cerevisiae* sienā (1 – 2% no sienas sausā svara). Hitīna ķēžu garums šūnas sienā un pumpurrētās ir vidēji 100 un 190 N-glikozilamīna atlikumi attiecīgi (Klis *et al.*, 2002). Šūnas sienā apmēram 40 – 50% hitīna ķēžu ir glikozīdiski piesaistītas pie β 1,3 – glikānu nereducējošajiem galiem un tā kristāliskā struktūra nodrošina sienas stiepes pretestību (Kollar *et al.*, 1997).

Ārējo šūnas sienas tīklojumu galvenokārt veido mannoproteīni, kas saistīti ar sienas polisaharīdiem un tos sauc par šūnas sienas proteīniem (*angl.* CWP; cell wall proteins) (Osumi, 1998). Šūnas sienas proteīni galvenokārt tiek iedalīti 2 grupās: pie šūnas sienas kovalenti un nekovalenti saistītie proteīni (Smits *et al.*, 1999). Nekovalenti saistītie proteīni var tikt izdalīti izmantojot SDS (*angl.* SDS; sodium dodecyl sulfate) vai DTT (*angl.* DTT; dithiothreitol), savukārt kovalenti saistītie proteīni var tikt ekstrahēti izmantojot dažādas glikanāzes vai apstrādājot ar sārmu (Teparic *et al.*, 2004).

Pie nekovalenti saistītajiem proteīniem Scw (*angl.* Scw proteins; soluble cell wall proteins) raugu šūnās pieskaitāmi Scw3, Scw4, Scw10, Scw11 un β -eksoglikanāze Exg1, β – endoglikanāze Bgl2 un hitanāze Cts1 (Cappellaro *et al.*, 1998; Teparic *et al.*, 2004). Šo proteīnu fizioloģiskā nozīme kopumā vēl nav izpētīta. Esošie pētījumi parāda, ka proteīni Scw4, Scw10 un Bgl2 ir sinerģiskā manierē iesaistīti šūnas sienas veidošanā, savukārt Scw11 darbojas antagoniski. Scw4 un Scw10 proteīni, detektēti kā sekvence rauga genomā, tiek radnieciski saistīti ar Bgl2, ar 49 un 56% līdzību un 27 līdz 29% identiskumu. Scw4, Scw10 un Scw11 proteīni ir ar 52 līdz 75% līdzību un 36 līdz 63% identiskumu (Cappellaro *et al.*, 1998). Tādējādi šīs grupas proteīni visticamāk ir pieskaitāmi endoglikanāzēm vai arī iespējams transglikozidāzēm. Scw3 nav radniecisks nevienai *S.cerevisiae* zināmajām glikanāzēm, bet drīzāk līdzīgs *Candida wickerhamii* β -glikozidāzei (Skory *et al.*, 1995). Šis proteīns varētu būt pieskaitāms ekstracelulāro proteīnu grupai, kas iesaistīta polimēro glikānu

degradācijā, lai tos padarītu pieejamus fermentācijai (Cappellaro *et al.*, 1998). Tāpat pētījumos noskaidrots, ka *scw4* mutācija raugā uzrāda augstāku mirstību salīdzinot ar savvaļas celmu, *scw10 vai scw11*. Tā kā proteīni ir homologi, tad *scw4scw10* mutācija uzrāda ievērojamu mirstības paaugstinājumu sasniedzot 5% šūnu kultūrā, audzējot eksponenciāli standarta laboratorijas apstākļos. Papildus pievienojot *Bgl2* mutāciju (*scw4scw10bgl2*), mirstība paaugstinās vēl uz pusi. Secināts, ka šūnu mirstība saistīta ar osmotiskās stabilitātes samazināšanos šūnās (Teparic *et al.*, 2004).

Kovalenti saistītie proteīni tiek iedalīti 2 grupās: GPI-modificētie šūnas sienas proteīni (GPI-CWP) un sārnu-jūtīgās saites proteīni (DeGroot *et al.*, 2005; Kapteyn *et al.*, 1999; Mrsa *et al.*, 1997). Lielākā daļa CWP tiek modificēti endoplazmātiskajā tīklā pievienojot glikozilfosfatidilinozītu (*angl.* GPI; glycosylphosphatidylinositol). Proteīns galvenokārt tiek saistīts ar β 1,6 – glikānu caur GPI atlikumu un tādējādi ir netieši saistīti ar β 1,3 – glikānu tīklu (Kapteyn *et al.*, 1999). Šie proteīni tad arī tiek dēvēti par GPI-modificētiem šūnas sienas proteīniem (GPI-CWP). Pārskats par CWP – polisaharīdu kompleksiem rauga šūnās attēloti 3.attēlā.



3.attēls. Pārskats par CWP-polisaharīdu kompleksiem rauga šūnās. GPI-CWP, šūnas sienas proteīni saistīti caur GPI atlikumu ar β 1,6 – glikānu (β 1,6 – glik); Pir-CWP, šūnas sienas proteīni no PIR dzimtas saistīti caur sārnu-jūtīgu saiti ar β 1,3 – glikānu (β 1,3 – glik) (Klis *et al.*, 2002)

Raugos GPI-CWP ir vitāli svarīgi dzīvotspējas, kā arī normālas šūnas morfoloģijas nodrošināšanai. Tie kalpo kā virsmas receptori, hidrolītiskie enzīmi, strukturālie komponenti un adhēzijas proteīni pie pārošanās vai nelielu agregātu, kā arī biofilmu veidošanās (Gonzales *et al.*, 2010). Rauga *S.cerevisiae* genomā ir identificēti vismaz 60 -70 GPI-CWP (Klis *et al.*, 2002).

Otra lielā proteīnu grupa, kas atrodama šūna sienā ir proteīni ar iekšējiem atkārtojumiem - Pir proteīni (*angl.* Pir; proteins with internal repeats). Pir proteīni (Pir-CWP) ir tieši saistīti ar β 1,3 – glikānu tīklojumu caur sārnu-jūtīgu saiti (3.attēls). Apstrāde ar sārnu

(30 mm NaOH, 12 h, 4 °C) ir ļāvusi izdalīt sešus proteīnus, no kuriem *S.cerevisiae* visvairāk pārstāvētie ir četri - Pir1/Ccw6, Hsp150/Pir2/Ccw7, Pir3/Ccw8 un Cis3/Pir4/Ccw5 (*angl.* Ccw; covalently linked cell wall proteins) (Mrsa *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2014). Šie proteīni ir strukturāli saistīti, serīna/treonīna bagāti un sastāvoši no N-termināla signāla peptīda, Kex2 saita, atkārtojumus saturoša reģiona (līdz 11 atkārtojumiem) un karboksil-termināla reģiona ar četriem cisteīna atlikumiem (Klis *et al.*, 2002). Pir1 un Pir3 satur astoņus atkārtojumus, Pir2 - desmit un Pir4 tikai vienu atkārtojumu, kas satur noteiktu sekvenci (Ecker *et al.*, 2006). Šī sekvenca, kas atkārtojas, sastāv no 18 līdz 19 aminoskābju atlikumiem un pēc Castillo *et al.* pētījumiem, ir nepieciešama, lai piesaistītos pie β 1,3 – glikāna (Sumita *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2003).

Pir proteīniem ir atšķirīga lokalizācija šūnā, kas var norādīt uz to, ka tiem ir arī atšķirīgas funkcijas. Pir1 proteīns tiek specifiski ekspresēts pumpurrētā. Pir2 ir arī atrodams pumpurrētā, tomēr tas eksistē arī citos šūnas sienas reģionos. Pir3 un Pir4 ir vienmērīgi ekspresēti pa visu šūnas sienu, bet nav lokalizēti pumpurrētā (Sumita *et al.*, 2005). Pir4 galvenokārt izvietots uz augošās meitas šūnas sienas (Moukadiri *et al.*, 1999). Tā kā Pir1 nav lokalizēts pumpura kakliņā pumpurošanās procesa laikā, bet ir atrodams pumpurrētā pēc šūnas atdalīšanās, tiek pieņemts, ka Pir1 var kalpot marķieris, kas novērš jaunu pumpurošanās procesu no vietas kur tikko pumpurošanās jau ir bijusi. Iespējams arī, ka Pir1 atraisa un/vai sagrauj hitīna gredzenu šūnas augšanas laikā (Sumita *et al.*, 2005). Pir1 un Pir2 tiek intensīvi ekspresēti šūnas G1 fāzē, un var pieņemt, ka tie abi iesaistīti sienas nostiprināšanā pumpurošanās vietā, kā arī Pir2 var pastiprināt sienas stiprību arī citos tās reģionos. Savukārt Pir3 un Pir4 var būt saistīti ar šūnas sienas protekciju pret apkārtējās vides stresa faktoriem kopumā (Sumita *et al.*, 2005). Pētījumi rāda, ka β 1,6 – glikāna daudzuma samazināšanās šūnas sienā, saistīta ar Pir proteīnu transkripcijas izmaiņām, kalpojot kā kompensācijas mehānisms (Kapteyn *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 1999). Papildus zināms, ka Pir2/Ccw7/Hsp150p tiek intensīvi inducēts karstuma stresa un slāpekļa bada apstākļos (Russo *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1993), bet Pir1 un Pir3 ir saistīti ar rezistenci pret osmotīnu (Yun *et al.*, 1997). Tādējādi var secināt, ka šūnu sienas Pir proteīnu loma vēl nav līdz galam noskaidrota, tomēr kopumā tie ir iesaistīti šūnas sienas integritātes nodrošināšanā.

1.1.2. Šūnas citoplazmatiskā membrāna

Raugu šūnas citoplazmatiskā membrāna ir vidēji 7,5 nm bieza struktūra un tās galvenās funkcijas ir : šūnas fizikāla aizsardzība no ārvides, tās robežu noteikšana, osmotiskās stabilitātes kontrole, šūnas sienas biosintēzes kontrole, citoskeleta piesaiste, selektīvas

barjeras nodrošināšana starp ārvidi un citoplazmu, dalība vielu transportā, signālu pārnēsē, kā arī starpšūnu mijiedarbībā (Feldmann, 2012).

Citoplazmatiskās membrānas uzbūves pamatkomponenti ir lipīdi, proteīni un ogļhidrāti. Lipīdiem ir svarīga nozīme membrānu struktūru veidošanās procesā, barjeras funkcijas nodrošināšanā, signālu pārnēsē, kā arī enerģijas uzglabāšanā. Galvenie lipīdu veidi membrānās ir fosfolipīdi, steroli un glikolipīdi, kas visi sastāv no hidrofilās –galvas daļas un hidrofobās - astes daļas. Fosfolipīdi regulē membrānas plūstamību un caurlaidību. Pamatā tie ir mono, di vai tri glicerīdi, kur viena taukskābe ir aizvietota ar fosfātgrupu. Galvenie fosfolipīdi, kas atrodami *S.cerevisiae* šūnās ir fosfatidilholīns, fosfatidiletanolamīns, fosfatidilinozitols un fosfatidilserīns (van der Rest *et al.*, 1995). Raugu citoplazmatiskā membrānā visvairāk pārstāvētas ir C-16 un C-18 taukskābes ar (nepiesātinātās taukskābes) vai bez (piesātinātās taukskābes) vienas dubultsaites, bet arī neliels daudzums tādu taukskābju kā C-14 un C-26 ir atrodamas. Steroli lielā mērā nosaka citoplazmatiskās membrānas plūstamību, kas savukārt ietekmē membrānas laterālo kustību un membrānas proteīnu aktivitāti, kā arī tie veido vidi, kurā var tikt ieslēgti polipeptīdi. Sterolu grupas būtiskākais pārstāvis raugu šūnās ir ergosterols. Tam ir nozīmīga loma membrānas darbībā, ietekmējot tās stingrību, stabilitāti un caurlaidību (van der Rest *et al.*, 1995; Abe and Hiraki, 2009). Glikolipīdi ir lipīdi, kas saistīti ar ogļhidrātu daļu, kas veido polāro galvu. Tiem ir augsta fazes pārejas temperatūra un tādējādi svarīga loma membrānas integritātes saglabāšanā. Papildus tam tie piedalās starpšūnu mijiedarbībā, kā receptoru komponenti, proteīnu uztvērēji un signālu pārnēses regulatori (Malhotra and Singh, 2005).

Otra lielā citoplazmatiskās membrānas komponentu grupa ir proteīni. Kopumā vairāk kā 1000 membrānas proteīni var tikt kodēti *S.cerevisiae* (Van der Rest *et al.*, 1995). Zināms, ka vairāki membrānas proteīnus kodējošie gēni ir sastopami daudzkārtīgās kopijās un ne visi šie proteīni tiks ekspresēti vienlaicīgi. Tādējādi faktiskais funkcionējošo membrānas proteīnu skaits būs mazāks. Pēc membrānas-proteīnu mijiedarbības izšķir divu veidu proteīnus – integrētos un perifēros proteīnus. Integrētajiem proteīniem ir viens vai vairāki segmenti, kas iegremdēti lipīdu dubultslānī un kontaktē ar membrānas hidrofobo daļu vai arī caurauž lipīdu dubultslāni pilnībā un tad tiek saukti par transmembranālajiem proteīniem. Perifērie proteīni nemijiedarbojas ar fosfolipīdu dubultslāņa hidrofobo daļu. Tie parasti ir saistīti netieši ar membrānu caur integrētajiem proteīniem vai tieši mijiedarbojoties ar lipīdu hidrofilajām daļām (Lodish *et al.*, 2000).

Membrānas proteīniem ir svarīga nozīme un tie var veikt tādas funkcijas kā: transports, enzimatiskā aktivitāte, signālu pārnese, šūnu atpazīšana, šūnu adhēzija un iekššūnas elementu (citoskeleta) piesaiste. Transporta proteīni membrānā veido vienu no

lielākajām proteīnu funkcionālajām kategorijām un raugos *S.cerevisiae* tos pārstāv vidēji 300 proteīni (Brohée, 2010).

Pastāv vairāki vielu transporta veidi caur citoplazmatisko membrānu: (i) pasīvais transports – pasīvā jeb vienkāršā difūzija un atvieglotā difūzija un (ii) aktīvais transports. Pasīvā transporta laikā savienojumi var izkļūt cauri membrānai bez enerģijas patēriņa. Savienojumu kustības virzienu nosaka koncentrācijas gradients vai elektriskā potenciāla gradients. Vienkāršākais mehānisms kā molekulas var šķērsot citoplazmatisko membrānu ir pasīvā difūzija. Šajā procesā nav iesaistīti membrānas proteīni un kustības virziens notiek koncentrācijas gradienta virzienā, t.i. no vietas kur ir lielāka molekulu koncentrācija uz vietu, kur ir mazāka koncentrācija. Pasīvā difūzija ir neselektīvs process, tomēr to var izmantot tikai mazas, relatīvi hidrofobas molekulas, tādas kā gāzes (O_2 un CO_2), hidrofobas molekulas un mazas polāras, bet nelādētas molekulas (H_2O un etanols). Lielākas nelādētas polāras molekulas, tādas kā glikoze, nespēj šķērsot membrānu pasīvās difūzijas ceļā, tāpat kā jebkura izmēra lādētas molekulas (ieskaitot mazos jonus - H^+ , Na^+ , K^+ un Cl^-). Šo molekulu transportā ir iesaistīti specifiski kanālu proteīni (Cooper, 2000).

Atvieglotā difūzija, tāpat kā pasīvā difūzija notiek koncentrācijas gradienta virzienā un lādētu molekulu gadījumā – lādiņa koncentrācijas virzienā, ko nosaka membrānas potenciāls, t.i. elektriskā lādiņa atšķirība abpus membrānai. Atšķirībā no pasīvās difūzijas, atvieglotās difūzijas gadījumā transports notiek ar speciālu proteīnu palīdzību. Tie pārnes savienojumu cauri membrānai, nodrošinot, ka tas nesaskaras ar lipīdu dubultslāņa hidrofobo daļu. Atvieglotā difūzija ļauj transportēt polāras un lādētas molekulas, tādas kā ogļhidrāti, aminoskābes, nukleozīdi un joni. Atvieglotās difūzijas transportā ir iesaistīti divu veidu transporta proteīni – pārnēsējproteīni un kanālproteīni. Pārnēsējproteīni saista transportējamo molekulu membrānas vienā pusē, izmainot telpisko struktūru, kas palīdz molekulai šķērsot membrānu un tikt atbrīvotai membrānas otrā pusē. Pārnēsējproteīni nodrošina atviegloto difūziju cukuriem (piem., glikoze), aminoskābēm un nukleozīdiem (Cooper, 2000). Ja proteīni transportē tikai vienu savienojumu, to sauc par uniportu. Ja transportē divus vai vairāk savienojumus vienā virzienā, tad par simportu, bet pretējos virzienos – antiportu. (Van der Rest *et al.*, 1995).

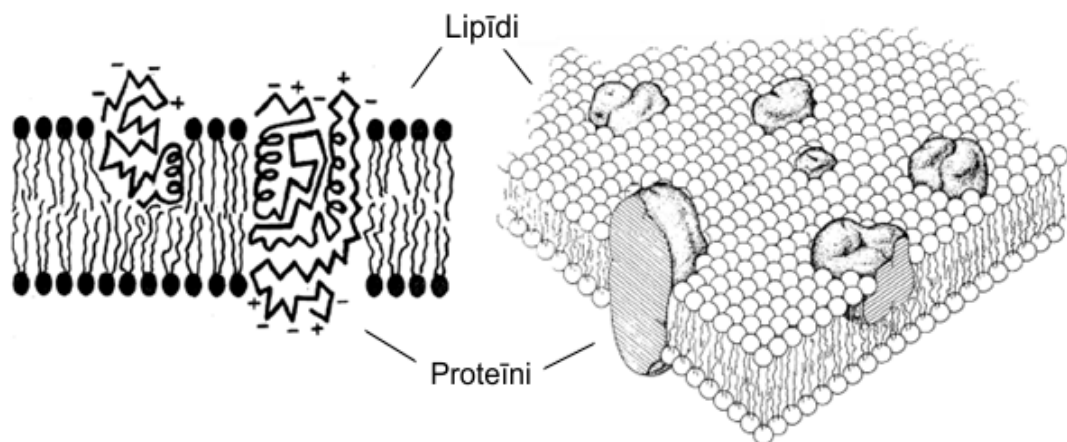
Kanālproteīni veido membrānā atvērtas poras jeb kanālus, kurus var brīvi šķērsot noteikta izmēra un lādiņa molekulas. Šie kanāli kalpo mazu molekulu un jonu transportam. Kanālus šūnas var izmantot aktīvākam ūdens transportam, tad tos dēvē par akvaporīniem. Tā kā kanālproteīni visbiežāk tiek izmantoti jonu transportam, tos dēvē arī par jonu kanāliem. Salīdzinot ar pārnēsējproteīnu transportu, jonu kanālus raksturo daudz lielāks plūsmas ātrums, augsta selektivitāte (piem., tikai Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , vai Cl^- transports) un tie nav pastāvīgi atvērti.

Kanāla atvēršanos var regulēt specifiski stimuli, piemēram, signālmolekulas piesaistīšanās vai elektriskā potenciāla izmaiņas (Cooper, 2000).

Aktīvā transporta gadījumā molekulas vai joni šķērso membrānu pret elektroķīmisko gradientu, t.i. no mazākās koncentrācijas uz lielāko. Šim transporta veidam ir nepieciešams enerģijas patēriņš (visbiežāk ATF hidrolīze) un to veic speciāli pārnēsējproteīni jeb sūkņi. Jonu sūkņi ir atbildīgi par gradienta uzturēšanu abpus membrānas un ir nozīmīgs transporta veids, kas izmanto ATF enerģiju. Pastāv trīs veidu sūkņi, kas izmanto ATF enerģiju – P tipa sūkņi, F tipa (vakuolās V tipa) un ABC tipa. (Bublitz, 2011). Pie P tipa sūkņiem pieder, piemēram, Ca^{2+} un H^+ sūkņi. Tā kā šiem sūkņiem ir arī ATF hidrolītiskas īpašības, tos bieži dēvē par ATFāzēm, piemēram, Ca^{2+} ATFāze. Parasti šie pumpji sastāv no divām subvienībām – katalītiskā α subvienība un mazāka β subvienība, kurai piemīt regulatoras funkcijas. F tipa sūkņi ir līdzīgi V tipa sūkņiem, taču sarežģītāki nekā P tipa. Tie sastāv no dažādu proteīnu subvienībām un izmanto rotācijas kustību. F tipa sūkņi ir zināmi arī kā ATF sintāzes, jo H^+ gradients abpus membrānai nodrošina ATF sintēzi no ADF un fosfāta. ja elektroķīmiskais gradients krītas, ATF sintāzes var darboties arī pretējā virzienā, hidrolizējot ATF un sūknējot H^+ (Alberts *et al.*, 2002). Sīkāk F tipa un V tipa sūkņu uzbūve aprakstīta nodaļās „Mitohondriji” un „Vakuola”. Lielākā daļa proteīnu, kas darbojas aktīvajā transportā pieder pie ABC tipa transportieriem. Tie satur divus ATF saistošus domēnus un vielu transports notiek mainoties sūkņa konformācijai pēc ATF piesaistes. Pēc pārnesei sekojošas ATF hidrolīzes, sūknis atgūst sākotnējo struktūru (Lodish *et al.*, 2000). Šie sūkņi var transportēt jonus, smagos metālus, ogļhidrātus, pretvēža zāles, aminoskābes, fosfolipīdus, steroīdus, glikokortikoidus, mikotoksīnus, antibiotikas, pigmentus, peptīdus un proteīnus. Papildus transporta funkcijām tie var kalpot arī kā kanālu regulatori, proteāzes un receptori (Bauer *et al.*, 1999).

Šūnu membrānu strukturālās uzbūves aprakstīšanai ir tikuši piedāvāti dažādi modeļi. 1925. gadā Gorter un Grendel veiktajos eksperimentos secināja, ka šūnu membrānas sastāv diviem pretējiem molekulāriem slāņiem, kā rezultātā tika secināts, ka divi lipīdu slāņi veido dubultslāni, kurā polārās galvas grupas izvirzītas pret ūdens vidi, bet hidrofobās-astes daļas uz iekšpusi. Pirmais molekulārais modelis, kas atainoja membrānu sastāvā iekļautus proteīnus tika izveidots pēc Danielli and Davson (1935) pētījumiem. Pēc šī modeļa, membrānas lipīdu dubultslānis atradās starp diviem proteīnu slāņiem. Attīstoties elektronu mikroskopijas iespējām, Robertsons (1959) veica membrānu mikroskopiskās analīzes, kas kopumā apstiprināja Gorter un Grendel, kā arī Danielli un Davson veiktos pētījumus, norādot, ka proteīnu slāņi ir absorbēti lipīdu dubultslānī. Attīstoties tehnikas iespējām, 1972.gadā Singer un Nicolson piedāvāja leģendāro standartmodeli, kas tiek saukts kā šķidrās mozaīkveida

modelis. Šis modelis apraksta membrānu sastāvošu no homogēna lipīdu dubultslāņa un proteīniem, kas var atrasties uz virsmas vai būt iegremdēti membrānā, kā arī brīvi difundēt laterālajā dimensijā (skat.4. att.).



4.attēls. Singer un Nicolson (1972) šķidrās mozaikveida modelis (Heimburg, 2007)

Vēlāk pētījumi parādīja, ka lipīdi un proteīni nav homogēni sadalīti membrānā. 1984. gadā Mouritsen un Bloom piedāvāja „matrača” modeli, kas norāda, ka starp proteīniem un lipīdiem var veidoties spēki, kas var radīt spriegumu starp plaknēm un radīt izliekumus vai sablīvējumus (Heimburg, 2007). 1997.gadā Simons un Ikonen izvirzīja lipīdu plostu hipotēzi, kurā membrānu veido dažādi lipīdi ar atšķirīgu uzbūvi un fāzu pārejām, kā rezultātā tie nevar perfekti sakrist un tādējādi veido laterālu neviendabīgumu (Simons and Ikonen, 1997). Pamatojoties uz šo hipotēzi, membrānā līdzpastāv šķidrā-nesakārtotā fāze, ko veido galvenokārt nepiesātinātie fosfolipīdi un šķidrā-sakārtotā fāze, ko veido piesātinātie fosfolipīdi, sfingolipīdi un steroli (Simons and Ikonen, 1997; Owen and Gaus, 2013).

1.1.3. Citoplazma

Citoplazma aizpilda iekšsūnas telpu, ko noslēdz citoplazmātiskā membrāna. Tās galvenā sastāvdaļa ir citosols un tajā atrodamas ar membrānu klātas šūnas organelas, kā arī citi veidojumi. Raugu citoplazma ir ūdeņains, nedaudz skābs (pH 5,2) koloidāls šķīdums, kas satur dažādus gan neorganiskus, gan organiskus savienojumus un makromolekulas, kā, piemēram, proteīni, nukleīnskābes un glikogēns (Feldmann, 2012). Lielai daļai citoplazmā esošajiem proteīniem piemīt enzimatiskā aktivitāte un tie ir iesaistīti daudzos svarīgos metabolisma ceļos, piemēram, glikolīzē vai taukskābju sintēzē. Citoplazma satur arī dažādus ieslēgumus, kā, piemēram, glikogēns uzkrājas citoplazmā mazu granulu veidā, un kalpo kā enerģijas rezerves. Raugos glikogēns veidojas oglekļa, slāpekļa, fosfora vai sēra limitētos

apstākļos (Wilson *et al.*, 2010). Lipīda granulas uzkrājas aerobos apstākļos, kad augšanas vide ir bagāta ar oglekli (Briggs *et al.*, 2004). Tās satur hidrofobu centru, sastāvošu no triacilglicerola un sterolu esteriem, un tās apņem membrāna, sastāvoša no fosfolipīdiem un proteīniem. (Leber *et al.*, 1994). Noskaidrots, ka ne tikai endoplazmatiskais tīkls un mitohondriji, bet arī Goldži komplekss un lipīdu granulas piedalās fosfolipīdu sintēzē (Daum *et al.*, 1998). Tika uzskatīts, ka lipīdu granulas kalpo kā sterolu glabātuve, no kurienes tie var tikt transportēti uz membrānām nepieciešamības gadījumā (Leber *et al.*, 1995). Tomēr pētījumi rāda, ka lipīdu granulu nozīme ir daudz komplicētāka. Tajās konstatēts arī liels daudzums sterolu biosintēzes enzīmu, kā, piemēram, glicerofosfāta aciltransferāze un skvalēna epoksidāze. No visiem šūnas skvalēna epoksidāzes proteīniem 62% atrodami endoplazmatiskajā tīklā un 38% lipīdu granulās. Proteīna relatīvais daudzums starp endoplazmatisko tīklu un lipīdu granulām mainās šūnas dzīves cikla laikā. Noskaidrots, ka lipīdu granulās esošais enzīms pats nav aktīvs un endoplazmatiskais tīkls satur faktoros tā aktivēšanai. Tādējādi nepieciešams tuvs kontakts starp lipīdu granulām un endoplazmatisko tīklu sterolu biosintēzes nodrošināšanai (Leber *et al.*, 1998).

Visu citoplazmu caurauž proteīnu tīklojums, ko sauc par citoskeletu. Tā funkcijas ir sekojošas: citoskelets (1) nosaka šūnu morfoloģiju un tās izmaiņas (morfoģenēze); (2) nodrošina šūnas polaritāti; (3) nodrošina strukturālo atbalstu un mehānisko izturību citoplazmai; (4) kalpo kā noenkurošanās vieta biomolekulām, multimolekulāriem kompleksiem, šūnas organelām, kodola un plazmas membrānai; (5) ir atbildīgs par šūnas kustību un (6) saistīts ar transporta procesiem.

Citoskeletu veido trīs veidu pavedieni – aktīna filamentu, mikrotubuļu un starpfilamentu (Alberts *et al.*, 2002). Starpfilamenti ir atbildīgi par mehānisko noturību un šūnas telpisko organizāciju. Mikrotubuļu nosaka membrānā ieslēgto organelļu pozīciju un tiešo intracelulāro transportu. Aktīna filamentu nosaka šūnas virsmas formu, piedalās šūnas kustībās, endocitozē un vezikulārajā transportā. Starpfilamentu veidojošās subvienības ir pavedienveida, bet aktīna filamentu un mikrotubuļu – globulāras. Filamentus savā starpā un ar citām šūnām saista liels daudzums palīgproteīnu, kā, piemēram, aktīnu saistošie proteīni, filamentus stabilizējošie proteīni, motorie proteīni u.c.

Pamatojoties uz Ling (Ling, 2001) AI hipotēzi (*angl.* AI hypothesis; association-induction hypothesis) citoskelets ir šūnas matricas sastāvdaļa un tādējādi papildus klasiskajām iepriekš uzskaitītajām funkcijām citoskeletam var būt sekojoša nozīmība: (1) citoskeleta proteīni kopā ar šūnas matricas proteīniem nosaka un kontrolē jonu un mazo organisko molekulu intracelulāro koncentrāciju šūnā; (2) šūnas tilpuma kontrole ir atkarīga no šūnas matricas proteīnu konformācijas, nevis vienkārši saistīta ar osmozi. Citoskeleta kontrakcijas-

relaksācijas cikli izmaina šūnas ūdens daudzumu. Tas rada izmaiņas jonu selektivitātē un sekojoši izmaina jonu un metabolītu koncentrācijas, kas savukārt izmaina reakciju ātrumu, tādējādi ietekmējot šūnas metabolismu kopumā; (3) citoskelets piedalās proteīnu-ūdens-jonu kompleksu fāzu izmaiņās, tādējādi piedaloties šūnas mehāniskajos, elektriskajos un ķīmiskajos procesos. Filamentu un mikrotubuļu konformācijas izmaiņas ir saistītas ar ūdens struktūras un jonu izkārtojuma izmaiņām. Tādējādi proteīnu-ūdens-jonu komplekss uz signāliem reaģē kā viens veselums; (4) citoskelets veido mehānisko saskaņotību. Tas ir trīsdimensionāls ansamblis, ko veido kompresijas rezistenti balsti (mikrotubuļi), kas savstarpēji saistīti ar nospriegotiem elementiem (filamentiem). Tādējādi pat miera stāvoklī citoskelets uzglabā mehānisko enerģiju, kā rezultātā tas ir ļoti jūtīgs pat pret vājākajām ārējām mehāniskām iedarbībām; (5) citoskeletā pastāv elektriskā un jonu koherence. Starp mikrotubuļiem un filamentiem pastāvošās saskaņotās strāvas plūsmas saistītas ar informācijas apstrādi un darbības potenciāliem. Mikrotubuļi var kalpot kā biopolimēru tranzistori, kas spējīgi pastiprināt elektriskos signālus; (6) tā kā enzīmu kompleksi, kanāli, receptori, RNS un ribosomas var saistīties ar citoskeletu, tad tiek radīta arī to elektriskā mijiedarbība caur mehāniski-ķīmiskajām un elektro-ķīmiskajām mijiedarbībām; (7) pastāv hipotēzes, ka citoskelets saistīts ar elektromagnētisko jūtību, saistībā ar mikrotubuļu cilindrisku formu, kas piemērota struktūru veidošanai ar ūdeni, kas varētu vadīt un emitēt ultra vāju, koherentu starojumu. Tādējādi mikrotubuļu sistēma, saistībā ar citām citoskeleta daļām un membrānas komponentiem ir uzskatāma par reāla laika kvantu nanoprosesoru, kas ir nozīmīgs elements informācijas apstrādē un visas šūnas darbībai kopumā. (Jaeken, 2007).

1.1.4. Kodols

Kodols ir centrālā organella šūnā, kas regulē tās darbību. Kodolu veidojošie elementi ir apvalks, nukleoplazma, matrikss ar tajā atrodamajiem molekulārajiem kompleksiem un hromatīns.

Apvalku veido dubultā membrāna. Tā sastāv no kodola apvalka ārējās membrānas, kas saskaras ar citoplazmu, endoplazmatisko tīklu, saistīta ar citoskeletu un bieži noklāta ar ribosomām un kodola apvalka iekšējās membrānas, kas saskaras ar nukleoplazmu. Abām membrānām ir līdzīga lipīdu uzbūve, bet atšķirīga proteīnu kompozīcija. Membrānas savā starpā ir atdalītas ar perinukleāro telpu, bet savienotas caur porām, kuru malās abas membrānas saplūst (D'Angelo and Hetzer, 2006). Kodola poru komplekss sastāv no cilindriskas formas kanāla, ko veido centrālais gredzens, sastāvošs no proteīniem. To apņem lielāks gredzens perinukleārajā telpā. Centrālais gredzens no citoplazmas puses ir saistīts ar

citoplazmatisko gredzenu, bet no nukleoplazmas puses ar kodola gredzenu. Abi gredzeni ir saistīti ar filamentiem, kas veidoti no proteīniem. Citoplazmātiskajiem filamentiem ir brīvi gali, savukārt kodola iekšpusē filamentu ir saistīti ar terminālo gredzenu, kas kopā veido struktūru, ko dēvē par nukleāro groziņu (D'Angelo and Hetzer, 2008). Rauga šūnās kodola poru kompleksu molekulārā masa sastāda ~40–60 MDa un to analīze parādīja, ka tie satur ~30 dažādus proteīnus, ko sauc par nukleoporīniem. (D'Angelo and Hetzer, 2008). Joni un mazas molekulas (<40 kDa) poras šķērso pasīvās difūzijas ceļā, savukārt liela izmēra molekulas, tādas kā DNS vai RNS – aktīvā transporta ceļā, saistoties ar specifiskiem receptorproteīniem (Mosammaparast and Pemberton, 2004). Transporta receptoru grupas, kas importē molekulas kodolā sauc par importīniem (α , β proteīni). Receptori, kas eksportē molekulas ārā no kodola sauc par eksportīniem (Mosammaparast and Pemberton, 2004). Aktīvo vielu transportu regulē GTFāze Ran, kas eksistē GTF saistītā stāvoklī kodolā un GDF saistītā stāvoklī citoplazmā. Importīns β ar transportējamo savienojumu piesaistās poru kompleksa proteīniem, mainoties savienojuma konformācijai. Kodolā importīns β saistās ar GTFāzi Ran, kā rezultātā atbrīvo transportējamo savienojumu. Saistītais importīns ar GTFāzi Ran tiek transportēts caur poru uz citoplazmu, kur aktivējošais proteīns RanGAP hidrolizē GTF. GTFāze Ran pāriet GDF stāvoklī, atbrīvojot importīnu β jaunam ciklam. Regulātori (RanGEF kodolā un RanGAP citoplazmā) rada GTF āzes Ran un GDFāzes Ran atšķirīgu gradientu starp kodolu un citoplazmu, kā rezultātā nosaka savienojumu transporta virzienu (Aitchison and Rout, 2012).

Kodola iekšpuse ir pildīta ar nukleoplazmu, kurā atrodas proteīnu tīklojums, kas veido kodola matriksu. Kodola matriksā atrodami molekulāro kompleksu veidojumi, kā, piemēram, Kahala ķermenīši, splaisosomas un kodoliņš. Tāpat ir klātesošas mazās kodola RNS (*angl.* snRNA ; small nuclear RNA) un mazie kodola ribonukleoproteīni (*angl.* snRNP; small nuclear RNP), kā arī heterogēnās kodola RNS, kas ir prematricas RNS (pre-mRNS) apkopojums (Zimber *et al.*, 2004).

Kahala ķermenīšu diametrs ir vidēji 0.2–1.0 μ m. Tie satur enzīmus specifiskai nukleotīdu hidrolīzei, kā arī snRNP un snRNS. Tāpat tiek uzskatīts, ka Kahala ķermenīšiem ir nozīmīga loma post-transkripcionālā RNS metabolismā (Zimber *et al.*, 2004).

Splaisosomas ir dinamisks piecu snRNS un liela skaita proteīnu apkopojums, kas saistīts ar transkripciju, pre-mRNS pārveides procesu – splaisingu un matricas RNS eksportu no kodola (Reed , 2003; Will and Lührmann, 2011).

Kodoliņš veidojas ap rRNS gēniem un tā primārā funkcijas ir rRNS sintēze un ribosomu subvienību veidošanās. Tāpat kodoliņā atrodami proteīni, kas saistīti ar šūnas dzīves cikla kontroli, DNS replikāciju, replikāciju, vielu transportu starp kodolu-citoplazmu, ieskaitot RNS un pre-ribosomālo daļiņu eksportu un ribosomālo proteīnu importu. Kodoliņa

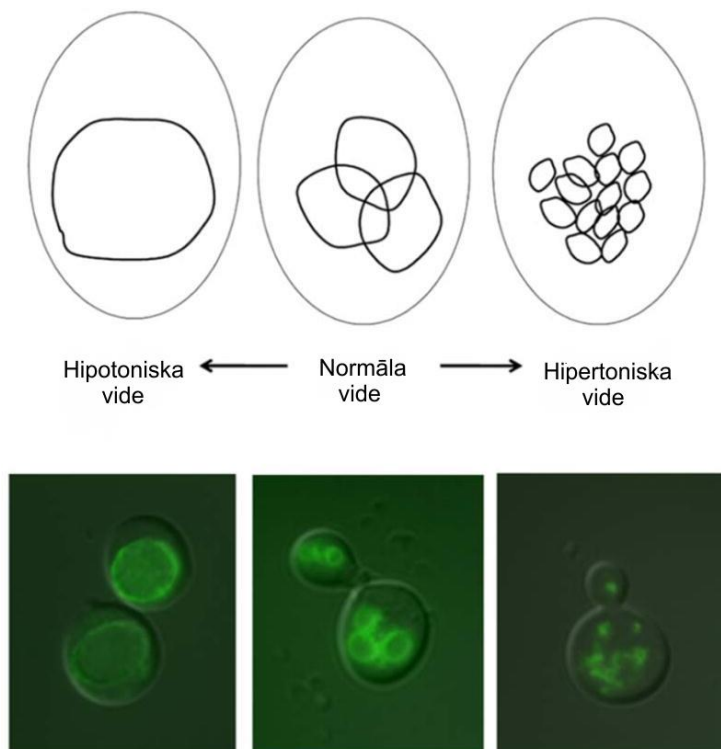
ultrastruktūra sastāv no 3 daļām – fibrilārie centri, blīvā fibrilārā daļa un granulārā daļa, kurā atrodamas preribosomu daļiņas (Zimmer *et al.*, 2004).

Tā kā kodols regulē šūnas darbību, tajā atrodas lielākā daļa šūnas ģenētiskā materiāla. Rauga kodols satur 16 hromosomas, izmērā 230 – 1500 kb un 100 – 200 ribosomālo gēnu kopijas (Zimmer and Fabre, 2011). Kopumā rauga genoms sastāv no vairāk kā 6000 gēniem (Kumar *et al.*, 2000). Lai visu šo genomu varētu ieslēgt kodolā, DNS tiek ļoti spiralizēts. DNS ir saistītas ar proteīniem veidojot nukleosomu virkni. Tai savijoties izveidojas hromatīna pavediens, kas ar daudzām spirālēm un cilpām veido hromosomu struktūru (Zimmer and Fabre, 2011).

1.1.5. Vakuola

Raugu vakuolas ir skābas vides organellas, kurām ir daudz līdzības ar zīdītāju lizosomām (Armstrong, 2010, Klionsky *et al.*, 1990). Abas organellas veic makromolekulu hidrolītisku šķelšanu, bojātu vai jau novecojušu šūnas daļu noārdīšanu, kā arī stresa apstākļos, piemēram, badošanās laikā noārda atsevišķas šūnas daļas, tādējādi apgādājot šūnu ar nepieciešamajām vielām. Lizosomālais vides pH ir vidēji 4,5 – 5, vakuolārais pH 5 – 6,6, atkarībā no augšanas apstākļiem. Tomēr atšķirībā no lizosomām, vakuolas uzņem sevī dažādas vielas, tādas aminoskābes, metāla joni, metabolisma produkti, tādējādi veic uzglabāšanas un detoksifikācijas funkcijas līdzīgi kā augu vakuolas. Vakuolas ir atbildīgas arī par ūdens un dažādu jonu transportu stresa apstākļos un osmotiskā vai jonu stresa laikā vakuolām ir jāspēj nepieciešamības gadījumā saplūst vai fragmentēties. Vakuolu membrānu saplūšana vai dalīšanās ir nepieciešama, lai regulētu vakuolas izmēru. Osmotiskā stresa laikā vakuola fragmentējas daudzos mazos pūslīšos, bet pakļaujot šūnu hiposmotiskam stresam vakuola palielinās. Šīs izmaiņas izmērā atbilst ūdens un jonu uzņemšanai vai atbrīvošanai no vakuolas (Li and Kane, 2009). Pētījumi rāda, ka vakuola piedalās tūlītējā osmoregulācijas procesā, nodrošinot šūnas izdzīvošanu līdz glicerīna akumulācija atļauj šūnu funkcionēšanu osmotiski nelabvēlīgos apstākļos (Latterich, 1993). Vakuolas izmaiņas šūnā osmotiskās iedarbības ietekmē attēlotas 5.attēlā.

Tā kā vakuola ir organella ar degradācijas īpašībām, tā satur lielu daudzumu dažādas hidrolāzes. Vislabāk raksturotās no tām ir proteināze A, proteināze B, karboksipeptidāze Y, karboksipeptidāze S, aminopeptidāze I, aminopeptidāze Co, dipeptildiaminopeptidāze B, sārmainā fosfatāze, RNāze un α -mannozidāze (Klionski *et al.*, 1990). Vakuolu hidrolāžu līmenis mainās atkarībā no augšanas apstākļiem un augšanas fāzes. Šūnas stacionārajā fāzē hidrolāžu daudzums vakuolā sasniedz maksimumu.



5.attēls. Vakuolārā morfoloģija dažados augšanas apstākļos (Li and Kane, 2009)

Autofāģija tiek aktivēta barības vielu, galvenokārt oglekļa un slāpekļa trūkuma apstākļos, lai nodrošinātu papildus resursus šūnai bada laikā, veicot proteīnu un organelu degradāciju. Galvenokārt novērojama makroautogrāfija – dubultas membrānas pūslīši sauktas autofagosomas ietver sevī vielas no citoplazmas. Autofagosomas saplūšana ar vakuolu atbrīvo materiālu, kur tas tiek apstrādāts ar hidrolāzēm un tad atbrīvots atpakaļ citoplazmā. Barības vielas bagātos apstākļos autofāģija ir inhibēta ar Tor kināzes palīdzību. Badojoties Tor tiek inaktivēts un tādējādi autofāģija tiek aktivēta (Li and Kane, 2009).

Vakuolas ir galvenā uzglabāšanas vieta aminoskābēm, fosfāta, Ca^{2+} un metāla joniem. Visvairāk tiek uzkrātas neitrālās un bāziskās aminoskābes, daudz mazākos daudzumos skābās aminoskābes. Tāpat vakuola satur augstu koncentrāciju fosfāta, kas tiek glabāts polifosfāta formā. Tas kalpo kā fosfāta avots, kā arī veicina pozitīvi lādētu jonu un aminoskābju uzņemšanu un aizturēšanu. Vakuola ir iesaistīta arī kalcija līmeņa regulēšanā. Kalcijs ir galvenā signālmolekula šūnā un tās atbrīvošana no vakuolas osmotiskā stresa laikā ir saistīta ar atbildes reakciju aktivēšanu šūnā.

Vakuola piedalās arī metāla jonu uzglabāšanā un detoksifikācijā. Metālu nepietiekamības gadījumā, vakuolā uzglabātie metāli var tikt saistīti ar specifiskiem transportieriem un utilizēti metaboliskajos procesos. Papildus tam, metālu eksports no citoplazmas uz vakuolu var palīdzēt novērst metālu toksicitāti. Cinka transportu raugos nodrošina Zrc1, kobalta – Cot1 un dzelzs – Ccc1 transportieris. Raugu mutanti, kuri nav

spējīgi uzglabāt metālus vakuolās, vai arī nesatur metālu transportierus, uzrāda jutību pret augstām metālu koncentrācijām, pamatojot to toksicitāti palielinātos daudzumos citoplazmā (Lin *et al.*, 2008).

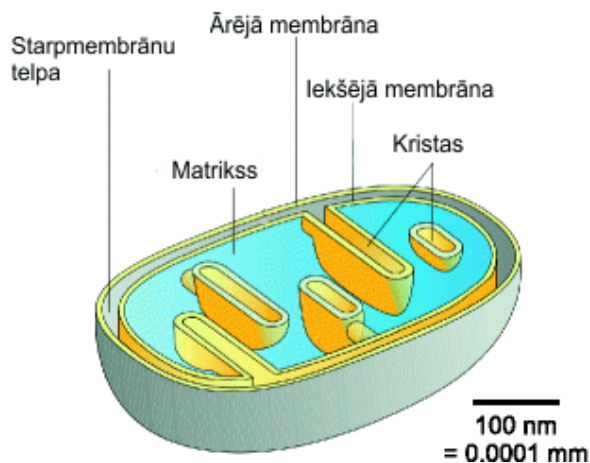
Papildus uzglabāšanas funkcijai, vakuola veic detoksifikācijas funkciju, nošķirot dažādas toksiskas molekulas no citoplazmas un citām organellām. Daži šādi toksīni ir barības vielas vai metabolīti, kuriem ir svarīgas funkcijas fizioloģiskās koncentrācijas, bet kad to koncentrācija ir palielināta, paliek toksiski, kā arī toksiski metāli, tādi kā arsenīts vai kadmijs (Li and Kane, 2009).

Lai visas funkcijas vakuolās normāli noritētu, nepieciešama vakuolu paskābināšana. Centrālo lomu šajā procesā ieņem, protonu pumpis, vakuolārā ATFāze (V-ATFāze), kuras primārā loma ir protonu transports no citoplazmas, izmantojot ATF enerģiju, kā rezultātā pazeminās organellas vides pH. V-ATFāzes ir enzīmi, kas veidoti no perifēra kompleksa V_1 , kas piesaistīts pie membrānas saistīta kompleksa V_o . V_1 domēns satur astoņas subvienības ar sekojošām funkcijām – A (ATF hidrolīze), B (regulatorā funkcija), C (stators), D (rotors), E (stators), F (rotors), G (stators), H (stators), savukārt V_o satur sešas subvienības, kas aprakstītas kā a (protonu pora, stators, šķirošana), c (protonu pora, rotors), c' (protonu pora, rotors), c'' (protonu pora, rotors), d (rotors) un e (funkcija vēl nav noskaidrota) (Kane, 2006). V_1 domēns ir atbildīgs par ATF hidrolīzi, savukārt V_o par protonu translokāciju. ATF hidrolīze (A subvienība) rada centrālās struktūras (D un F subvienības) rotāciju, kas savukārt pārnes rotāciju uz c subvienību gredzenu, nodrošinot protonu transportu (Kane, 2006). V-ATFāzes fizioloģiskā nozīme galvenokārt tika izpētīta izmantojot mutantu celmus, kuros tās aktivitāte ir izslēgta. Pirmo reizi tika noteikts, ka V-ATFāzes zudums rada pH atkarīgu letalitāti t.i. mutantu celmi nebija spējīgi izdzīvot pie pH 7 vai augstāka, bet varēja izdzīvot pie pH 5 līdz 5,5 (Nelson and Nelson, 1990). Tika parādīts, ka mutanti, kas ir jutīgi pret augstām ekstracelulārā kalcija koncentrācijām un nevarēja fermentēt oglekļa avotus, saturēja defektīvas V-ATFāzes (Ohya *et al.*, 1991). V-ATFāzes aktivitātes zudumu raksturo ne tikai pH atkarīga augšana un kalcija jutība, bet arī jutība pret smagajiem metāliem, kā arī mutanti pie vides pH 5 auga daudz lēnāk nekā savvaļas celms. Papildus tam, mutantu šūnās tika novērotas šūnas sienas uzbūves un funkciju, citoskeleta uzbūves un fosfolipīdu sastāva izmaiņas (Kane, 2006).

1.1.6. Mitohondriji

Mitohondriji ir šūnu organellas (skat.6.att.), kas atdalītas no citoplazmas ar 2 membrānām (ārējā un iekšējā membrāna) starp kurām atrodas starpmembrānu telpa.

Mitohondriju iekšējā membrāna veido krokas jeb kristas. Mitohondriju iekšpusē atrodas matrikss. (Kühlbrandt, 2015).



6.attēls. Mitohondriju uzbūve (Kühlbrandt, 2015).

Starpmembrānu telpa ir vidēji 20 nm plata atstarpe starp ārējo un iekšējo membrānu (Kühlbrandt, 2015). Tās sastāvs un pH ir ļoti līdzīgs citoplazmas. Starpmembrānu telpā notiek oksidatīvā fosforilēšana, kā arī protonu uzkrāšana. Tajā atrodas arī citohroms c, kas piesaistīts pie iekšējās membrānas. Ārējā membrāna ir poraina un to var brīvi šķērsot mazas molekulas un joni, pateicoties kanālporoteīniem - porīniem. Lielākas molekulas, piemēram, proteīni pārvietojas ar speciālu proteīnu kompleksu – translokāžu – palīdzību. Tā kā ārējai membrānai ir liela caurlaidības spēja, potenciāla gradients abpus membrānai neveidojas, atšķirībā no iekšējās membrānas. Iekšējai membrānai ir zema caurlaidība un augsta selektivitāte. Caur iekšējo membrānu brīvi spēj difundēt oglekļa dioksīds, skābeklis un ūdens, citos gadījumos darbojas specifiski membrānas transporta proteīni. Nozīmīgākie kompleksi ārējās membrānas šķērsošanai ir TOM (*angl.* translocase of outer mitochondrial membrane), bet iekšējās – TIM (*angl.* translocase of inner mitochondrial membrane) (Kühlbrandt, 2015). Proteīni, kas šķērso TOM kompleksu tālāk var tikt (i) integrēti ārējā mitohondriju membrānā, iesaistoties SAM kompleksam (*angl.* sorting and assembly machinery of the outer membrane) (ii) integrēti iekšējā mitohondriju membrānā, (iii) transportēti uz mitohondriju matriksu. Proteīnu stabilitāti transporta laikā un pareizas konformācijas veidošanos pēc iekļūšanas mitohondriju matriksā nodrošina molekulārie šapeironi, tādi kā Hsp 70 (Wiedemann *et al.*, 2004).

Pateicoties iekšējās membrānas jonu selektivitātei, abpus membrānai veidojas protonu gradients, kas nepieciešams oksidatīvajai fosforilēšanai. Oksidatīvās fosforilēšanas laikā, elektroni, kas saņemti no NADH un FADH₂ savienojas ar pēdējo elektronu akceptoru

(elpošanas ķēdē – O_2) un atbrīvotā enerģija no šīm oksidācijas/redukcijas reakcijām tiek izmantota ATF sintēzei. Elektronu pārnese līdz pēdējam elektronu akceptoram notiek iesaistoties vairākiem pārnēsējiem, kas veido elektronu transporta ķēdes jeb elektronu pārnēses kompleksus. Šie pārnēsēji ir organizēti četros proteīnu kompleksos (I, II, III un IV), kas lokalizēti iekšējā membrānā, kas veido kristas. Elektronu pārnēsē starp kompleksiem ir iesaistīti arī divi nelieli pārnēsēji – koenzīms Q un citohroms c. Elektronu transports caur kompleksiem I, III un IV ir saistīts ar protonu pārnēsi no matriksa uz starpmembrānas telpu. Kompleksi I un III katrs pārnēs 4 protonus uz vienu elektronu pāri, IV kompleksā – 2 protonus uz vienu elektronu pāri, un vēl 2 protoni mitohondriju matriksā saistās ar O_2 veidojot H_2O (Cooper, 2000).

Piektais proteīnu komplekss ir ATF sintāzes, kurā uzkrātā enerģija tiek izmantota ATF sintēzei no ADF un fosfāta mitohondriju matriksā. ATF sintāze sastāv no F_o un F_1 kompleksa. F_o komplekss ir iegremdēts membrānā, savukārt F_1 komplekss izvirzīts mitohondriju matriksā. Raugu šūnās F_1 komplekss satur subvienības α , β , γ , δ un ϵ ; F_o komplekss - a, b, c, f, d; OSCP, ATP8 un h. F_o komplekss veido kanālu, savukārt F_1 daļā novietoti aktīvie centri ATF sintēzei. Protoni šķērsojot F_o kompleksu elektroķīmiskā gradienta virzienā rada c subvienību veidota gredzena rotāciju. Tas savukārt rada γ subvienības rotāciju, kas sekojoši rada β subvienību konformācijas izmaiņas, izraisot ADF un fosfāta saistīšanu un ATF sintēzi (Stock *et al.*, 1999).

Metaboliski aktīvās šūnās, protoni tiek transportēti ārā no matriksa, radot protonu gradients abpus membrānai, kā rezultātā matriksa pH ir augstāks nekā starpmembrānu telpā vai citoplazmā vidēji par vienu pH vienību un sastāda apmēram pH 8 (Llopis *et al.*, 1998), citi pētījumi rāda, ka starpība starp citoplazmas pH un mitohondriālo pH ir 7,2 un 7,5 attiecīgi (Oriji *et al.*, 2009). Papildus daļībai ATF sintēzē, mitohondriju matriksā notiek arī tādi procesi, kā piruvāta oksidatīvā dekarboksilēšana, taukskābju β oksidācija, trikarbonskābju cikls, kā arī vielmaiņas produktu noārdīšana līdz CO_2 un H_2O . Papildus matriksā var uzkrāties tādi joni, kā Ca^{2+} un Mg^{2+} , veidojot granulas. Mitohondriju matriksā atrodas DNS un ribosomas, kā arī nepieciešamie enzīmi replikācijai, transkripcijai un proteīnu biosintēzei (Kühlbrandt, 2015).

Mitohondriālais DNS (mtDNS) pēc uzbūves ir līdzīgs prokariotu DNS, veidojot gredzenveida dubultspirāli. mtDNS ir saistīti ar mitohondriju saplūšanu vai dalīšanos un to replikācija notiek neatkarīgi no kodola DNS. Katra šūna satur 50 – 100 mtDNS kopijas, kas organizēts nukleoproteīnu struktūrās, ko dēvē par nukleoīdiem. mtDNS kodē elpošanas ķēdes svarīgas subvienības, mitohondriālās ribosomas vienu proteīnu un divas RNS subvienības, kā arī 24 tRNS un ribonukleāzes P subvienību (Osman *et al.*, 2015).

1.1.7. Ribosomas

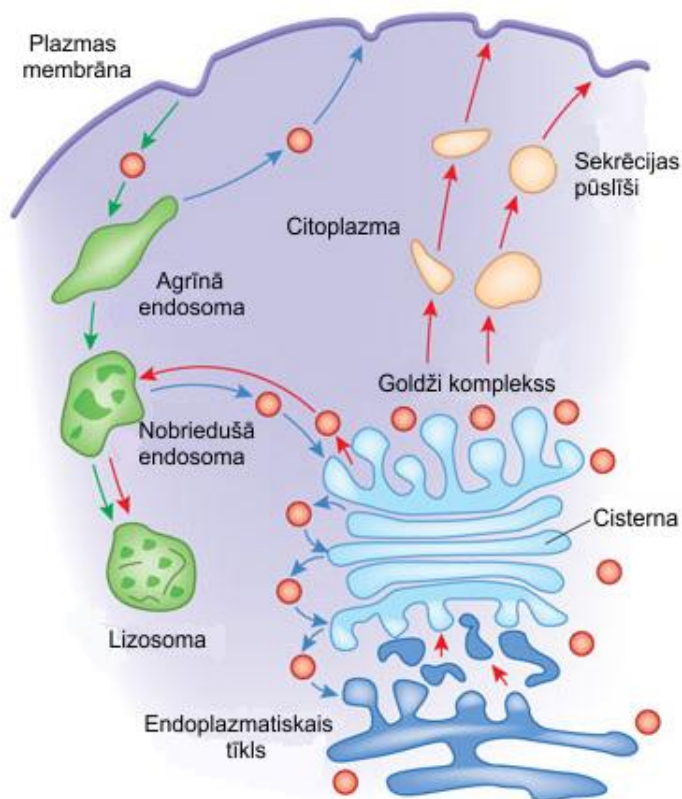
Ribosomas ir šūnas organelas, kas katalizē proteīnu sintēzi. Tās sastāv no divām ribonukleoproteīnu subvienībām. Mazā, 40S subvienība raugu šūnās satur 1 rRNS un 33 dažādus ribosomālos proteīnus. Lielā, 60S subvienība satur 3 rRNS un 46 ribosomālos proteīnus. Mazā subvienība ir centrs, kas savieno kopā mRNS un tRNS, savukārt lielā subvienība saistīta ar reakcijām, kas katalizē peptīdu saites veidošanos (Woolford and Baserga, 2013). Katra mRNS, kas kodē ribosomālo proteīnu, vispirms tiek transportēta uz citoplazmu. Izveidojušies ribosomālie proteīni tiek importēti uz kodolu un tam sekojoši kodoliņū, kur tie asociē ar jauno sintezēto rRNS, veidojot preribosomas. Tās iziet dažādus modifikācijas etapus, tā saukto procesēšanu, pirms tiek eksportētas uz citoplazmu, kur piedalās translācijas procesā. Aktīvi augošā raugu kultūrā, šūnas dubulto savu ribosomālo sastāvu katras 1,5 st un katra šūna minūtē importē vidēji 150 000 ribosomālos proteīnus cauri kodola membrānai (Aitchison and Rout, 2000).

1.1.8. Endoplazmatiskais tīkls un Goldži komplekss

Endoplazmatiskais tīkls ir no lipoproteīnu membrānām veidots pūslīšu un kanāliņu tīklojums. Tas aizsākas pie kodola apvalka un caurauž citoplazmu. Šī sistēma nav stacionāra un sadala citoplazmu kompartmentos, kuros var notikt atšķirīgas ķīmiskas reakcijas, kā arī savstarpēji saista dažādas šūnas daļas. Endoplazmatiskā tīkla nodalīto dobuma daļu sauc par lūmenu un tas var aizņemt vidēji 10 % no visas šūnas tilpuma. Izšķir gludo un graudaino endoplazmatisko tīklu. Graudainais endoplazmatiskais tīkls transportē dažādus savienojumus pa šūnu, uzkrāj vielas, kuras ir nepieciešamas citiem šūnas rajoniem vai arī tās izvada ārā no šūnas ar sekrēcijas pūslīšu palīdzību. Graudainais endoplazmatiskais tīkls ir noklāts ar ribosomām, tādējādi tajā notiek proteīnu biosintēzes procesi. Sintezētie proteīni var palikt tīklā kā membrānas proteīni, vai arī tikt transportēti uz citām šūnas daļām. Gludais endoplazmatiskais tīkls nav saistīts ar ribosomām un tas sintezē šūnai nozīmīgus lipīdus, piemēram, fosfolipīdus, kā arī oligosaharīdus, piedalās detoksifikācijas procesā, kā arī uzkrāj un atbrīvo Ca^{2+} , kas saistīts ar iekššūnas signālu sistēmu (Preuss *et al.*, 1991; Cooper, 2000, Csala *et al.*, 2006).

Strukturāli un funkcionāli endoplazmatiskais tīkls ir saistīts ar Goldži kompleksu. Goldži komplekss piedalās šūnas ieslēgumu veidošanā, polisaharīdu, ogļhidrātu un lipīdu sintēzē un modifīcēšanā, šūnas membrānas veidošanā, ūdens daudzuma regulācijā šūnā. Goldži komplekss ir veidots no diska formas membrānām, ko sauc par cisternām. Pa

endoplazmatiskā tīkla kanāliem plūst sintezētie savienojumi līdz pārejas endoplazmatiskā tīkla posmam, kurā savienojumi tālāk tiek pārnests uz Goldži kompleksu ar transporta pūslīšu palīdzību. Proteīnu transporta caur endoplazmatisko tīklu uz Goldži kompleksu shematisks atainojums parādīts 7.attēlā.

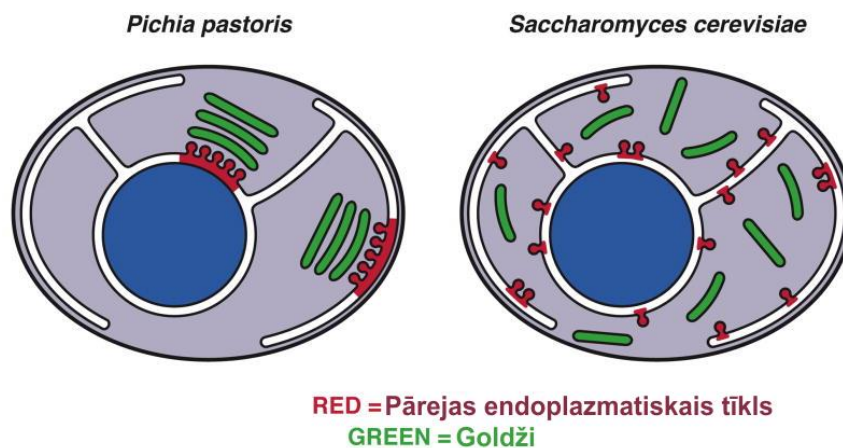


7.attēls. Goldži aparāts modificē un virza proteīnu transportu šūnā (Connerly, 2010)

Parasti šūnas satur vidēji 20 cisternas, kas sastāv no cis jeb ieejas daļas, mediālā jeb vidusdaļas un trans jeb izejas daļas, kas satur noteiktus enzīmus (Papanikou and Glick, 2009). No endoplazmatiskā tīkla transportētie proteīni vispirms var nokļūt cis Goldži tīklā vai endoplazmatiskā tīkla-Goldži starpdaļā, kas veidojas transporta pūslīšiem saplūstot. Transporta pūslīši veidojas pārejas endoplazmatiskā tīkla eksporta domēnos, ko sauc arī par endoplazmatiskā tīkla izejas vietām (*angl.* ERES; *endoplasmic reticulum exit sites*). To organizācija var atšķirties starp rauga sugām, piemēram, *P.pastoris* redzamas 2 -5 atsevišķas vietas, savukārt *S.cerevisiae* redzams liels skaits nelielu vietu viscaur endoplazmatiskajam tīklam (skat.8.att).

Tālāk cis un mediālajā Goldži tīkla daļā modificētie savienojumi nokļūst trans Goldži tīklā, kur tie tiek šķirti un novirzīti transportam uz lizosomām, citoplazmatisko membrānu vai sekrēcijai uz ārvidi. Mehānisms, kādā veidā savienojumi virzās pa Goldži aparātu vēl līdz

galam nav noskaidrots. Pastāv divu veidu hipotēzes. Pirmais modelis ir vezikulārā transporta modelis, kas paredz, ka savienojumi tiek pārvietoti ar transporta pūslīšu palīdzību, otra – cisternu nobriešanas modelis, kas paredz, ka savienojums paliek cisternā, kamēr tā pārveidojas no cis uz trans cisternu (Suda and Nakano, 2012).



8.attēls. Goldži aparāta un pārejas endoplazmatiskā tīkla struktūra rauga šūnās *Pichia pastoris* un *Saccharomyces cerevisiae* (Papanikou and Glick, 2010)

1.2. Anabioze

1.2.1. Anabiozes atklājuma pirmsākumi un tās nozīme

Anabiozes pētījumu aizsākumi meklējami 18.gadsimtā, kad slavenais holandiešu naturālists Antonijs van Lēvenhuks, lietojot pašizveidotu mikroskopu, aplūkoja sausas, bez redzamām dzīvības pazīmēm smiltis, kas paņemtas no mājas jumta notekas pēc ļoti karstas vasaras. Viņš atklāja, ka smiltis samitrinot, tajās parādās daudz mikroskopisku dzīvu, kustīgu būtnu, ko viņš nosauca par „animalcules” (tās bija rotatorijas). Ar šī eksperimenta palīdzību Lēvenhuks novēroja, ka dzīvās būtnes spēj pārciest ļoti stipru izzūšanu un saglabāt dzīvotspēju atūdeņotā stāvoklī (Keilin, 1959). Pēc 38 gadiem parādījās pētījums, kurā tika atspoguļoti līdzīgi rezultāti. 1743.gadā angļu katoļu mācītājs Tērbils Nīdems, pētot slimus kviešu graudus, novēroja, ka tie satur „baltas šķiedras”, kas atdzīvojās, kad tām pievienoja ūdeni. Nīdems minētos mikroorganismus nosauca par nematodēm, taču vēlāk noskaidrojās, ka tie pieder pie velteņtārpiem. 1753. gadā angļu pētnieks Henrijs Beikers atkārtoja Lēvenhuka un Nīdema eksperimentus un apstiprināja agrāk iegūtos rezultātus. 1775. gadā un 1776. gadā neatkarīgi viens no otra Beikera eksperimentus atkārtoja itāliešu pētnieki Maurēcio Rofredi un Felīce Fontāna, ap kuru darbiem izraisītās diskusijas ieinteresēja itāļu garīdznieku un filozofijas profesoru Ladzāro Spalancani, kurš veica neskaitāmus pētījumus, tostarp pirmos

pētījumus par augstas temperatūras ietekmi uz atūdeņotiem mikroorganismiem, kas būtiski palielināja priekšstatu par anabiozes procesu (Rebecchi *et al.*, 2007).

Terminu „anabioze” ieviesa vācu zinātnieks Vilhelms Preijers (1872.g). Burtiski tulkojot anabioze ir atdzīvošanās, augšāmcelšanās (no grieķu valodas „bios”- dzīvība, „ana”- augšup, atpakaļ). Deivids Keilins 1959. gadā piedāvāja terminu „kriptobioze”, kas nozīmē apslēptu, latentu dzīvību. Kriptobioze ir termins, kas norāda uz mikroorganismu ar dzīvības pazīmēm, bet apturētu metabolismu t.i., tas neuzņem barības vielas, nereproducē sevi, nereplicē savu DNS utt. Abi šie termini - anabioze un kriptobioze - bieži tiek lietoti kā sinonīmi (Tortorello and Gendel,1997; Rebecchi *et al.*,2007).

Dzīves laikā šūnu var ietekmēt daudz dažādi stresa faktori, kas var būt gan fizikāli (tādi kā: temperatūras un osmotiskais šoks, dehidratācija, augsts hidrostatiskais/gāzes spiediens, gravitācijas spēki, radiācija), gan ķīmiski (tādi kā: etanols, barības vielu limitācija/bads, oksidatīvais un metāla jonu stress, pH šoks un ķīmiskā mutāģenēze), gan bioloģiski (tādi kā: novecošanās, genotipiskās izmaiņas) (Walker, 1998). Tas vai šūna spēs ātri uztvert un adaptēties dažādām apkārtējās vides izmaiņām ir ļoti nozīmīgi tās dzīvotspējas saglabāšanai. Apstiprināts, ka dabā pastāv tikai trīs bioloģiskās organizācijas stāvokļi: dzīvs, miris un anabiotisks jeb kriptobiotisks (Clegg, 2001). Anabioze ir pieņemts termins vairākām organismu izdzīvošanas stratēģijām: (i) anhidrobioze – stāvoklis, ko izraisījis iztvaikošanas radīts ūdens zudums; (ii) osmobioze – stāvoklis, ko izraisījis augsts osmotiskais spiediens apkārtējā vidē; (iii) kriobioze – stāvoklis, ko izraisījusi sasaldšana; (iv) anoksibioze – stāvoklis, ko izraisa skābekļa trūkums; (v) autohemoanabioze – stāvoklis, ko izraisa ķīmiska iedarbība (Clegg, 2001; Lamikanra *et al.*, 2005).

Dabā visplašāk sastopamās anabiozes formas ir kriobioze un anhidrobioze, kas rodas atūdeņošanās jeb dehidratācijas rezultātā. Termins anhidrobioze tulkojot no grieķu valodas nozīmē – dzīve bez ūdens. Vidēji 70% zemes virsmas klāj ūdens un bez tā dzīvība nav iedomājama, tomēr ir organismi, kas spēj izdzīvot ūdens trūkuma apstākļos un tos dēvē par anhidrobotiem (Erkut *et al.*, 2012). Anhidrobiozes parādība ir izplatīta dažādu dzīvības formu vidū, gan vienzūnu gan daudzšūnu. Parasti šos organismus iedala divās grupās – pirmās grupas pārstāvji var pāriet anhidrobiozes stāvoklī visos dzīves cikla posmos, otrā grupā esošie tikai noteiktos dzīves cikla posmos (McGill *et al.*, 2015). Baktērijas *Deinococcus radiodurans*, ciānbaktērijas *Nostoc commune* un *Chroococcidiopsis spp.*, ķērpji un briofīti, raugi, ieskaitot arī vispopulārāko maizes raugu *Saccharomyces cerevisiae*, augu sēklas, augu *Craterostigma plantagineum* un *Selaginella lepidophylla* veģetatīvās šūnas, gauskāji, nematodes, vēžveidīgie, rotatorijas un daži citi ir to organismu skaitā, kas var pārciest dehidratāciju un atjaunot metabolismu pie labvēlīgākiem vides apstākļiem rehidratējoties (Rebecchi *et al.*, 2007; Clegg,

2001). Izžuvušie organismi var palikt anhidrobiozes stāvoklī ilgu laiku, līdz pat gadu desmitiem un gadsimtiem (Crowe *et al.*, 1992). Kā piemēru var minēt bakteriālās sporas, kas var atgūt dzīvotspēju pēc 25-40 miljoniem gadu vai augu sēklas, kas var uzdzīvot pēc 1,300 gadiem (Erkut *et al.*, 2012). Kvantitatīva pilnīgās dehidratācijas definīcija ir izžūšana līdz $<0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ sausās masas (10% ūdens daudzuma un mazāk) (Alpert, 2005). Noskaidrots, ka anhidrobioti ir spējīgi zaudēt līdz pat 95-99% no to ūdens daudzuma organismā (Crowe *et al.*, 1992). Pret dehidratāciju jūtīgas sēklas aiziet bojā, kad tajās ūdens daudzums sastāda 20%, bet pret izžūšanu tolerantas sēklas spēj izdzīvot zem mitruma daudzuma 7% (Tweddle *et al.*, 2003). Pret dehidratāciju jūtīgi prokarioti spēj izdzīvot līdz mitruma daudzumam 30%, bet pret izžūšanu tolerantie var izdzīvot līdz pat mitruma daudzumam 2% (Billi and Potts, 2002; Potts, 1994). Rauga šūnām mitrums aktīvas dzīves stāvoklī ir apmēram 70 – 80 % un tās pāriet anabiozes stāvoklī, kad paliekošais mitrums sastāda 8 – 10 %. Pirmajos dehidratācijas procesa posmos, kad paliekošais mitrums nav zemāk par 20 – 30 %, šūnas atstāj brīvais ūdens, bet pēc tam sākas saistītā ūdens aizplūšana. Šajā laikā no šūnām aizplūst ne tikai brīvais ūdens, bet arī liels daudzums saistītā ūdens. Ir noskaidrots, ka žāvējot raugu, līdz tā paliekošais mitrums ir apmēram 20 %, šūnās esošais ūdens vēl darbojas par šķīdinātāju, kurā var notikt dažādas ķīmiskas reakcijas. Kad paliekošais mitrums ir 10 – 20 %, ūdens šķīdumi atrodas gēlveidīgā stāvoklī un atūdeņojot šūnas tālāk, saistītais ūdens lokalizējas tikai noteiktos šūnas rajonos (Beker and Rapoport, 1981). Anhidrobiozes stāvoklim ir nozīmīgs 10% mitruma sliekšnis, jo no bioloģiskā viedokļa tas atbilst stāvoklim, kad šūnās esošais ūdens vairs neveido monoslāni apkārt makromolekulām un nevar kalpot par vidi, kurā noris dažādas bioķīmiskas reakcijas un attiecīgi metaboliskie procesi (Billi and Potts, 2002).

1.2.2. Dehidratācija un tās radītās izmaiņas šūnā

Dehidratācijas laikā šūnā notiek daudz dažādu izmaiņu strukturālā un molekulārā līmenī. Ūdens izraisītais stress aptur šūnas augšanu un var veicināt dažādu bojājumu rašanos, kas ir galvenokārt saistīti ar šūnas organelu izmaiņām, citoplazmatiskās membrānas lipīdu fāzu pārejām un oksidatīvo stresu.

1.2.2.1. Šūnas organelu izmaiņas

Pašas uzskatāmākās šūnas izmaiņas dehidratācijas laikā attiecas uz šūnu tilpuma samazināšanos (Berner and Gervais, 1993; Tymczynyn *et al.*, 2007). Novērojama šūnapvalka sakrokošanās, kas saistīta ar izmaiņām šūnapvalka polisaharīdu – mannānu un

glikānu – īpašībās. Konstatēts, ka mannānu ķēdes kļūst irdenas, kas notiek tāpēc, ka sabojājas ķīmiskās saites starp polisaharīdiem un olbaltumvielām. Strukturāli izmainās arī glikāns, kas nodrošina šūnapvalka mehānisko stiprību. Dehidratācijas laikā glikāna struktūra tā pārveidojas, ka pēc rehidratācijas šūna uzreiz nespēj atjaunot savu sākotnējo formu, un tās sākotnējais apjoms tiek atgūts tikai pēc vidēji 2 stundu atrašanās ūdens vai šķidrās barotnes vidē (Beker and Rapoport, 1981).

Šūnai atūdeņojoties mainās arī šūnas virsmas īpašības. Noskaidrots, ka rauga šūnām izzūstot, to virsmas negatīvais lādiņš pieaug, kā rezultātā var veidoties kalcija tiltiņi, kas cieši sasaista atsevišķas šūnas. Tādējādi sausie raugi bieži salīp kopā, veidojot lielus konglomerātus, kas ir diezgan noturīgi arī kad šūnas tiek pakļautas rehidratācijai (Rapoport and Beker, 1985).

Dehidratācijas laikā, šūnas kodols samazinās izmēros un mainās kodola membrānas īpašības (Rapoport *et al.*, 1973). Tajā dažādos rajonos var rasties lipīdu izmaiņas, kas elektronmikroskopiskajos pētījumos novērojamas kā pārrāvumi membrānā. Šajos rajonos parasti lokalizējas mitohondriji un/vai arī lipīdu veidojumi, kas domājams ir saistīts ar šūnas bojāto rajonu reparācijas procesiem, kam nepieciešams enerģijas avots (mitohondriji) vai arī lipīdu materiāls (Rapoport, 1984). Papildus, tiek novērota hromatīna kondensēšanās, kas parasti sastopama tikai noteiktās šūnu dalīšanās stadijās (Rapoport and Kostrikina, 1973). Rauga šūnās, kuras negatavojas dalīties, hromatīns parasti ir difūzi izkliedēts pa kodolu. Tādējādi var secināt, ka izzūšanas laikā šūnā notiek nopietni, taču atgriezeniski procesi: mainās ar DNS saistīto olbaltumvielas molekulu, kā arī pašas DNS konformācija.

Atūdeņošana ietekmē arī RNS. Kaltējot raugu, var noārdīties līdz 40 % no tā šūnās esošajām RNS. Raugu kaltējot strauji, ogļhidrātu daudzums tajā samazinās, turpretī, kaltējot to lēni, dažu ogļhidrātu koncentrācija pieaug. Mazāk noteikta ir vitamīnu reakcija uz atūdeņošanu. Daži no tiem šajos apstākļos degradējas, citu daudzums šūnā pieaug, un, kā domā, tas notiek tāpēc, ka noārdās tos saturošie fermentkompleksi un no tiem izdalās brīvi vitamīni. Ir arī vitamīni, uz kuriem, pēc līdzšinējiem datiem, kaltēšana nekādu ietekmi neatstāj (Beker and Rapoport, 1981).

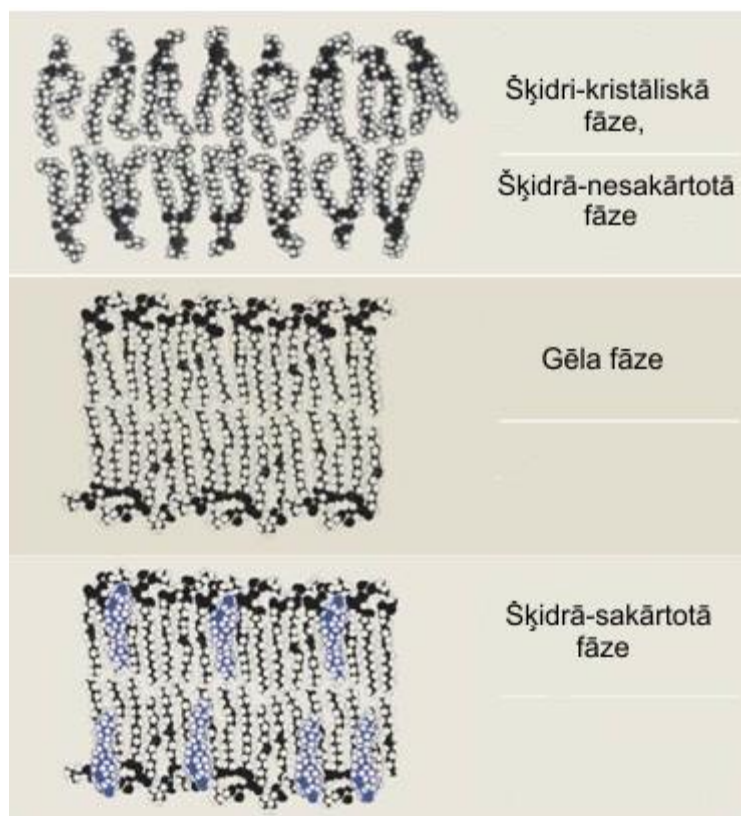
Elektronmikroskopijas pētījumi neuzrāda būtisku pārkārtošanos mitohondriju ultrastruktūrā. Tomēr novērots, ka mitohondriju DNS dehidratācijas laikā reaģē tāpat kā kodola DNS – tas kompaktizējas un kļūst redzams.

Dehidratācijas izraisa izmaiņas šūnu vakuolu izmēros. Iekššūnas ūdens tiek savākts no vakuolas citoplazmā, tādējādi daļēji kompensējot pēkšņo makromolekulu koncentrācijas pieaugumu. Pastāv hipotēze, ka šūnai izzūstot vakuolu skaits palielinās. Tas varētu būt saistīts ar vakuolām, kam piemīt lizosomālā aktivitāte, jo lizosomas nepieciešamas, lai efektīvi

atdalītu un sagrautu daļēji noārdītus savienojumus, kas šūnai izžūstot rodas pastiprināti (Rapoport, 1984).

1.2.2.2. Citoplazmatiskās membrānas izmaiņas un lipīdu fāzu pārejas

Dehidratācijas ietekmē šūnas tilpums samazinās un tādējādi samazinās arī citoplazmatiskās membrānas virsmas laukums. Bieži tiek novērota membrānas sakrokošanās un invagināciju parādīšanās (Adya *et al.*, 2006; Biryusova and Rapoport, 1978). Pētījumi rāda, ka izdzīvotības samazināšanās dehidratācijas laikā primāri ir saistīta ar citoplazmatiskās membrānas bojājumiem (Walker *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 1995). Ar ūdeņraža saitēm saistītā ūdens aiziešana no fosfolipīdu dubultslāņa palielina polāro galviņu sablīvēšanos un pastiprina van der Valsa spēku mijiedarbību starp oglekļa ķēdēm un var notikt lipīdu fāzu pāreja no šķidrī-kristāliskās fāzes uz gēla fāzi (Crowe *et al.*, 2002). Ūdens aizplūšana izraisa membrānas atpakaļ fāzu pārejas temperatūras (T_m) paaugstināšanos (Crowe *et al.*, 1989; Crowe *et al.*, 1992). Rezultātā rehidratācijas laikā izžāvētās šūnas membrānas, kuras ir gēla fāzē istabas temperatūrā, atkal piedzīvo fāzu pāreju no gēla uz šķidrī-kristālisko (Potts, 1994). Lipīdu fāzes membrānās parādītas 9.attēlā.



9.attēls. Lipīdu fāzes membrānās (van Meer *et al.*, 2009)

Tā kā šūnas membrānu veido dažādi lipīdi, kas var būt izvietoti nevienmērīgi, tad blakusesošas membrānas daļas var atrasties atšķirīgā fizikālā stāvoklī. Šajās vietās membrānā rehidratācijas laikā var veidoties pārrāvumi un caurumi, kas notiek mehāniskas deformācijas rezultātā. Rezultātā, tiek novērots būtisks citoplazmatiskās membrānas caurlaidības pieaugums. Tādējādi rehidratēšanās procesā izkaltētās šūnas var summāri zaudēt līdz 30 % dažādu vielu. Šo vielu vidū ir dažādi neorganiski joni, vitamīni, ogļhidrāti, lipīdi, aminoskābes, nelielas ķīmiski saistītu aminoskābju virknītes (peptīdi), olbaltumvielas, kā arī nukleotīdi (Rapoport, 1984).

Pret žāvēšanas tolerantiem mikroorganismiem ir mehānismi, kā pazemināt T_m vērtību, tādējādi novēršot izmaiņas, kas saistītas ar membrānu fāzu pāreju. T_m vērtības pazemināšanās var tikt panākta mainot lipīdu sastāvu pēc to taukskābēm, palielinot membrānas taukskābju nepiesātinātības pakāpi (Hoekstra *et al.*, 2001). Tomēr jāņem vērā, ka palielināts nepiesātināto taukskābju saturs paaugstina lipīdu peroksidācijas uzņēmību (França *et al.*, 2007).

Jebkuri bojājumi, kas rodas šūnās dehidratācijas laikā parādās rehidratācijas procesā. Pastāv līdzība starp dehidratācijas un rehidratācijas laikā izraisītajiem bojājumiem. Gan dehidratācijas, gan rehidratācijas laikā notiek dinamiskas proteīnu un nukleīnskābju pārmaiņas un rehidratācijas apstākļi ir ļoti noteicoši vai šūnas dzīvotspēja tiks saglabāta vai nē. Novērots, ka šūnu rehidratācijas galvenie parametri – temperatūra un rehidratācijas ātrums - ir ļoti nozīmīgi šūnu dzīvotspējas saglabāšanā. Nelabvēlīgos apstākļos izžāvētām raugu šūnām (piemēram, tās liofilizējot) fāzu pāreja var palielināties pat līdz 65°C, bet to iespējams samazināt, piemēram, inducējot trehalozes vai dažādu poliolu izstrādi šūnās, tādējādi samazinot T_m uz 35 – 40°C (Rapoport *et al.*, 2009). Lai rehidratētu šūnu mazinot membrānas bojājumus, iespējami divi varianti: (i) palielināt reaktivācijas temperatūru un pievienot ūdeni pēc fāzu pārejas notikšanas vai (ii) atdot ūdeni pakāpeniski ar lēnās rehidratācijas palīdzību bezūdens apstākļos (ūdens tvaiku atmosfērā). Salīdzinot ātro rehidratāciju, kad šūnas tiek uzreiz ievietotas ūdens vidē istabas temperatūrā, lēnā rehidratācija ūdens tvaikos atļauj ūdens uzņemšanu šūnā caur nestabilo membrānu, tādējādi ir daudz saudzējošāka un tam ir ļoti liela nozīme šūnu dzīvotspējas saglabāšanā (Poirier *et al.*, 1999).

1.2.2.3. Oksidatīvais stress

Viens no molekulārajiem mehānismiem, kas var izraisīt šūnas bojājumus dehidratācijas laikā un var novest pie tās bojāejas, ir oksidatīvais stress. Ūdens radītais stress palielina brīvo radikāļu daudzumu šūnā, kas izraisa fosfolipīdu, DNS un proteīnu bojājumus. Galvenie bojājumi saistās ar membrānu lipīdu peroksidāciju, kā arī DNS bāzu izmaiņām un

proteīnu denaturāciju (Pereira *et al.*, 2003; Cabisco *et al.*, 2000). Šādu oksidatīvo bojājumu pamatā ir aktivētu vai daļēji reducētu O₂ formu veidošanās, ko dēvē par reaktīviem skābekļa veidiem (*angl.* ROS; reactive oxygen species). Pētījumi rāda, ka ROS veidošanās (tādu kā superoksīda anjoni O₂⁻, ūdeņraža peroksīdi H₂O₂, hidroksil radikāli HO⁻ un hidroperoksilradikālis HOO) dažādu stresu apstākļos ir saistīta ar elektronu transporta ķēdes pavājināšanos aerobos mikroorganismos. Noskaidrots, ka dehidratācijas laikā rauga šūnās oksidācijas process pieaug 10-kārtīgi (Pereira *et al.*, 2003). Tāpat izpētīts, ka izzāvētā stāvoklī reakcijas ar O₂ ir ļoti nozīmīgas, jo var izraisīt pat šūnas nāvi. Kad šūnu membrānas ir dehidratētas, tās ir daudz jūtīgākas pret ROS. Normālos metaboliskos apstākļos brīvie radikāļi var tikt neutralizēti pateicoties antioksidantu sistēmām, tomēr ūdens stresa radītos apstākļos, šie aizsardzības mehānismi var būt inaktivēti (França *et al.*, 2007). Tā kā izzāvētās šūnās molekulas ir tuvu novietotas, pastiprināti var notikt brīvo radikāļu difūzija un tai sekojoša šūnas komponentu oksidācija (Espindola *et al.*, 2003). Svarīgi atzīmēt, ka aerobos apstākļos raugos nepārtraukti veidojas brīvie radikāļi un antioksidantu sistēma ir darbībā, taču anaerobos apstākļos raugos netiek ekspresēti gēni, kas atbild par oksidatīvo aizsardzību, kas var būt par iemeslu to īpaši zemajai izdzīvotībai žāvējot (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

Lipīdu peroksidācija ir kompleks process, kura rezultātā veidojas lipīdu radikāļi, notiek nepiesātināto lipīdu dubultsaišu pārkārtošanās, lipīdu destrukcija ar dažādu noārdīšanās produktu veidošanos, un tai izšķir trīs fāzes: iniciācijas fāze, pavairošanās fāze un nobeiguma fāze (Catalá, 2006). Peroksidāciju aizsāk oksidants, kas nošķir ūdeņraža atomu no oglekļa nepiesātinātās taukskābes ķēdē un izveido lipīda radikāli. Skābeklis pievienojas taukskābes lipīda radikālim, tādējādi radot peroksilradikāli. Iniciētais peroksilradikālis var tālāk izplatīt peroksidācijas ķēdes reakciju, nošķirot ūdeņraža atomu no nākamās blakusesošās nepiesātinātās taukskābes. Rezultātā izveidotais lipīda hidroperoksīds var sadalīties vairākos ROS, tādos kā, lipīdu alkoksilradikālis, aldehīdi, alkāni, alkoholi, lipīdu epoksīdi (Catalá, 2009). Peroksidētās membrānas kļūst stingras, zaudē selektīvo caurlaidību un ārējos stresa apstākļos zaudē savu integritāti. Lipīdu peroksidācijas produkti (visticamāk aldehīdi) var difūzi pāriet no membrānām uz citām intracelulārajām struktūrām.

Lipīdu peroksidācija ietekmē lipīdu dubultslāņa struktūru un izmaina membrānas īpašības, tādas kā plūstamība, caurlaidība un dubultslāņa biezums. Lipīdu peroksidācija palielina membrānas caurlaidību, zaudējot selektīvo caurlaidību un jonu gradientu, tādējādi tiešā veidā ietekmējot metaboliskos procesus. Strukturāli pēc lipīdu oksidācijas novērojama membrānas biezuma samazināšanās. Savukārt jautājums par membrānas plūstamības izmaiņām vēl līdz galam nav noskaidrots. Pēc dažu pētnieku datiem, peroksidācija neietekmē nedz membrānas plūstamību, nedz lipīdu dinamiku, savukārt citi pētījumi parāda, ka

membrānas kļūst stingrākas, plūstamība samazinās un samazinājums visizteiktākais ir lipīdu slāņa dubultsaišu tuvumā (Wong-ekkabut *et al.*, 2007).

Līdztekus lipīdiem, oksidatīvais stress ietekmē arī šūnas proteīnus. Proteīnu oksidācija tiek definēta kā proteīna kovalenta modifikācija, ko izraisa tiešas reakcijas ar ROS vai netiešas reakcijas ar sekundāriem oksidatīvā stresa produktiem, kas visbiežāk ir lipīdu peroksidācijas galaprodukti (Zhang *et al.*, 2013). ROS bojā proteīnus izraisot aminoskābju sānu ķēžu modifikācijas, krustenisko saišu veidošanos starp proteīniem un polipeptīdu fragmentāciju. Visbiežāk proteīna oksidāciju iniciē HO^\cdot . Reakciju rezultātā veidojas alkil-, alkilperoksil un alkoksil radikāļi, kuru reakciju starpprodukti var atkal iesaistīties reakcijās ar citiem aminoskābju atlikumiem tā paša vai cita proteīna molekulā. Alkoksil radikāļu veidošanās veicina arī peptīdu saišu šķelšanos un tādējādi polipeptīdu fragmentāciju (Berlett and Stadtman, 1997). Visi proteīnu aminoskābju atlikumi ir jūtīgi pret oksidāciju ar HO^\cdot , un visuzņēmīgākās aminoskābes pret oksidāciju ir cisteīns, metionīns, triptofāns, fenilalanīns, tirozīns, histidīns, arginīns, lizīns, prolīns, treonīns un glutamīns (Berlett and Stadtman, 1997).

ROS izraisītie bojājumi DNS izpaužas, kā DNS bāzu modifikācijas un vienas vai dubultsaites pārrāvumi. Rezultātā šūnas DNS oksidatīvie bojājumi saistās ar kļūdām transkripcijā, translācijā un replikācijā, radot mutācijas vai šūnas nāvi (Girard and Boiteux, 1997). Arī RNS ir ļoti jūtīgs pret oksidatīvo stresu, it īpaši mRNS un rRNS. Vislielāko RNS bojājumu daudzumu rada HO^\cdot , veidojot vairāk kā 20 dažādu veidu bāzu bojājumu. RNS oksidatīvie bojājumi rezultējas translācijas procesa un proteīnu sintēzes traucējumos, kas tāpat kā DNS gadījumā var radīt mutācijas vai būt letāli (Kong and Lin, 2010).

1.3. Aizsargmehānismi rauga šūnās

Ūdens izraisītais stress ir celulārās izmaiņas, ko inducē ūdens zudums, kas rodas no iztvaikošanas gaisā vai osmozes. Ūdens zudums rada izmaiņas un bojājumus šūnās, tādēļ anhidrobiotiem nepieciešami dažādi aizsargmehānismi to dzīvotspējas saglabāšanai pārejot anabiozes stāvoklī. Gadiem uzkrātā pieredze pētījumos parāda, ka pastāv kopīgas iezīmes šūnu aizsargmehānismos ūdens radītā stresa gadījumos, kas saistītas ar osmolītu sintēzi un akumulāciju, antioksidantu un reparācijas sistēmas aktivāciju, kā arī stresa proteīnu darbību.

1.3.1. Osmotiskā stresa aizsargsistēma un osmolīti

Laboratorijās osmoregulācijas sistēma ir visplašāk pētīta kā straujās pārmaiņas ekstracelulārajā ūdens aktivitātē. Šīs straujās pārmaiņas var izraisīt ūdens izplūšanu ārā no

šūnas (hiperosmotiskais stress), kas veicina šūnas saraušanos, vai arī pastiprinātu ūdens ieplūšanu šūnā (hipoosmotiskais stress), tādējādi izraisot šūnu uzbriešanu (Hohmann *et al.*, 2007; Hohmann, 2002). Pakļaujot šūnas hiperosmotiskam stresam, tās sāk zaudēt ūdeni un iestājas līdzīgs stāvoklis, kā gadījumā ar dehidratāciju gaisā, ko arī pavada ūdens zudums šūnās. Pastāv pētījumi par iespēju radīt šūnu izturību pret dehidratāciju, sākotnēji šūnas pakļaujot apstākļiem, kas rodas žāvēšanas sākumstadijā, piemēram, pirms šūnu žāvēšanas gaisā tās inkubēt šķīdumā ar paaugstinātu osmotisko spiedienu. Tas veicina aizsargmehānismu aktivāciju šūnā un sekojoši tās augstāku rezistenci dehidratācijas laikā (Rapoport *et al.*, 2009).

Pakļaujot šūnas ūdens izraisītam stresam, šūnās tiek aktivētas dažādas atbildes reakcijas un viena no tām ir saistīta ar dažādu osmolītu sintēzi un akumulāciju (Hohmann, 2002). Pētījumi parāda, ka pastāv tieša korelācija starp osmolītu daudzumu šūnā un tās rezistenci pret dehidratāciju (Bohnert *et al.*, 1995; Crowe *et al.*, 1992; Krallish *et al.*, 1997). Īsa perioda ūdens zuduma laikā šūnas bieži sabalansē iekšējo osmotisko spiedienu ar ārējo un saglabā sākotnējo šūnas tilpumu izmantojot neorganiskos jonus, savukārt ilgāka perioda ūdens stresa gadījumā, organiskie osmolīti tiek lietoti tilpuma regulācijā (Lang *et al.*, 1998). Organiskie osmolīti ir savienojumi, kas var tikt iedalīti vairākās grupās. Tie var būt aminoskābes (to atvasinājumi), polioli un cukuri, metilamīni, metilsulfīdi un urīnskābe. Daudzi osmolīti tiek saukti par savietojamām vielām (*angl.* compatible solutes). Šis nosaukums radies balstoties uz „savietojamības” hipotēzi, t.i., šie savienojumi nekaitē makromolekulām un tie var tikt regulēti ar minimālu ietekmi uz iekššūnas funkcijām (Yancey, 2001; Yancey, 2005). Salīdzinājumam – neorganiskie joni augstās koncentrācijas nav savietojami ar normālu proteīnu funkcionēšanu ilgtermiņā (Burg and Ferraris, 2008). Tāpat teorija paredz, ka organiskie osmolīti ir aizstājami, t.i. šūna var tikt osmotiski aizsargāta ar dažādiem osmolītiem neatkarīgi no tā vai šūna ikdienā tos lieto vai nē. Pat ja osmolīti nav metaboliski aktīvi, tie var tikt iesaistīti unikālās reakcijās šūnu aizsardzībā ne tikai osmotiski, bet arī veicot specifiskas funkcijas. Tie var kalpot kā aktīvi antioksidanti oksidatīvā stresa gadījumā, rezerves substances un tūlītējs enerģijas avots pēc stresa stāvokļa pārvarēšanas, kā arī makromolekulu (proteīni, membrānas) stabilizatori (Smirnov *et al.*, 1989; Crowe *et al.*, 1998; Yancey, 2005). *In vitro* eksperimenti rāda, ka savietojamās vielas spēj samazināt jonu inhibējošo efektu uz enzīmu aktivitāti, kā arī paaugstināt to termālo stabilitāti (Bohnert and Shen, 1999).

Zināms, ka ūdens stresa apstākļos raugi producē un/vai akumulē no apkārtējās vides dažādus poliolus, tādus kā, piemēram, eritritols, ribitols, arabitols, ksilīts, sorbīts un mannīts (Burg and Ferraris, 2008; Van Eck *et al.*, 1993; Rapoport *et al.*, 1988). Kā centrālais osmolīts-

poliols rauga šūnās tiek minēts glicerīns un šūnu pakļaušana hiperosmotiskajam stresam vienmēr saistīta ar paaugstinātu glicerīna saturu tajās (Hohmann, 2002). Glicerīna intracelulārās koncentrācijas pieaugums var notikt pateicoties (i) palielinātai sintēzei, (ii) palielinātai intracelulārā glicerīna saglabāšanai pateicoties citoplazmatiskās membrānas caurlaidības izmaiņām (iii) samazinātai disimilācijai (iv) glicerīna uzņemšanai no vides (Nevoigt and Stahl, 1997). Glicerīna akumulācijas veids kā osmotiskā stresa atbilde var atšķirties starp dažādu raugu celmiem, piemēram, *Saccharomyces cerevisiae* akumulē glicerīnu paaugstinot tā sintēzi. Pētījumi rāda, ka šūnas, kas tika inkubētas vidē ar 0,7M NaCl 40 min, producēja vidēji 3 reizes vairāk glicerīna salīdzinot ar šūnām, kas netika pakļautas hiperosmotiskajam stresam (Blomberg and Adler, 1989). Izmaiņas vides osmolaritātē uztver divi transmembrānu sensori Sln1p un Sho1p, kas tālāk aktivizē HOG (angl., High Osmolarity Glycerol) ceļu, kas ir enzīmu kaskāde, kura aktivitāte ir saistīta ar pastiprinātu glicerīna sintēzi rauga šūnās (Burg and Ferraris, 2008).

Pētījumi rāda, ka polioli var būt savstarpēji aizvietojami. Šajā ziņā sorbīts un mannīts var aizstāt glicerīnu, saistībā ar osmotisko aizsardzību. Tomēr noskaidrots, ka pie identiskām savienojumu koncentrācijām, to darbība ir mazākā mērā izteikta nekā glicerīnam (Shen *et al.*, 1999). Domājams, ka tas varētu būt saistīts ar atšķirīgu poliolu intracelulāro izvietojumu (Blomberg and Adler, 1992). Tāpat ir iespējama arī citu aizsargmehānismu nodrošināšana. Noskaidrots, ģenētiski modificētos raugos, spēja producēt un akumulēt mannītu palīdz aizsargāt glicerīna defektīvas šūnas no brīvo radikāļu ietekmes, kā arī ksilīta akumulācija paaugstina šūnu sausumizturību (Chaturvedi *et al.*, 1997; Rapoport *et al.*, 1997). Polioli var būt efektīvi proteīnu stabilizatori kad pievienoti augstās koncentrācijās arī ķīmiski inducētas denaturācijas gadījumā (Mustafa *et al.*, 2011). Pētījumā tika pierādīta poliolu nozīme denaturētā tripsīna inhibitora proteīna ovomukoīda stabilitātes paaugstināšanā. Proteīna stabilitāte paaugstinājās palielinoties poliolu koncentrācijai un stabilitāte samazinājās sekojošā secībā sorbīts>ksilīts>adonitols>mannīts>glicerīns. Pētījumi parādīja, ka savienojuma aizsargspēju palielināšanās saistīta ar hidroksilgrupu skaitu molekulā. Domājams, ka glicerīna stabilizējošais efekts šajā gadījumā uzrādās mazāks nekā citu poliolu, pēc izvirzītas hipotēzes - jo lielāks ir hidroksilgrupu skaits molekulā, jo izteiktāks ir proteīna stabilizējošais efekts (Mustafa *et al.*, 2011). Savukārt citā pētījumā analizējot pirofosfatāzes termoprotekciju, šķīdumi tika salīdzināti pēc ūdens daudzuma uz tilpumu. 1,5 M trehalozes šķīdums satur 62,5% ūdeni pēc tilpuma, savukārt tādu pašu ūdens daudzumu glicerīna šķīdums satur pie molārās koncentrācijas 4,4 M. Izmantojot šīs koncentrācijas termoprotekcija trehalozei un glicerīnam uzrādījās identiska (Sola-Penn and Meyer-Fernandes, 1998).

Svarīgu lomu dehidratācijas stresa aizsardzībā šūnās ieņem osmolīti - cukuri, visbiežāk trehaloze un saharoze. Šo savienojumu sintēze un akumulācija novērojama šūnās, kad tās sāk zaudēt intracelulāro ūdeni, un tiek ziņots, ka tie ir ļoti nozīmīgi membrānu un proteīnu stabilizatori izžūšanas laikā (Crowe *et al.*, 1998; Crowe *et al.*, 2001). Saharozes klātbūtne ir izteiktāka augu valsts pārstāvjiem, savukārt rauga šūnās tiek detektēta primāri trehaloze (Clegg, 2001). Polihidroksilsavienojumu iedarbības rezultātā dehidratētās šūnās nenotiek proteīnu denaturācija un pārrāvumu veidošanās membrānās (Allison *et al.*, 1999). Noskaidrots, ka cukuri novērš membrānas lipīdu dubultslāņa fāzu pārejas temperatūras T_m pieaugumu un tādējādi novērš membrānas fāzes pārejas, atļaujot tai eksistēt šķīdri-kristāliskā fāzē dehidratācijas-rehidratācijas laikā (Koster *et al.*, 2000).

Hidroksilsavienojumu bioprotektīvā fenomena īpašības un darbības mehānismi joprojām nav līdz galam noskaidroti un raisa diskusijas. Tiek piedāvātas dažādas hipotēzes, tomēr neviena vēl nav atzīta par vispāripieņemtu. Trīs galvenās hipotēzes, kas apraksta molekulāro struktūru saglabāšanas mehānismus (Crowe *et al.*, 2002, Belton and Gill, 1994; Lins *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 1999, Doster, 2010) :

- 1) Ūdens aizvietošanas hipotēze: cukuri ir spējīgi aizvietot ūdens molekulas tiešā mijiedarbībā ar biomolekulu virsmas grupām caur ūdeņraža saitēm, stabilizēt lipīdu un proteīnu 3D struktūras dehidratācijas laikā radīt cukuru-proteīnu ūdeņraža saites, kas aizvieto ūdens-proteīna ūdeņraža saites;
- 2) Ūdens „satveršanas” hipotēze: ūdens molekulu satveršana starpslānī starp cukuriem un biomolekulu virsmu, struktūras cukurs – ūdens - biomolekula veidošana;
- 3) Mehāniskās satveršanas hipotēze (vitrifikācijas hipotēze): cukuri satver biomolekulas stiklotā matriksā un nodrošina augstāku stiklošanās temperatūru

Lielākais daudzums pētījumu šajā virzienā ir saistīts ar trehalozes izmantošanu kā aizsargsavienojumu. Šis savienojums var tikt akumulēts lielos daudzumos – līdz pat 20% no sausā svara – daudzos mikroorganismos, kas spēj pārciest dehidratāciju (Crowe *et al.*, 1998). Līdz nesenam laikam tika uzskatīts, ka rauga šūnās trehaloze ir tikai kā rezerves cukurs un to izdzīvotība sausā stāvoklī ir saistīta ar trehalozes darbību kā enerģijas avotu šūnu funkciju atgūšanai rehidratācijas laikā, tomēr aizvien vairāk pētījumu parāda, ka trehalozes produkcija ir universāla atbilde raugos dažādu stresa-faktoru ietekmē un tā spēj veikt dažāda veida aizsardzību šūnās, piemēram, trehaloze spēj pasargāt rauga šūnas no oksidatīviem bojājumiem, kad tās tiek pakļautas H_2O_2 , tā veicina etanola rezistenci, kā arī termotoleranci (Benaroudj *et al.*, 2001; Lucero *et al.*, 2000; Singera and Lindquist, 1998). Tāpat tiek

uzskatīts, ka trehalozei ir izteiktākas protektīvās funkcijas nekā, piemēram, saharozei, kā arī citiem cukuriem, it īpaši uzglabāšanas laikā (Crowe *et al.*, 1998).

Trehaloze stabilizē sausās membrānas samazinot atstarpju veidošanos starp membrānas lipīdiem dehidratācijas laikā (Golovina *et al.*, 2009; Golovina *et al.*, 2010). Pamatojoties uz ūdens aizvietošanas hipotēzi cukuru polāri lādētās hidroksilgrupas darbojas kā ūdens molekulu aizvietotāji, veidojot ūdeņraža saites ar šūnas molekulām, un tādā veidā saglabā pietiekamu atstarpi starp lipīdiem, saglabājot telpisko struktūru šķīdri-kristāliskā stāvoklī (Crowe *et al.*, 2002). Tomēr ir daudz eksperimentālo un teorētisko datu, kas pamato arī proteīnu – cukuru mijiedarbību, ko labāk apraksta ūdens satveršanas hipotēze. Šī hipotēze paredz, ka cukuri koncentrē ūdeni blakus membrānu vai proteīnu virsmai, tādējādi novēršot to sagraušanu jeb sairšanu (Belton and Gill, 1994; Lins *et al.*, 2004). Mehāniskās satveršanas hipotēze nosaka, ka T_m pazemināšana izzāvētos fosfolipīdos, var būt saistīta ar cukuru spēju veidot stiklveida struktūras jeb cukuru vitrifikāciju (Crowe *et al.*, 1998). Trehalozes īpašās „spējas” tiek saistītas ar trehalozes augsto stikla pārejas jeb stiklošanās temperatūru (T_g). Stiklošanās temperatūra raksturo parauga pāreju no stiklveida stāvokļa uz superelastīgo stāvokli, kad paraugs ir izteikti elastīgs, viegli deformējams un tam ir raksturīga tecētspēja. Stiklveida stāvokli var raksturot kā cietu agregātstāvokli ar amorfu struktūru. Parasti stiklošanās notiek kādā temperatūras intervālā, tomēr nosacīti to aizstāj ar vienu noteiktu temperatūru – stiklošanās temperatūru. Domājams, jo augstāka T_g vērtība, jo augstāka ir izzāvētās struktūras stabilitāte, kad notiek temperatūras pieaugums (Morgan, 2006). Izzāvētas trehalozes $T_g = 110$ °C, kas nodrošina augstu viskozitāti pie augstām temperatūrām. Salīdzinājumam, saharozes $T_g = 65$ °C, kas samazina tās potenciālu salīdzinot ar trehalozi (Crowe *et al.*, 1998). Papildus izpētīts, ka trehaloze spēj veidot kristālisku dehidrātu. Veidojoties dehidratētam kristālam, kad neliels ūdens daudzums tiek absorbēts, trehalozes struktūra paliek stiklveida stāvoklī, nesamazinoties sistēmas T_g vērtībai. Tādējādi trehalozes klātbūtnē biomateriāli var būt daudz stabilāki, kad tiek glabāti augsta mitruma un temperatūras apstākļos. Tiek uzskatīts, ka cukuri vislabāk spēj stabilizēt proteīnus un membrānu struktūras, kad dažādu hipotēžu nosacījumi, piemēram, ūdens aizvietošanas un vitrifikācijas hipotēze, tiek izpildīti kā rezultātā nenotiek proteīnu denaturācija un pārrāvumu veidošanās membrānās (Crowe *et al.*, 1998).

1.3.2. Antioksidantu un reparācijas sistēma

Pētījumi rāda, ka anhidrobotiski mikroorganismi mazāk cieš no oksidatīviem bojājumiem žāvēšanas laikā nekā pret žāvēšanu jūtīgie organismi, pateicoties to

antioksidatīvajai aizsargmehānismu darbībai (Potts, 1994). Aizsardzību pret oksidatīvajiem bojājumiem un iekššūnas red-oks balansa uzturēšanu nodrošina brīvos radikāļus neitralizējoši enzīmi, piemēram, glutaciona peroksidāze, superoksīda dismutāze un katalāze, kā arī molekulārie antioksidanti, tādi kā, piemēram, glutations, poliamīni, C un E vitamīni (Davies, 2000). Tāpat oksidatīvo aizsardzību raugu šūnās saista arī ar trehalozi, tioredoksīnu, glutaredoksīnu un atsevišķiem pentožu fosfātu ceļa un glikolīzes enzīmiem. Enzīmu darbība var notikt šūnas dehidratācijas posmā, kamēr tajā vēl ir pietiekami daudz ūdens enzimatisko reakciju norisei (Hoekstra *et al.*, 2001).

Labi zināms un nozīmīgs antioksidants ir superoksīda dismutāze, kura darbības galaprodukts ir ūdeņraža peroksīds H_2O_2 . Superoksīda dismutāzes ir metaloenzīmi un tās var būt lokalizētas citoplazmā vai mitohondrijos. Raugos Cu/Zn superoksīda dismutāze galvenokārt lokalizēta citoplazmā, bet neliela daļa arī mitohondriju starpmembrānu telpā, savukārt Mn superoksīda dismutāze- mitohondriālajā matriksā (Culotta *et al.*, 2006). Superoksīda dismutāzes katalizē reakciju $O_2^- + O_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$, kur O_2^- galvenais avots ir elpošanas elementi mitohondrijos. Ūdeņraža peroksīds ir izteikti toksisks un šūnai ir noteikti ātri jātiek atbrīvotai no tā. To veic 2 enzīmu grupas: glutaciona peroksidāzes un katalāzes. Raugu šūnas katalāze tiek pieskaitīta arī šūnas stresa proteīnu grupai. Katalāze katalizē H_2O_2 sadalīšanos par skābekli un ūdeni. *Saccharomyces cerevisiae* šūnās atrodamas divas katalāzes – katalāze A un katalāze T. Raugos katalāze A lokalizējas peroksisomās un mitohondrijos, bet katalāze T – citoplazmā (Petrova *et al.*, 2004).

Vēl viens nozīmīgs savienojums raugu šūnās ir glutations. Tas piedalās šūnu aizsardzībā pret oksidatīvo stresu un mutantos, kuri nav spējīgi sintezēt glutacionu, to ir nepieciešams uzņemt eksogēni pat augot ne-stresa apstākļos (Grant *et al.*, 1996) Tāpat glutations ir iesaistīts sēra un slāpekļa badošanās reakcijās, toksisko metabolītu un ksenobiotiku detoksifikācijā, kā arī izturībā pret smago metālu izraisītu stresu (Penninckx, 2002).

Oksidatīvo bojājumu novēršanas sistēma var tikt iedalīta tiešā un netiešā. Viens svarīgs tiešās sistēmas process ir oksidēto proteīnu sulfhidril grupu redukcija. ROS izraisīto krustenisko disulfīdo saišu veidošanās starp molekulām un molekulas iekšienē var tikt novērsta ar disulfīdreduktāzes palīdzību. Tāpat metionīna oksidācija par metionīnsulfoksīdu var tikt novērsta pateicoties metionīnsulfoksīdreduktāzei (Davies, 2000). Netiešā sistēma darbojas 2 etapos: pirmkārt bojātā molekula (vai bojātā molekulas daļa) tiek atpazīta, aizvākta un degradēta. Tālāk, bojātā molekula tiek no jauna sintezēta vai molekulas daļa no jauna izveidota un ievietota. Pētījumi rāda, ka oksidētos proteīnus atpazīst proteasomu protealītiskie enzīmi. Domājams, ka lielākā daļa aminoskābju no oksidētajiem un degradētajiem proteīniem

tiek realizētas jaunu proteīnu sintēzē. Lipīdu dubultslānis, kas ticis oksidēts, piesaista fosfolipāzes enzīmus, kas aizvāc taukskābju hidroperoksīdus no membrānas, tādējādi aizkavē tālākās degradējošās reakcijas. Pētījumi rāda, ka taukskābju hidroperoksīdi, kas tiek atbrīvoti citoplazmā kļūst par mērķi glutaciona peroksidāzei. Tāpat pastāv iespēja, reducēt taukskābju hidroperoksīdus bez hidrolīzes un to izvadīšanas no membrānas. To veic glutaciona peroksidāzes grupas pārstāvis – fosfolipīd hidroperoksīda glutaciona peroksidāze (Davies, 2000).

1.3.3. Karstuma šoka proteīnu aizsargsistēma

Eksistē vēl viens molekulārās adaptācijas mehānisms aizsardzībā pret apkārtējās vides stresu, kas novērots visiem dzīvjiem organismiem, sākot no baktērijām līdz cilvēkam. Tas saistīts ar karstuma šoka proteīnu (*angl.* Hsp; Heat shock protein) sintēzi (Feder and Hofmann, 1999). Sākotnēji tika uzskatīts, ka šie proteīni piedalās tikai karstuma šoka izraisītā stresa gadījumā, taču tagad aizvien vairāk izpētīta šo proteīnu saistība arī aizsardzībā pret citu stresa faktoru iedarbību, piemēram, osmotisko stresu, radiāciju, brīvajiem radikāļiem, zemām temperatūrām, dažāda veida ķīmikālijām un smagajiem metāliem (Goyal *et al.*, 2005; Jönsson and Schill, 2007; Crawford and Davies, 1994; Neuhaus-Steinmetz and Rensing, 1997; Murata *et al.*, 2006). Tādējādi, runājot par šiem proteīniem arī termins „stresa proteīni” tiek lietots. Šie proteīni var darboties kā molekulārie šaperoni arī šūnās, kas nav pakļautas stresam un tiem ir svarīgas funkcijas proteīnu biosintēzē, foldingā, intracelulārajā lokalizācijā un transportā, reparācijā, kā arī nepareiza foldina rezultātā radušos proteīnu degradācijā (Feder and Hofmann, 1999). Karstuma šoka proteīnus galvenokārt klasificē pēc to molekulārā svara un iedala 6 pamatgrupās: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 un mazie karstuma šoka proteīni sHsp (*angl.* sHsp; small heat shock protein) (Bakthisaran *et al.*, 2015). Pie galvenajiem stresa proteīniem rauga šūnās tiek pieskaitīti Hsp150, Hsp104, Hsp83, Hsp70, Hsp60, Hsp40 un mazie karstuma šoka proteīni Hsp26/Hsp42 un Hsp12. Tāpat pie stresa proteīnu grupas raugu šūnās var tikt pieskaitīti vēl citi proteīni, piemēram, tādi kā ubikvitīns (Mager and Ferreira, 1993; Walsh *et al.*, 2004; Haslbeck *et al.*, 2004).

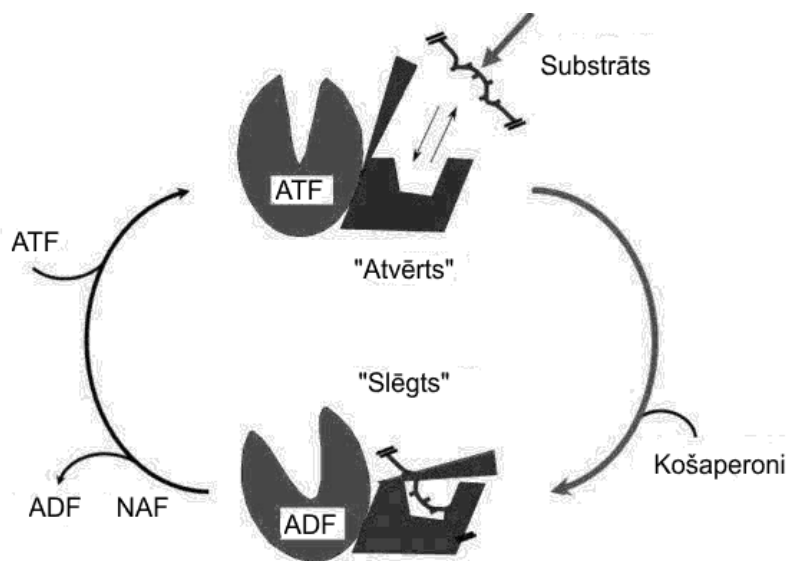
Hsp 150 ir šūnas sieniņas glikoproteīns, kas kovalenti saistīts ar β 1,3 – glikānu tīklojumu caur sārnu-jūtīgu saiti. Hsp150 pieder Pir proteīnu grupai un ir nepieciešams šūnas sieniņas stabilitātei. Tas tiek inducēts karstuma šoka, oksidatīvā stresa un slāpekļa limitācijas apstākļos, rezistencei pret antifungāliem līdzekļiem, kā arī var tikt sekretēts uz ārvidi (Yun *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999; Mrsa and Tanner, 1999; Teparic *et al.*, 2004).

Hsp104 pieder Hsp100 grupai un ir lokalizēts rauga šūnas citoplazmā un kodolā. Tā ekspresija normālos apstākļos ir minimāla, bet tā strauji pieaug šūnas pakļaujot stresa apstākļiem. Hsp104 nepieciešams šūnas termotolerances nodrošināšanai, kā arī noturībai pret zemām temperatūrām, etanolu un nātrija arsenītu. Hsp104 nepiedalās bojāto proteīnu degradācijā, bet sadarbībā ar Hsp 40 un Hsp70 proteīniem, veic bojāto proteīnu sakopojumu nodalīšanu un refoldingu. Sākotnēji Hsp104, izmantojot ATF enerģiju, atvieno proteīnus no bojāto proteīnu sakopojuma, tos atritina veidojot pavedienus un tālāk nodod Hsp70/Hsp40 kompleksam sekojošam refoldingam (Sanchez *et al.*, 1992; Bösl *et al.*, 2006). Tāpat pētījumi rāda, ka Hsp104 kopā ar trehalozi veido nozīmīgu šaperonu sistēmu raugu šūnās dehidratācijas laikā, kur Hsp104 darbojas īsa-perioda izžūšanas gadījumā, bet trehaloze ilgstoša-perioda gadījumā (Tapia and Koshland, 2014).

Hsp70 grupa ir vislielākā proteīnu grupa starp visiem stresa proteīniem (Sharma and Masison, 2009). *Saccharomyces cerevisiae* satur mitohondriālo Hsp70 (Ssc1), endoplazmātiskā tīklā lokalizēto Hsp70 (Kar2) un citoplazmas Hsp70, kas iedalīti vairākās klasēs – Ssa (Ssa1 - Ssa4), Ssb (Ssb1 un Ssb2), Sse (Sse1 un Sse2) un Ssz (Ssz1) (Pesisker *et al.*, 2010). Mitohondriālais Ssc1 ir nozīmīgs šūnai dažādos augšanas apstākļos un piedalās proteīnu translokācijā no citoplazmas uz mitohondrijiem. Pētījumi rāda, ka Ssc1 inaktivācija ved pie importa bloķēšanas mitohondrijos (Craig *et al.*, 1993). Kar2 ir lokalizēts endoplazmātiskā tīklā un, tāpat kā mitohondriālais Hsp70, ir nepieciešams proteīnu transportam cauri membrānām tieši mijiedarbojoties ar transportējamo proteīnu (Craig *et al.*, 1993). Zināms, ka endoplazmātiskā tīklā lokalizētais Hsp70 asociē ar jauni sintezētajiem sekrēcijas un transmembrānu proteīniem un veicina to veiksmīgu foldingu un montāžu, stabilizējot nesavērpto vai daļēji savērpto proteīnu struktūras, kā arī novēršot nevēlamu mijiedarbību veidošanos (Kohno *et al.*, 1993). Citoplazmas Hsp70 veido savstarpēji saistītu sistēmu, kurā Ssa un Ssb ir centrālie šaperoni, kamēr Sse un Ssz veic to košaperonu funkcijas (Pesisker *et al.*, 2010). Ssa klases proteīni piedalās šūnas augšanā un nepieciešami šūnas dzīvotspējas nodrošināšanā. Pētījumi rāda to saistību ar proteīnu translokāciju endoplazmātiskā tīklā un mitohondrijos (Craig *et al.*, 1993). Ssa un Ssb proteīni ir apmēram 60% identiski savā starpā, savukārt grupu iekšpusē proteīnu sekvenču līdzība ir tuva 100% (Sharma and Masison, 2009). Ssb proteīni tieši saistās ar ribosomām un kontaktē ar dažādām jauni sintezētām polipeptīdu ķēdēm tiklīdz tās pamet ribosomas, kā arī ir novērojumi tam, ka Ssb paralēli šaperona funkcijai iesaistīts arī šūnas signālu procesu regulācijā. Ssz1 ir saistīts ar Hsp40 košaperonu darbību un Ssb piesaistīšanos ribosomām (Pesisker *et al.*, 2010). Sse1 un Sse2 ir Hsp110 grupas pārstāvji. Mutācijas SSE1 raksturo ar palēlinātu augšanu un temperatūras jutību, savukārt SSE2 mutācijas neuzrāda fenotipiskus efektus. Šo proteīnu

galvenā funkcija ir būt par nukleotīdu apmaiņas faktoriem (NAF) proteīnu refoldinga procesā. Neatkarīgi no tā šie proteīni var saistīties arī ar nesavērptiem peptīdiem un novērst misfoldingu vai agregāciju. Sse1 var funkcionēt arī kā Hsp90 košaperons, tomēr tā molekulārā nozīme Hsp90 darbības ciklā nav līdz galam noskaidrota (Shaner *et al.*, 2005). Hsp70 darbībā ir iesaistīti arī vēl citi faktori, tādi kā košaperons Hsp40. Raugu *Saccharomyces cerevisiae* genoms kodē 22 Hsp40 dzimtas pārstāvjus (Walsh *et al.*, 2004). Pie tiem pieder DnaJ grupas pārstāvji, piemēram, Ydj1; Sis1; Scj1 un Sec63. Galvenā Hsp40 proteīnu funkcija ir regulēt ATF atkarīgu polipeptīdu saistīšanos ar Hsp70, savukārt substrāta atbrīvošana no Hsp70 tiek regulēta ar NAF palīdzību (Fan *et al.*, 2003). Tā piemēram, GrpE (Mge1) ir lokalizēts mitohondrijos un darbojas kopā ar Ssc1 proteīnu, funkcionējot kā NAF. Ydj1 ir lokalizēts citoplazmā un mijiedarbojas ar Ssa1 un Ssa2 proteīniem. Sis1 ir lokalizēts citoplazmā, kā arī kodolā un darbojas kopā ar Ssa1. Scj1 lokalizēts endoplazmātiskajā tīklā un darbojas kopā Kar2. Sec63 iesaistīts proteīnu transportā caur endoplazmātiskā tīkla membrānām un sadarbojas ar Kar2 proteīnu (Craig *et al.*, 1993; Silberstein *et al.*, 1998; Zhong and Arndt, 1993; Gautschi *et al.*, 2001).

Hsp70 vadīts polipeptīdu foldings notiek caur atkārtotiem substrāta piesaistīšanās un atbrīvošanās cikliem, izmantojot ATF enerģiju. Hsp70 šaperoni sastāv no 3 strukturāliem domēniem: (i) ATFāzes domēns, kas saista un hidrolizē ATF (ii) substrāta piesaistīšanas domēns, kas veido „kabatu” un (iii) C-termināla domēns, kas veido „vāciņam” līdzīgu konstrukciju virs „kabatas”, lai palīdzētu noturēt piesaistīto substrātu slēgtā konformācijā (Sharma and Masison, 2009). Hsp70 proteīnu kompleksa darbības cikls shematiski parādīts 10.attēlā.



10.attēls. Hsp70 darbības cikla modelis (Sharma and Masison, 2009)

ATF piesaistīšanās pie Hsp70 ATFāzes domēna atver „vāciņu” virs substrāta piesaistīšanas domēna un ļauj substrātam piesaistīties. ATF hidrolīze, ko katalizē košaperoni, rada „vāciņa” aizvēršanos un substrāta notveršanu „kabatā”. Tālāk NAF apmaina ADF ar ATF, kā rezultātā saistītais substrāts atbrīvojas un jauns Hsp70 darbības cikls var sākties. Pēc atbrīvošanās no Hsp70 kompleksa proteīns var savērties pats, vai arī tikt pārnestš pie cita šaperona tālākai pārveidei, piemēram, Hsp90 (Sharma and Masison, 2009).

Raugu šūnās Hsp90 (Hsp82) ir primāri lokalizēts citoplazmā un tiek bagātīgi sintezēts arī normālos augšanas apstākļos. Tas saistās ar dažāda veida proteīniem un piedalās specifisku proteīnu, kas iesaistīti šūnas cikla kontrolē un signālu pārnēsē, struktūras uzturēšanā un regulācijā, kā arī kodola transportā un DNS-proteīnu mijiedarbībā. Tā brīvā forma ir atvērta konformācija proteīna piesaistei. Proteīna un ATF pievienošanās nosaka konformācijas maiņu, veidojot gredzenveidīgu slēgtu struktūru un pēc ATF hidrolīzes aktivētais proteīns tiek atbrīvots atkal veidojot atvērtu, nukleotīdu brīvu konformāciju. Hsp90 mijiedarbojas ar vairākiem papildus proteīniem jeb košaperoniem, piemēram, viens no tiem ir Sti1. Jauni sintezētais proteīns vispirms mijiedarbojas ar Hsp70/Hsp40 sistēmu, bet tālāka proteīna pārnese no Hsp70 pie Hsp90 notiek pateicoties proteīnam Sti1, kas ir spējīgs vienlaicīgi saistīt Hsp70 un Hsp90. Citu košaperonu piesaistīšanās Hsp90 var būt saistīta ar tā konformācijas izmaiņām, piemēram, Sba1 stabilizē proteīna slēgtu konformāciju. (Louvion *et al.*, 1998; Zuehlke and Johnson, 2010).

Hsp60 proteīni veic funkcijas, kas ir līdzīgas Hsp70. Rauga šūnās primāri atrodams mitohondriālais Hsp60, tomēr nesenie pētījumi uzrāda arī citoplazmā lokalizēta Hsp60 esamību (Kalderon *et al.*, 2015). Mitohondriālais Hsp60 pieder šaperonīnu grupai un piedalās proteīnu transportā un refoldingā no citoplazmas uz mitohondriālo matriksu sadarbojoties ar Hsp10. Kompleksu veidošanās un disociācija ir saistīta ar ATF piesaisti un hidrolīzi. Citoplazmas Hsp60 funkcijas nav līdz galam izpētītas, tomēr domājams, ka tas piedalās proteasomas darbības modulēšanā un noteiktu citoplazmas proteīnu degradācijas inhibēšanā (Kalderon *et al.*, 2015).

Pētījumi rāda arī tā saucamo mazo karstuma šoka proteīnu nozīmību anhidrobiotos, galvenokārt augos, tomēr jau tagad zināms par to klātbūtni arī citos organismos (Rebecchi *et al.*, 2007). Daudzi sHsp izrāda šaperoniem līdzīgu darbību, piesaistoties nesavērptiem proteīniem un novēršot to agregāciju, kā arī nodrošinot to refoldingu vai mijiedarbību ar citiem ATF-atkarīgiem šaperoniem. sHsp tiek raksturoti kā ATF neatkarīgi šaperoni, kuru molekulārās masas ir 12-43 kDa robežās, tie veido lielus oligomērus un to indukcija parasti ir saistīta ar stresa apstākļiem (Miguel *et al.*, 2009; Bakthisaran *et al.*, 2015). Raugu šūnās *Saccharomyces cerevisiae* citoplazmā sHsp pārstāv Hsp26 un Hsp42. Hsp26 un Hsp42 veido

lielus oligomēru kompleksus sastāvošus no 24-26 subvienībām un novērš mērķa proteīnu agregāciju (Haslbeck *et al.*, 2004). Hsp26 tiek pastiprināti inducēts karstuma šoka, sāls šoka, osmotiskā stresa, zema pH un slāpekļa un oglekļa trūkuma apstākļos (Carmelo and Sa-Correia, 1997; Amoros and Estruch, 2001; Burnie *et al.*, 2006). Atšķirībā no Hsp26, kas tiek inducēts tikai stresa apstākļos, Hsp42 funkcionē šūnā gan stresa, gan normālos apstākļos un to funkcijas lielā mērā pārklājas, lai gan to bioķīmiskie ceļi atšķiras. Karstuma šoka apstākļos Hsp42 un Hsp26 novērš agregāciju vienai trešdaļai citoplazmas proteīnu un tā laikā Hsp26 transformējas no oligomēra uz dimēriem, savukārt Hsp42 saglabā savu struktūru (Haslbeck *et al.*, 2004).

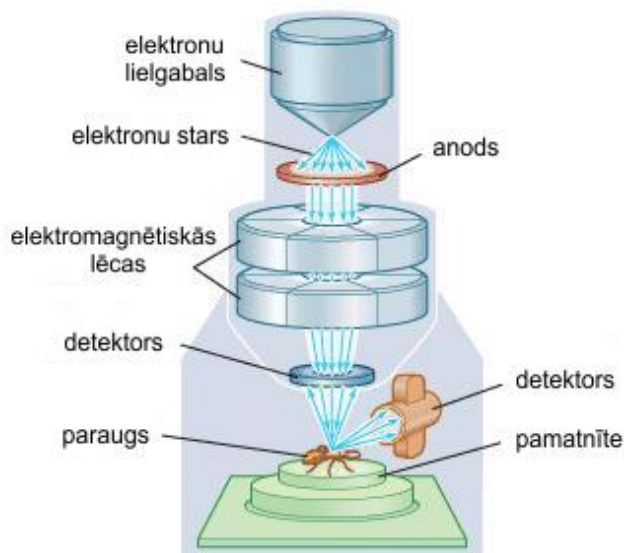
Vēl viens nozīmīgs sHsp rauga šūnās ir Hsp12, kas tiek aprakstīts kā LEA (*angl.* Late embryogenesis abundant) proteīns. Hsp12 tiek pastiprināti inducēts, kad šūnas tiek pakļautas oksidatīvajam stresam, osmotiskajam stresam, etanola stresam, karstuma šokam vai pazeminātai temperatūrai (Praekelt & Meacock, 1990; Stone *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 2006). Izpētīts, ka šis proteīns ir lokalizēts rauga šūnas citoplazmatiskajā membrānā, kā arī citoplazmā un šūnas sienā, nodrošinot raugu barotoleranci un norādot uz Hsp12 saistību ar šūnas sienas elastību (Sales *et al.*, 2000; Motshwene *et al.*, 2004).

1.4. Mikroskopijas metodes raugu šūnu izpētē

1.4.1. Skenējošā elektronu mikroskopija

Skenējošais elektronu mikroskops (SEM) pieder elektronu mikroskopijas grupai, kurā attēlu iegūst skenējot paraugu ar fokusētu elektronu staru. Elektronu mikroskopijas aizsākumi meklējami pagājušā gadsimta 30-tajos gados. Kā pirmais šajā grupā parādījās caurstarojošais jeb transmisijas elektronu mikroskops (TEM), kurā elektroni tiek virzīti caur ultraplānu (50 – 90 nm) parauga griezumam. Tam sekoja skenējošā elektronu mikroskopa izveide 1935. gadā (Bogner *et al.*, 2007; Kremer *et al.*, 2015). Elektronu stars mijiedarbojoties ar objektu, rada dažādus starojumus, kas satur informāciju par parauga topogrāfiju un sastāvu. Ar divu vai triju elektromagnētisko lēcu palīdzību uz parauga virsmas fokusējas šaurs elektronu stars, kura paātrināšanai tiek pielietots augsts spriegums līdz 30 kV. Pateicoties tam, ka elektroniem ir īsāks viļņa garums, nekā redzamajai gaismai, t.i. aptuveni 100 000 reižu mazāks par redzamās gaismas vidējo viļņa garumu, ir iespējams iegūt attēlu ar augstāku izšķirtspēju nanometru līmenī (Winey *et al.*, 2014). Elektromagnētiskās lēcas fokusē un virza staru pa objekta virsmu noteiktā virzienā. Stara elektronu un objekta iedarbības rezultātā rodas dažāda veida starojumi – sekundārie un atstarotie elektroni; elektroni, kas izgājuši cauri objektam;

rentgenstarojums un gaismas starojums. Jebkuru no šiem starojumiem reģistrē atbilstošs detektors, kas pārveido starojumu elektriskajos signālos, kuri pēc pastiprināšanas tiek novirzīti uz ekrānu. Uz ekrāna parādās objekta palielināts attēls, ko var saglabāt digitālā formātā (Postek *et al.*, 1980; Reimer, 1998; Goodhew *et al.*, 2001). Tipiska SEM shēma parādīta 11.attēlā.



11.attēls. Skenējošā elektronu mikroskopa shēma (Encyclopaedia Britannica, 2008)

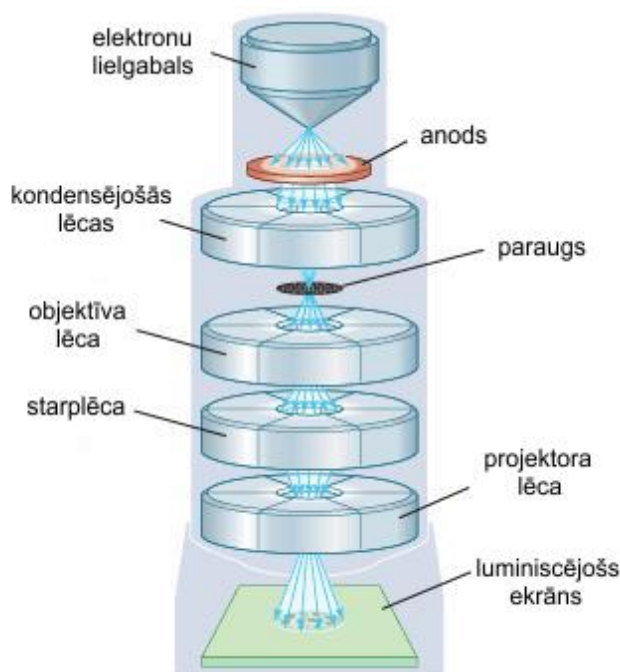
SEM augstā izšķiršanas spēja tiek panākta veidojot attēlu, izmantojot sekundāros elektronus. To nosaka zonas diametrs, no kura elektroni emitējas. Zonas izmērs galvenokārt ir atkarīgs no stara diametra, objekta īpašībām un stara elektronu ātruma. Pie liela primāro elektronu iespiešanās dziļuma sekundārie procesi notiek visos virzienos, palielinās zonas diametrs un izšķiršanas spēja samazinās. Tāpēc, lai iegūtu augstu izšķiršanas spēju, nepieciešams izmantot staru ar salīdzinoši mazu diametru. Taču no tā samazinās plūsmas jauda, tādējādi nepieciešams samazināt skenēšanas ātrumu, lai katrā objekta punktā uzkrātu pietiekami lielu primāro elektronu skaitu un attiecīgu daudzumu sekundāro (Хокс, 1972; Власов *et al.*, 2011).

Pētīt bioloģiskos materiālus ar SEM, svarīgi ņemt vērā, ka paraugs tiek pētīts vakuumā zem spiediena vismaz 5×10^{-5} Torr. Tas nepieciešams vairāku iemeslu dēļ. Pirmkārt, strāvai plūstot caur kvēldiegu, tas stipri uzkarst un gaisa vidē pie atmosfēras spiediena tas oksidētos un izdegtu. Otrkārt, atbilstoši un precīzai mikroskopa lēcu darbībai ir nepieciešama tīra, no putekļiem brīva apkārtējā vide. Papildus tam, gaisa un putekļu klātbūtne var novirzīt un mijiedarboties ar elektroniem pirms tie sasniedz paraugu (Postek *et al.*, 1980). Tādējādi izmantojot SEM, bioloģiskie paraugi nav apskatāmi to natīvā stāvoklī, bet ir nepieciešama

iepriekšēja parauga sagatavošana. Tā ietver sevī parauga fiksāciju, kā arī paraugu nepieciešams apputināt t.i., pārklāt ar vadītspējīgu materiālu, piemēram, zeltu vai grafitu, lai nodrošinātu labu elektrisko kontaktu ar parauga pamatnīti (Бласов *et al.*, 2011).

1.4.2. Caurstarojošā elektronu mikroskopija

Caurstarojošā jeb transmisijas elektronu mikroskopija (TEM) ir mikroskopijas metode, kurā ultraplānu parauga griezumu apstaro ar elektronu kūli, tādējādi attēls veidojas elektroniem mijiedarbojoties ar paraugu t.i., absorbējoties paraugā vai izejot tam cauri. TEM darbības pamatprincipi ir līdzīgi gaismas mikroskopam, tikai, lai apgaismotu paraugus, tajā tiek izmantots elektronu kūlis, nevis gaisma un optisko lēcu vietā tiek lietotas elektromagnētiskās lēcas. TEM galvenās uzbūves daļas ir elektronu lielgabals, kondensējošās lēcas, objektīva lēca un projicējošā sistēma, kas ataino reālo attēlu uz luminiscējoša ekrāna, ko tālāk detektē uz fotoplates vai ar digitālo kameru (12.att.).



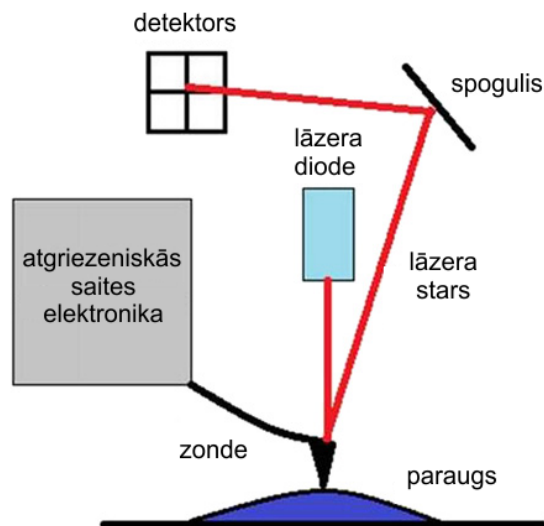
12.attēls. Caurstarojošā elektronu mikroskopa shēma (Encyclopaedia Britannica, 2008)

Elektronu lielgabalā katods - uzkarstēts kvēldiegs izstaro elektronus, kuri elektriskā lauka iedarbībā paātrinās anoda virzienā un šķērso tā atveri. Šaurais paātrināto elektronu stars nokļūst elektromagnētisko lēcu sistēmā, kurā tiek fokusēts un tālāk šķērso paraugu. Elektroni, kas iziet cauri paraugam izkliedējas, tāpēc tiek fokusēti ar objektīva lēcu, kas veido pirmreizējo attēlu. Objektīva lēca dod palielinājumu vidēji 100 x. Tālāk seko projicējošā

sistēma, kurā atrodas starplēca ar palielinājumu vidēji 10x, kas attēlu pārnes uz projektorā lēcu, kas veido gala varianta stipri palielināto attēlu. Projektorā lēca dod palielinājumu līdz 100x, projicējot attēlu uz luminiscējoša ekrāna, kurš spīd elektronu bombardēšanas rezultātā. Dažreiz, lai palielinātu vāju attēla spilgtumu lieto luminiscento ekrānu ar elektronu optisko pārveidotāju. Tādējādi kopīgais elektrona mikroskopa palielinājums sasniedz 100 000x (Власов *et al.*, 2011). Līdzīgi kā SEM, arī TEM darbībai vajadzīgs vakuums, tādējādi izmantojot šo mikroskopijas metodi, nepieciešama iepriekšēja bioloģisko paraugu sagatavošana. Standarta paraugu sagatavošana TEM ietver sevī tādus soļus, kā parauga fiksācija, atūdeņošana un ieslēgšana sveķos, ultraplāno griezumu iegūšana un kontrastēšana. Pastāv arī metodikas, kas paredz ķīmiskās fiksācijas vietā izmantot parauga kriofiksāciju, pielietojot, piemēram, iegremdēšanu propānā vai etānā, vai arī strauju sasaldēšanu zem augsta spiediena (Уикли, 1975; Winey *et al.*, 2014).

1.4.3. Atomspēku mikroskopija

Atomspēku mikroskopija (AFM) ir virsmas skenēšanas metode, kas ļauj detektēt un mērīt parauga topogrāfiskos raksturlielumus ar izšķirtspēju nanometros dažādās vidēs, tostarp arī šķidrumā, kā, piemēram, buferī, kas dod iespēju analizēt bioloģisku materiālu to dabiskajā stāvoklī (Gag, 2010). AFM pieder skenējošās zondes mikroskopijas metožu grupai, kuras aizsākumi meklējami pagājušā gadsimta 80-tajos gados. Pirmā šajā grupā parādījās skenējošā jeb tuneļmikroskopija, kas deva iespēju vizualizēt strāvas vadītāju un pusvadītāju materiālus ar izšķirtspēju nanometru līmenī. Paralēli tika izgudrota skenējošā tuvā lauka optiskā mikroskopija, kas ļāva izmantot gaismas mikroskopiju zem optiskās izšķirtspējas robežas. Jaunākais grupas pārstāvis ir atomspēku mikroskopija, kura šobrīd ir plašāk izmantotā skenējošās zondes mikroskopijas metode (Butt *et al.*, 2005). AFM pamatā ir mijiedarbības spēku mērīšana starp adatu un virsmu un tai ir vairākas priekšrocības bioloģisko materiālu pētīšanā, salīdzinot ar citām metodēm. Pirmkārt, kad tiek gatavoti paraugi AFM eksperimentiem, nav nepieciešama paraugu sarežģīta priekšapstrāde, ievietošana vakuumā, saldēšana, krāsošana vai pārklāšana ar vadītspējīgu materiālu. Tādējādi ir mazāka iespēja sagraut paraugu sagatavošanas procesā, un parauga bioloģiskās funkcijas var tikt saglabātas. Otrkārt, AFM var realizēt gaisa vidē, kā arī šķidrumā, kas ļauj skenēt paraugus arī fizioloģiskā vidē (Chang *et al.*, 2012). Galvenās AFM uzbūves daļas ir: zonde, kas sastāv no konsoles ar adatu, lāzers, fotodiožu matrica, detektors un atgriezeniskās saites elektronika (13.att.).



13.attēls. Atomspēku mikroskopa shēma (Chang *et al.*, 2012)

Ar adatu tuvojoties virsmai uz to iedarbojas pievilkšanās spēki, bet pieskaroties virsmai – atgrūšanās spēki. Atkarībā no pētāmā fizikālā efekta un parauga materiāla AFM izmanto standarta skenēšanas metodes: kontakta metode, bezkontakta metode un puskontakta metode (Webb *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012). Kontakta metodē adata ir visu laiku saskarē ar parauga virsmu un tā tiek detektēta pēc adatas atliekšanās. Šī metode nav piemērota bioloģisku paraugu skanēšanai, jo var sabojāt paraugu virsmu, kā arī uz adatiņu spēcīgi iedarbojas kapilārie spēki, kas var ietekmēt izšķirtspēju. Bezkontakta metodē adata atrodas noteiktā attālumā no parauga un nepieskaras tā virsmai. Reāli bezkontakta mērījumus ir ļoti grūti realizēt, jo, lai panāktu augstu izšķirtspēju, adata ir ļoti jāpietuvina parauga virsmai, kā rezultātā adata ik pa brīdim nedaudz pieskaras virsmai. Tādējādi mērījumiem biežāk tiek izmantota puskontakta metode. Puskontakta metodē adatai tiek ierosinātas noteiktas svārstības un svārstību amplitūdas vai fāzes izmaiņas ārējo spēku iedarbības rezultātā tiek detektētas ar atgriezeniskās saites palīdzību (Webb *et al.*, 2011).

2. Materiāli un metodes

2.1. Limitēta skābekļa apstākļos augušu dzīvotspējīgu sausu raugu iegūšana

2.1.1. Izmantotie mikroorganismi un kultivēšanas apstākļi

Eksperimentos izmanto raugu celmus *Saccharomyces cerevisiae* 14 (diploīds, nesporulējošs) un *Saccharomyces cerevisiae* 77 (diploīds, nesporulējošs) (ņemti no Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta Šūnu bioloģijas laboratorijas raugu kolekcijas). Sējmateriālu gatavo raugu kultūru ar cilpas palīdzību ienesot šķidrā barotnē un pēc tam kultivējot 24 stundas 30 °C temperatūrā uz kratītāja (ES 20/60, Biosan, EU) (180 apgr/min). Eksperimentos izmantotās šķidrās barotnes sastāvs (g/l) ir sekojošs : MgSO₄ - 1,44; NaCl - 0,5; (NH₄)₂SO₄ - 3,7; KH₂PO₄ – 1; K₂HPO₄ - 0,13; melase – 42. Barotnes pH pirms autoklāvēšanas 5,0 – 5,5.

Lai iegūtu biomasu, 750 ml tilpuma kolbās ielej 200 ml melases barotnes aerobajiem apstākļiem un 500 ml tilpuma kolbās ielej 450 ml melases barotnes limitēta skābekļa apstākļiem. Izmantojot automātisko pipeti, pievieno barotnēm aerobajiem apstākļiem katrā kolbā 1 ml un limitēta skābekļa apstākļiem katrā kolbā 2 ml sējmateriāla. Raugus audzē aerobos apstākļos uz kratītāja (180 apgr/min) 30 °C temperatūrā un limitēta skābekļa apstākļos termostatā 30 °C temperatūrā līdz stacionārajai augšanas fāzei.

2.1.2. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot osmolītus un sāli

Eksperimentos izmanto sekojošus savienojumus: cukuri (glikoze, laktoze, saharoze), polioli (sorbīts, mannīts, ksilīts, glicerīns) un sāls (nātrija hlorīds). 100ml sterila ūdens pievieno attiecīgo savienojumu, pagatavojot šķīdumus ar dažādām molaritātēm – 1M, 0,75M, 0,5M, un 0,25M. Katrā kolbā pievieno 1 gramu nosusināta (presēta) rauga. Kontroles paraugu inkubē ūdenī. Inkubācijas laiks 3 stundas 30 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas centrifugē 10 minūtes pie 5000 apgr/min. Nolej šķidrumu, iegūst rauga biomasu un to nosusina. Raugu liek žāvēties termostatā 30 °C temperatūrā.

2.1.3. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot trehalozi

100 ml sterila ūdens pievieno trehalozi, pagatavojot šķīdumu ar molaritāti – 100 mM. Kolbā pievieno 1 gramu nosusināta (presēta) rauga. Kontroles paraugu inkubē ūdenī bez trehalozes pievienošanas. Inkubācijas laiks 3 stundas 30 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas centrifugē 10 minūtes pie 5000 apgr./min. Nolej šķidrumu, iegūst rauga biomasu un to nosusina. Raugu liek žāvēties termostatā 30 °C temperatūrā.

2.1.4. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot antioksidantus

Kolbās salej 100 ml destilēta ūdens un autoklavē pie 1 atmosfēras 121 °C temperatūrā, 20 minūtes. Pēc autoklāvēšanas sterilajā ūdenī, pievienojot glutationu, pagatavo šķīdumus ar molaritātēm – 100 μM un 100 mM. Eksperimentos ar inkubāciju profilna šķīdumos izmantota molaritāte 100 mM un 300 mM. Katrā kolbā tiek pievienots 1 grams nosusināta (presēta) rauga. Kontroles paraugs tiek inkubēts ūdenī. Raugus dotajos šķīdumos inkubē 3 stundas 30 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas centrifugē 10 minūtes pie 5000 apgr./min. Nolej šķidrumu, iegūst rauga biomasu un to nosusina. Tad raugu liek žāvēties termostatā 30 °C temperatūrā.

Eksperimentos ar glutationa pievienošanu barotnei, uz 450 ml barotnes pievieno sekojošus glutationa daudzumus – 0,02g, 0,4g un 0,75g. To pievieno barotnei pēc autoklāvēšanas sterilos apstākļos pirms sējmateriāla pievienošanas.

2.1.5. Mitruma noteikšana

Raugu šūnas pāriet anabiozes stāvoklī, kad šūnu mitrums sastāda 8 – 10 %. Lai novērtētu eksperimentos izmantojamo šūnu stāvokli, nepieciešams noteikt parauga mitrumu. Uz svariem nosaka tukšas un izžāvētas sverglāzītes svaru. Materiālu, kuram nepieciešams noteikt mitrumu nosver un ieber sverglāzītē. Katram pārbaudāmajam paraugam iesver vismaz 3 atkārtojumus. Sverglāzītes liek sausā gaisa termostatā 105 °C temperatūrā uz 24 stundām. Pēc 24 stundām tās izņem no termostata un ieliek eksikatorā stundu atdzesēties. Pēc tam sverglāzītes nosver un atkal liek termostatā uz 24 stundām, tāpēc, ka noteikts, ka pēc šī žāvēšanas laika, sverglāzīšu svars sverot vairs nemainās, un to uzskata par materiāla beigu svaru. Mitrumu paraugos nosaka pēc svara starpības pirms un pēc žāvēšanas.

2.1.6. Raugu šūnu rehidratācija

Pēc šūnu žāvēšanas veic šūnu rehidratāciju. Izmanto divu veidu rehidratāciju – ātro un lēno rehidratāciju. Ātrā rehidratācija notiek paraugu ievietojot destilētu ūdeni uz 10 minūtēm istabas temperatūrā. Lēnā rehidratācija notiek paraugu ievietojot mitrā kamerā (ūdens tvaikos) uz 2 stundām pie temperatūras 37 °C.

2.1.7. Raugu šūnu dzīvotspējas noteikšana

Šī metode balstās uz primulīna atšķirīgo absorbciju dzīvajās un nedzīvajās šūnās. Krāsviela nespēj difundēt caur dzīvās raugu šūnas citoplazmatisko membrānu un nokrāso tikai šūnas sienīņu košā fluoriscējošā krāsā. Ja membrāna ir bojāta, primulīns spēj caur to difundēt, sajaukties ar citoplazmu un piešķirt tai košu fluoriscējošu krāsu (Rapoport and Meysel, 1985). Dzīvotspējīgo raugu šūnu skaits (%) tiek noteikts, izmantojot luminiscences mikroskopu (BX 51; Olympus, Japan). Pēc attēla iegūšanas, izmantojot vienu rokas skaitītāju, tiek saskaitīts kopējo redzamo šūnu skaits, ar otru – nedzīvās šūnas, kuras ir košā fluorescējošā krāsā. Dzīvotspēju % aprēķina nosakot dzīvo šūnu attiecību pret kopējo šūnu skaitu.

2.1.8. Trehalozes daudzuma noteikšana

Raugu šūnas dezintegrē 0,1M fosfātu buferī 20 minūtes pie 3000 apgr/min, izmantojot dezintegrātoru SCP (Innomed-Konsult AB, Sweden). Pēc dezintegrācijas paraugu centrifugē 5 minūtes pie 14000 apgr/min un iegūto supernatantu atdala. Trehalozes daudzumu nosaka izmantojot hromatogrāfu Agilent 1100 (HPLC) (Agilent, Germany), Asahipak SH1011 kolonna (Shodex, Japan)(garums 300 mm, diametrs 8,0 mm), priekškolonna SH-G (garums 50 mm, diametrs 6 mm), diferenciālais refraktometrijas detektors RID G1362. Mobilā fāze sastāv no 0,01N H₂SO₄, tās ātrums 0,6 ml/min, kolonnā ievadāmā parauga daudzums 5µl, darba temperatūra 50 °C.

2.2. Mikroskopijas pētījumi

2.2.1. Skenējošās elektronu mikroskopijas pētījumi

Paraugus pēta izmantojot skenējošo elektronu mikroskopu ISM-T200 (JEOL, Japan). Tiek pagatavots 5% glutaraldehīda šķīdums fosfātu buferī pH 7,2. Raugus fiksē 20 stundas

istabas temperatūrā. Otrā dienā paraugus nocentrifūgē un 3 reizes, katru 15 minūtes, mazgā destilētā ūdenī. Pēc mazgāšanas paraugus apstrādā ar 2% KCl šķīdumu destilētā ūdenī un tajā atstāj uz 48 stundām ledusskapī. Pēc tam paraugus atkal mazgā ar destilētu ūdeni 15 minūtes. Tālāk notiek raugu dehidratācija pieaugošas koncentrācijas acetonos (60%, 70%, 80%, 90% un 100%), katrā izturot 10 minūtes. Rauga suspensiju acetona uznes uz speciāla paliktņa, kas piemērots ievietošanai SEM. Paraugus žāvē, apputina ar zeltu un skatās mikroskopā pie 10 – 25 kV.

2.2.2. Caurstarojošās elektronu mikroskopijas pētījumi

2.2.2.1. Paraugu fiksācija

Paraugus fiksē ar atdzesētu 1,5 % KMnO_4 šķīdumu ūdenī 2 stundas pie 4 °C. Paraugam pievieno KMnO_4 šķīduma un novieto ledusskapī uz 30 minūtēm, tad centrifugē un uzlej jaunu porciju KMnO_4 šķīduma. Pēc 1,5 stundas atkal centrifugē un vairākas reizes atmazgā ar destilētu ūdeni. Pēc pēdējās ūdens noliešanas pievieno 1,5 ml osmija fiksatora, kurš gatavots no 1 daļas 2% OsO_4 un 1 daļas 0,1M fosfātu bufera, kura pH 7,2 un novieto noslēgtos stobriņos ledusskapī uz 12 stundām. Otrā dienā nofiksētos paraugus izņem no ledusskapja, pielej un atmazgā ar to pašu fosfāta buferi centrifugējot vairāk reižu. Tālāk darbojas sekojoši: 2 reizes paraugus centrifugē ar buferi – 5 minūtes katru reizi un 2 reizes paraugus centrifugē ar destilētu ūdeni – 5 minūtes katru reizi.

2.2.2.2. Paraugu atūdeņošana un ieslēgšana sveķos

Centrifugēšanas laikā sagatavo 2% agara šķīdumu. To siltu uznes uz stikla pamatnītes un siltajā pilienā iejauc nofiksēto paraugu. Atdzesē un ar žileti sagriež sīkos gabaliņos (apmēram 1 mm³), kurus ievieto sverglāzītēs un sāk atūdeņošanu pēc sekojošas shēmas:

2 reizes 30 % spirtā – 20 min (katru reizi);

2 reizes 50 % spirtā – 20 min (katru reizi);

2 reizes 70 % spirtā – 30 min (katru reizi);

2 reizes 96 % spirtā – 30 min (katru reizi);

2 reizes 100 % spirtā – 30 min (katru reizi);

2 reizes 100% propilēnoksīdā – 15 min (katru reizi);

1 reizi paraugus ievieto maisījumā propilēnoksīds : sveķi (2 : 1) – 45 min;

1 reizi paraugus ievieto maisījumā propilēnoksīds : sveķi (1 : 2) – 45 min.

Pēc tam paraugus ieslēdz sveķos un atstāj uz 24 stundām vaļējos trauciņos. Nākamajā dienā paraugus iepilda kapsulās, pārlejot tos ar jaunu porciju sveķu, kuriem pievienots katalizators 0,2 % (Epoxy Embedding Medium accelerator) uz 10 ml sveķu. Tālāk kapsulas polimerizē pie noteiktām temperatūrām sekojošā secībā: 35 °C – 24 stundas; 45 °C – 12 stundas un 60 °C – 24 stundas.

2.2.2.3. Ultraplāno griezumu iegūšana un kontrastēšana

Pēc polimerizācijas kapsulas griež ar ultratomu (Ultratome V, LKB, Sweden). Griezumus uzkrāj uz destilēta ūdens virsmas, kas iepildīts pie nažiem piestiprinātajās vanniņās. Ja griezumiem ir sudrabaini pelēka krāsa, tad ir izdevies iegūt pareiza biezuma griezumus. Ja griezumam ir nedaudz dzeltenīgs vai zilgans, tad jāsamazina griezuma biezums. Ja griezumam plīst, tad ir jāpalielina griezuma biezums, kas var gadīties, ja sveķu polimerizācijā ir bijusi kļūme. Griešanas procesā uz ūdens virsmas veidojas griezumu lentīte, kuru izceļ ātri un precīzi pieskaroties griezumiem ar speciāli sagatavota sietiņa plēvītes pusi. Pēc tam iegūtos griezumus, kas uznesti uz tīkliņiem žāvē 5 - 10 minūtes un kontrastē svina citrāta šķīdumā 15 minūtes. Tālāk noskalo 1-2 minūtes ar NaCl 0,1% šķīdumu un visbeidzot atmazgā ar destilētu ūdeni. Gatavos tīkliņus žāvē 30 minūtes. Paraugus pēta izmantojot caurstarojošo elektronu mikroskopu JEM 1200 EX (JEOL, Japan).

2.2.3. Atomspēku mikroskopijas pētījumi

Paraugus pēta izmantojot atomspēku mikroskopu Solver P47 PRO (NT-MDT, Russia). Kā paraugu pamatnītes izmanto stikliņus ar izmēru vidēji 2 x 2 cm. Pirms izmantošanas stikliņi tiek mazgāti ar spirtu un destilētu ūdeni. Uz stikla virsmas uzpilda nelielu daudzumu izkausēta 2% agara un lieko notecina, lai veidotos gluds klājums. Stikliņus ar uznesto agaru žāvē 30 minūtes un tad uz tā uzpilda apm. 1 µl parauga, kas iepriekš sagatavots 5ml destilēta ūdens sajaucot ar 0,01 g rauga. Paraugu žāvē 10 minūtes un tad skenē, izmantojot puskontakta metodi. Iegūtos datus apstrādā ar Novas 1.0.26 programmatūru. Šūnas sienas stingrības novērtējumu veic izmantojot lāzera novirzes-konsoles pozīcijas līknes, kur uz horizontālās ass ir attēlota konsoles novirze pa mikroskopa vertikālo asi (Å), bet uz vertikālās ass (nA) lāzera novirze uz diožu uztvērēja (DFL). Konsoles pārvietojuma un DFL signāla vērtības attiecība ataino parauga pretestību izdarītajam spiedienam t.i. parauga stingrību. Jo lielāka ir materiāla pretestība spiedienam, jo stāvāka ir taisne un lielāks leņķis φ. Paraugu skanēšanai izmantota

silīcija zonde CSG10 ar spēka konstanti no 0,01-0,5 N/m (NT-MDT, Russia).

2.3. Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas pētījumi

Rauga šūnu ķīmiskā sastāva analīzi veic izmantojot Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopiju (FTIR). Raugu šūnas mazgā ar destilētu ūdeni. 5 – 10 µl parauga suspensijas žāvē pie T<50 °C uz 384 bedrīšu silikona plates. Spektrs tiek ierakstīts diapazonā 4000–600 cm⁻¹, ar mikroplašu lasītāju HTS-XT (Bruker, Germany) un dati tiek apstrādāti ar OPUS 6.5 programmatūru.

2.4. Karstuma šoka proteīnu Hsp70 pētījumi

2.4.1. Dezintegrācija un proteīna daudzuma noteikšana

Veic parauga dezintegrāciju 0,1M fosfātu buferī 20 minūtes pie 3000 apgr/min, izmantojot dezintegrātoru SCP (Innomed-Konsult AB, Sweden). Pēc dezintegrācijas paraugu centrifugē 5 minūtes pie 14000 apgr/min un iegūto supernatantu atdala. Proteīnu koncentrāciju supernatantā nosaka spektrofotometriski (Ultrospec 2100 pro, Amersham, UK), izmantojot Bredforda metodi (Bradford,1976).

2.4.2. Elektroforēze

Proteīna sadalīšanai pēc to molekulārā svara, izmanto SDS denaturējošo poliakrilamīda gēla elektroforēzi. Stikla rāmītī tiek sagatavotas 5 % koncentrējošā un 10% sadalošā gēla daļas. Paraugiem pievieno Laemmli buferi un karsē 5 minūtes pie temperatūras 100 °C. Uz katra gēla celiņa uznes 20 µl parauga, kas satur 100 µg proteīna. Kad paraugi uznesti, elektroforēzes kamerai uzliek vāku un pieslēdz strāvas avotam - 200V (MP 3AP, Cleaver, UK).

2.4.3. Proteīnu pārnese

Proteīnu pārnesei no gēla uz nitrocelulozes membrānu izmanto pussausās pārnese aparātu (CSL, Cleaver, UK) un Western Blot metodi. Pēc elektroforēzes gēlu pārvieto pārnese buferī, kurā ievieto arī nitrocelulozes membrānu un 12 filtrpapīra loksnītes. Uz pārnese iekārtas pozitīvās plates tiek uzklātas 6 filtrpapīra loksnītes, tad membrāna, tai

sekojoši gēls un pa virsu atlikušās 6 filtrpapīra loksniņas. Virsū novieto negatīvo plati un sistēmu pieslēdz pie strāvas avota – 25V (MP 3AP, Cleaver, UK).

2.4.4. Inkubācija ar antivielām

Lai novērstu nespecifisku antivielu piesaistīšanos, membrānu bloķē 30 minūtes ar 5% sauso pienu. Tad pievieno primārās antivielas (Anti-Hsp70 antibody (3A3), abcam) attiecībā 1: 1000 un novieto ledusskapī uz nakti. Nākamajā dienā membrānu skalo ar PBS buferi un 0,05% Tween 20 3 reizes, katra skalošana vismaz 5 minūtes. Tad pievieno sauso pienu ar sekundārajām antivielām (Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP), abcam) attiecībā 1: 10000 un inkubē membrānu 1 stundu uz kratītāja istabas temperatūrā. Pēc inkubācijas membrānu atkal skalo 3 reizes.

2.4.5. Nitrocelulozes membrānas krāsošana

Nitrocelulozes membrānai pievieno 5 ml DAB substrāta (Roche), ko veido 500 µl DAB/metāla koncentrāts un 4,5 ml peroksīda buferis. Membrānas inkubācijas laiks 5 – 15 minūtes. Iegūto attēlu detektē ar foto kameru (Nikon, Thailand).

2.5. Biotehnoloģijai svarīgo mikroorganismu celmu metabolisma aktivācija

2.5.1. Izmantotie mikroorganismi un kultivēšanas apstākļi

Eksperimentos izmanto baktēriju kultūru *Pseudomonas aurantiaca* S-1, kas saņemta no Baltkrievijas NZA Mikrobioloģijas institūta kolekcijas starptautiskā projekta ietvaros. To raksturo augsta antimikrobiāla aktivitāte attiecībā pret augu plaša spektra slimību ierosinātājiem.

Sējmateriālu gatavo baktēriju kultūru ar cilpas palīdzību ienesot šķidrā barotnē un pēc tam kultivējot 24 stundas pie temperatūras 30 °C uz kratītāja (180 apgr/min). Eksperimentos izmantotās šķidrās Meinella barotnes sastāvs (g/l) ir sekojošs: K₂HPO₄ – 5,34; KH₂PO₄ – 3, MgSO₄ x 7 H₂O – 0,1; NH₄NO₃ – 1; C₆H₅O₇Na₃ x 2 H₂O – 0,47; melase – 30. Barotnes pH=7.

Ps. aurantiaca kultūru kultivē 20 ml Meinella barotnēs 72 stundas uz kratītāja pie temperatūras 30 °C un 180 apgr/min.

Antifungālās aktivitātes noteikšanas eksperimentos izmanto augļu un dārzeņu kultūru patogēnu - sēni *Fusarium oxysporum* Nr. 259, kas ir iegūta no Latvijas Universitātes Latvijas

Mikroorganismu Kultūru kolekcijas. To kultivē 50 ml PB barotnē 96 stundas pie temperatūras 25 °C.

2.5.2. Aktivācija izmantojot sāli

Pēc baktēriju *Ps. aurantiaca* kultivēšanas 72 stundas, barotni nocentrifugē un 100 µl biomasas ienes 20 ml 1M, 2M, 3M un 4M NaCl šķīduma un liek uz kratītāja 3 stundas 30 °C temperatūrā un 180 apgr/min. Kontroles paraugu inkubē ūdenī. Pēc apstrādes 100 µl šķīduma paņem un pārnes uz jaunu Meinella barotni un kultivē līdz 96 stundām uz kratītāja 30 °C temperatūrā un 180 apgr/min.

2.5.3. Baktēriju dehidratācija

Baktēriju *Ps. aurantiaca* kultūru dehidratē 20 stundas termostatā 30 °C temperatūrā. Pēc žāvēšanas inkubē 20 ml destilēta ūdens 1 stundu uz kratītāja (180 apgr/min) 30 °C temperatūrā. Pēc tam 100 µl šķīduma tiek paņemti un pārnesti uz jaunu Meinella barotni. Baktērijas kultivē līdz 96 stundām uz kratītāja 30 °C temperatūrā un 180 apgr/min.

2.5.4. Antifungālo metabolītu sintēzes novērtēšana

Lai novērtētu antifungālo aktivitāti bezšūnu supernatantā, izmanto divas metodes. Pirmā ir spektrofotometrijas metode, kurā absorbcijas spektru mēra diapazonā no 300 nm līdz 700 nm. Absorbcijas līknes maksimums 400 nm apgalā tiek izmantots, lai novērtētu antifungālo aktivitāti. Kā referenci izmanto tīru barotni.

Lai novērtētu rezultātu ticamību, izmanto agara difūzijas metodes – bedrīšu un disku metodi. Kā testkultūru lieto *Fusarium oxysporum* Nr. 259. Bedrīšu metodē izmanto divas barotnes – 2% un 1,2% PBA (Sigma-Aldrich). Petrī platītēs kā pamatkārtu salej 10 ml 2% PBA un ļauj sacietēt, tad pievieno kārtu ar 5 ml 1,2% PBA, kas samaisīta kopā ar *Fusarium oxysporum* kultūru attiecībā kultūra : agars 0,5 : 4,5 ml. Kad virskārta ir sacietējusi, izveido bedrītes, kurās tiek iepilināts 65 µl supernatanta. Petrī platītes ar sēņu kultūru liek termostatā 25 °C temperatūrā uz 48 stundām.

Disku metodē 2% PBA tiek samaisīts kopā ar *Fusarium oxysporum* un ieliets Petrī platītēs. Kad virskārta ir sacietējusi, uz virsmas novieto diskus (Carl Roth), kurus pakāpeniski piesūcina ar 15 µl supernatanta, to uzpilot pa 5µ 3 reizes. Petrī platītes ar sēņu kultūru liek termostatā 25 °C temperatūrā uz 48 stundām.

2.6. Atjaunojamo substrātu hidrolīze bioetanola iegūšanai

2.6.1. Substrātu priekšapstrāde

Eksperimentos izmanto bērza koksnes (AS Latvijas Finieris, Latvija) un kviešu un rapšu salmu (SIA Pampāļi, Latvija) materiālu, kam veikta priekšapstrāde Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūta (LV KĶI) Polisaharīdu laboratorijā. Priekšapstrādei izmanto oriģinālu pilotiekārtu, kas dod iespēju modelēt rūpnieciski tehnoloģisku procesu. Sekojoši iegūtie optimālie darba parametri var tālāk tikt izmantoti arī rūpnieciskos apstākļos. Materiālu mehāniski sasmalcina līdz izmēram 1- 3 mm un samaisa ar noteiktas koncentrācijas katalizatora šķīdumu un tas tiek pievadīts periodiskas darbības lāpstveida maisītājā. Procesā ar bērza koksni un kviešu salmiem izmanto sērskābi, rapšu salmu gadījumā – alumīnija sulfātu. Katalizatora šķīduma koncentrācija priekšapstrādes procesā mainīta no 16 līdz 50%. Pilotiekārtas galvenais reaktors ir vertikāls cilindrs: diametrs – 110 mm, augstums – 1450 mm, kopējais apjoms – 13,7 litri, tvaika spiediens – 0 līdz 1,2 MPa. Materiālu, kas samaisīts ar katalizatora šķīdumu, ielādē reaktorā, kas jau ir uzsildīts līdz noteiktai temperatūrai un reaktora automātiskā sistēma notur temperatūru konstantu visa procesa laikā. Materiālu apstrādā ar nepārtrauktu tvaika plūsmu no 40 - 90 minūtes, pie temperatūras 147 °C bērza koksnei un kviešu salmiem un 170 °C rapšu salmiem. Bērzu koksnes materiāla paraugiem Nr.1, Nr.2 un Nr.3 izmantota atšķirīga sērskābes koncentrācija un procesa ilgums - Nr.1 (katalizatora koncentrācija 20%, procesa ilgums 60 minūtes), Nr.2 (katalizatora koncentrācija 50%, procesa ilgums 90 minūtes), Nr.3 (katalizatora koncentrācija 50%, procesa ilgums 60 minūtes). Kviešu salmu materiāla priekšapstrādes parametri - katalizatora koncentrācija 50%, procesa ilgums 60 minūtes. Rapšu salmu materiāla priekšapstrādes parametri – katalizatora koncentrācija 16%, procesa ilgums 40 minūtes. Pēc priekšapstrādes paraugi vienu reizi atmazgāti.

2.6.2. Enzimātiskā hidrolīze

Paraugus hidrolizē izmantojot komerciālo enzīmu kompleksu Accellerase 1500 (DuPont Genencor Science). Ražotāju rekomendētais enzīmu daudzums uz gramu substrāta sastāda 0,05 līdz 0,25 ml. Mūsu eksperimentos izvēlētais enzīmu daudzums 0,125 ml – 0,5 ml uz 1,2 g substrāta. Kā papildus enzīmu izmanto 0,1 ml vai 0,25 ml Accellerase XC (DuPont Genencor Science). Hidrolīzei izmantots 0,05 M citrāta buferis pH 5 un parauga tilpums 10

ml. Paraugus novieto uz kratītāja (80 apgr/min), izmantojot izvēlētas temperatūras: 45 °C, 50 °C un 55 °C. Hidrolīzes laiks 24, 48 un 72 stundas.

2.6.3. Autoklāvēšana un kavitācijas apstrāde

Pirms enzimātiskās hidrolīzes etapa, priekšapstrādātos bērza koksnes paraugus pakļauj papildus apstrādei, izmantojot sārnu iedarbību un/vai autoklāvēšanu. Izmantotais sārnu KOH daudzums – 10 g/l un 12 g/l. Autoklāvēšanu veic izmantojot autoklāvu TK-100-3 (ТЗМОИ, Россия) 20 minūtes 121 °C temperatūrā. Papildus iedarbībai uz lignocelulozes materiālu izmantota arī kavitācijas apstrāde, ko veic RTU Mehānikas institūtā. Kavitācijas procesi šķīdumā veidojas pirmkārt izstiepjošo spēku iedarbības rezultātā, kad atsevišķos šķīduma apgabalos īslaicīgi samazinās spiediens un otrkārt – intensīvu ultraskaņu viļņu iedarbības rezultātā. Kavitācijas iedarbība balstās uz kavitācijas burbulīšu rašanos un saspiešanos. Kavitācijas burbulīša veidošanās sākumā tā iekšpusē spiediens ir daudz mazāks nekā šķīdumā, tāpēc tas virzās uz burbulīša centru. Notiek enerģijas sakoncentrēšanās noteiktā punktā. Samazinoties burbulīša rādiusam, pieaug spiediens tajā. Šķīdums tiecoties uz burbulīša centru veido burbulīša centrālajā apgabalā spiediena maksimumu un tā rezultātā burbulīša sienīņas saspiežas. Ir noteikts, ja saspiešanās apgabala rādiuss samazinās līdz nullei, tad spiediens tā centrā aug neierobežoti un var sasniegt ievērojamus lielumus – iespējams $4 \cdot 10^8$ līdz $10 \cdot 10^8$ Pa. Burbulīša saplacināšanās rada triecienviļņus, kumulatīvo strūklu ar ātrumu 100 – 50 m/s un spiedienu tajā no $2 \cdot 10^8$ līdz $8 \cdot 10^8$ Pa, kā arī veido intensīvus mikrovirpuļus (Цыфанский, 2008). Kavitācijas efektu radīšanai izmanto ultraskaņas iekārtu (УЗУ 025, Белоруссия), kuras tilpums 4 litri, starotāju jauda 250 W un darbības frekvence 18,7 kHz. Paraugu apstrādes ilgums 2 stundas.

2.6.4. Glikozes un etanola daudzuma noteikšana

Pēc hidrolīzes paraugus nocentrifugē (14000 apgr/min) un atdala supernatantu. Glikozes daudzumu hidrolizātā, kā arī etanola daudzumu fermentācijas vidē nosaka izmantojot HPLC Agilent 1100 (Agilent, Germany), Asahipak SH1011 kolonna priekškolonna SH-G, diferenciālais refraktometrijas detektors RID G1362.

2.6.5. Etanola iegūšana izmantojot hidrolizātu

Eksperimentos kā glikozes avotu izmanto bērza koksnes hidrolizātu (paraugs Nr.1), kviešu salmu un rapšu salmu hidrolizātu, kuru hidrolīzes laiks 72 stundas 50 °C temperatūrā. Hidrolizātam pievienoto vielu daudzums, kas nepieciešams raugiem rūgšanas laikā, ir sekojošs (g/l): raugu ekstrakts – 1; peptons – 5; (NH₄)₂SO₄ – 0,5; KH₂PO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,025. Eksperimentos izmanto dehidratētu raugu *Saccharomyces cerevisiae* 14 un *Saccharomyces cerevisiae* 77. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētais raugs pirms dehidratācijas pakļauts inkubācijai 1M ksilīta vai 1M glicerīna šķīdumā. Kontroles paraugi kultivēti aerobi un pirms dehidratācijas inkubēti ūdenī. Inkubācijas laiks 3 stundas 30 °C temperatūrā. Pēc dehidratācijas 50 mg parauga pievieno 7 ml fermentācijas vides un novieto termostatā 30 °C temperatūrā uz 24 stundām.

2.7. Datu statistiskā analīze

Eksperimentus veic vismaz trīs neatkarīgos atkārtojumos. Rezultāti atainoti kā vidējā vērtība ar standartnovirzi. Atomspēku mikroskopijas pētījumos šūnu diametra un stingrības noteikšanai, vienā paraugā mērītas vismaz 20 šūnas. Salīdzinājumam starp grupām lietots Stjudenta t-tests ar ticamības līmeni $p < 0,05$.

3. Rezultāti un diskusija

3.1. Limitēta skābekļa apstākļos augušu dzīvotspējīgu sausu raugu iegūšana

3.1.1. Raugu žāvēšana

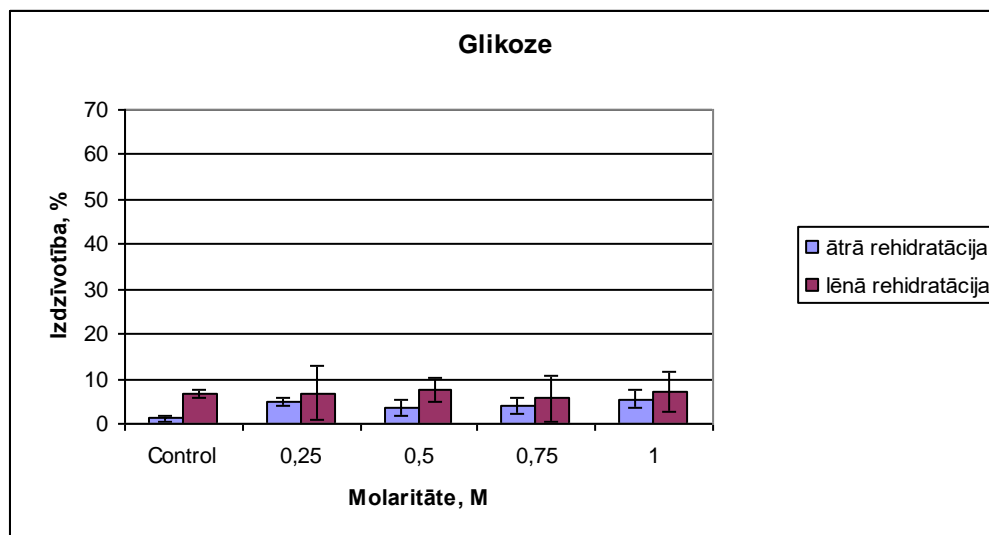
Raugi *Saccharomyces cerevisiae*, kas audzēti limitēta skābekļa apstākļos un ņemti no stacionārās augšanas fāzes ir izteikti jūtīgi pret dehidratācijas-rehidratācijas stresu, atšķirībā no tiem pašiem raugiem, kas audzēti aerobos apstākļos. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu izdzīvotība nekad nepārsniedz 2% un to nav iespējams ievērojami palielināt pat izmantojot lēno rehidratāciju ūdens tvaikos, kas parasti ievērojami samazina intracelulāro membrānu bojājumus, tādējādi paaugstinot izdzīvotību. Pastāv pētījumi par iespēju paaugstināt aerobi kultivētu raugu izdzīvotību pēc dehidratācijas-rehidratācijas, tos pakļaujot noteiktai priekšapstrādei pirms dehidratācijas, taču šādu pētījumu nav par raugiem, kas kultivēti limitēta skābekļa apstākļos. Tādējādi mūsu darbā tiek pētīta iespēja paaugstināt limitēta skābekļa apstākļos kultivētu šūnu izdzīvotību, tās pakļaujot priekšapstrādei ar paaugstinātas osmolaritātes cukuru, poliolu un sāls šķīdumiem, kā arī ir apskatīta trehalozes, prolīna un glutaciona izmantošana milimolāros daudzumos, kā arī glutaciona pievienošana barotnei kultivēšanas laikā.

3.1.1.1. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot osmolītus

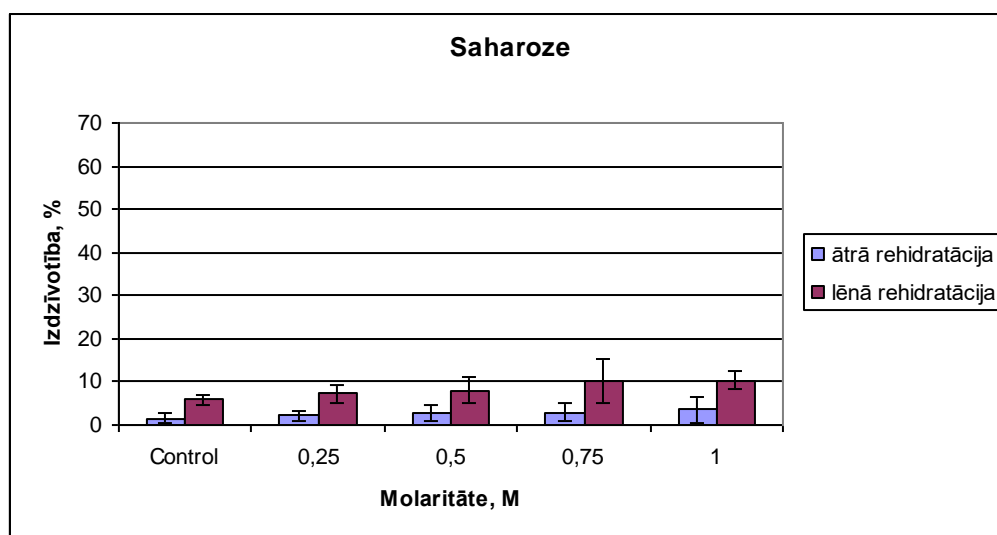
Iespēja paaugstināt šūnu izdzīvotību pēc žāvēšanas tika pētīta izmantojot laboratorijas raugu celmu *Saccharomyces cerevisiae* 14. Veikti pētījumi par paaugstināta osmotiskā spiediena izmantošanu kā priekšapstrādi pirms šūnu dehidratācijas ar mērķi paaugstināt to izdzīvotību dehidratācijas-rehidratācijas laikā. Paaugstināta osmotiskā spiediena radīšanai izmantoti sekojoši savienojumi : cukuri – glikoze, saharoze, laktoze un polioli – sorbīts, mannīts, ksilīts un glicerīns - kas zināmi kā šūnu aizsargsavienojumi dažādu stresu ietekmē. Eksperimentos izmantotas sekojošas cukuru un poliolu šķīdumu molaritātes – 0,25M; 0,5M; 0,75M un 1M un inkubācijas laiks - 3 stundas. Pēc inkubācijas šūnas dehidratētas līdz 8-10% mitrumam un sekojoši veikta to ātrā un lēnā rehidratācija un noteikta izdzīvotība.

Cukuru – glikozes, saharozes un laktozes – izmantošanas rezultātā iegūtās izdzīvotības rādītāji pēc ātrās un lēnās rehidratācijas parādīti 14.att., 15.att. un 16. attēlā. Kā redzams pēc iegūtajiem rezultātiem neviens no minētajiem savienojumiem nav uzrādījis pozitīvu rezultātu

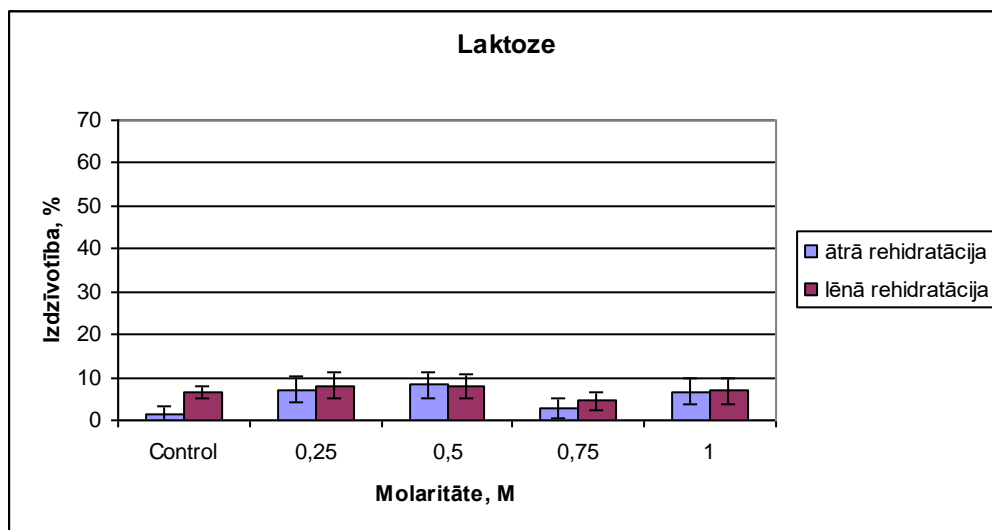
attiecībā pret šūnu izdzīvotību nedz ātrās, nedz lēnās rehidratācijas laikā. Lai gan eksperimentos ar aerobi kultivētām šūnām saharozes un laktozes šķīdumu ar paaugstinātu osmotisko spiedienu izmantošana deva pozitīvu rezultātu (Rapoport, Beker, 1993; Rapoport *et al.*, 2009) maksimālā izdzīvotība, kas sasniegta izmantojot limitēta skābekļa apstākļos augušas raugu šūnas nepārsniedz 10 % robežu.



14.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos glikozes šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



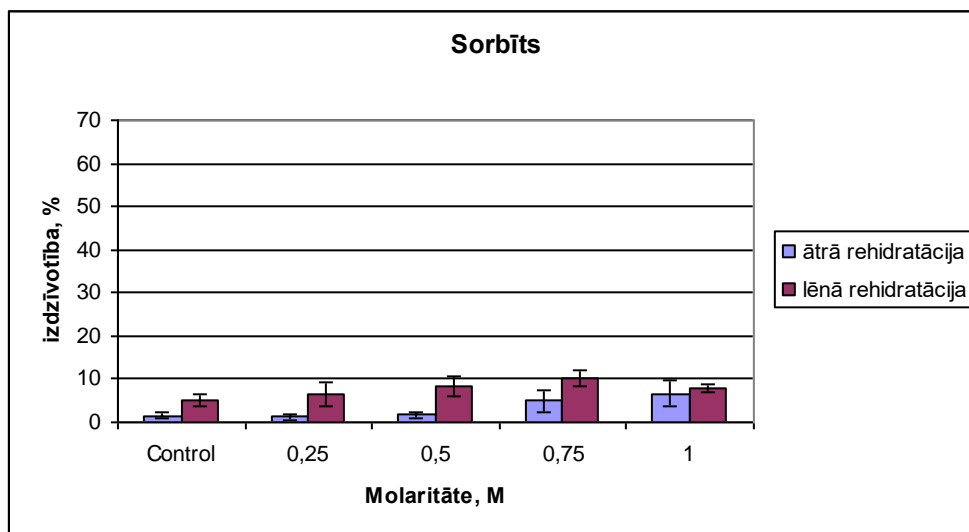
15.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos saharozes šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



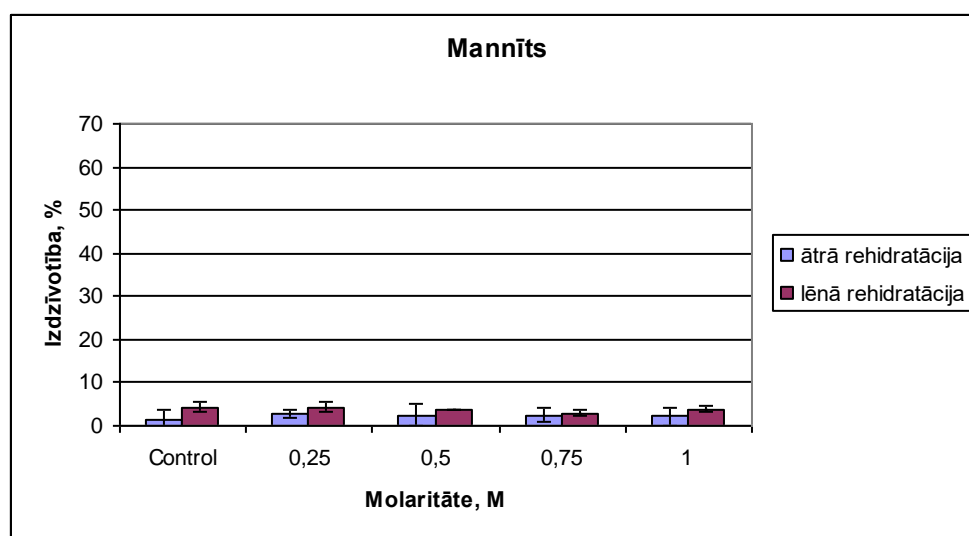
16.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos laktozes šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

Poliolu – sorbīta, mannīta, ksilīta un glicerīna – izmantošanas rezultātā iegūtie izdzīvotības rādītāji pēc ātrās un lēnās rehidratācijas parādīti 17.att., 18.att., 19.att. un 20.attēlā.

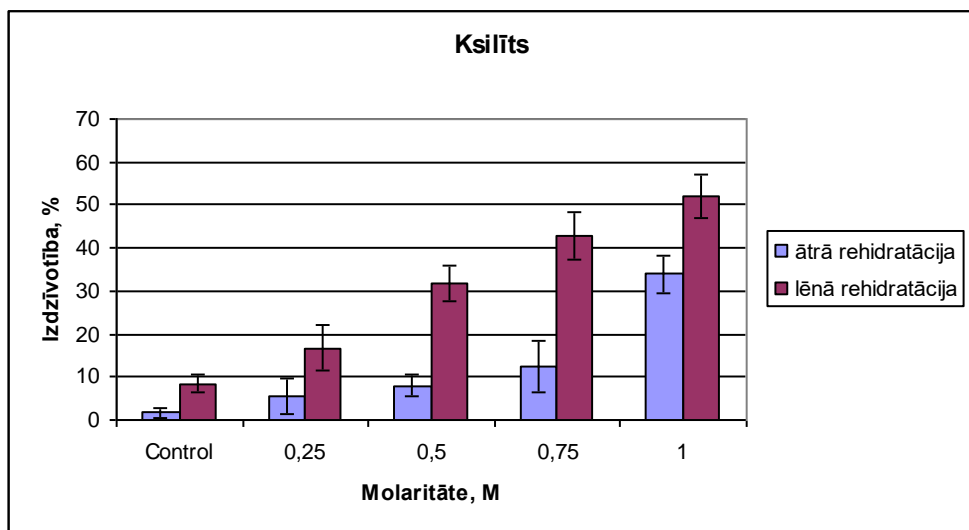
Pēc iegūtajiem rezultātiem redzams, ka labākos rezultātus raugiem, kas auguši limitēta skābekļa apstākļos var sasniegt, kad 1M ksilīts vai 1M glicerīns tiek pievienoti inkubācijas šķīdumam. Inkubējot raugus minētajos poliolos ir novērojams acīmredzams koncentrācijas atkarīgs izdzīvotības pieaugums (19.att. un 20.att.). Vēl jo vairāk, rehidratācijas veidam ir ļoti liela ietekme uz izdzīvotību, jo visaugstākā izdzīvotība novērojama tieši pēc šūnu lēnās rehidratācijas. Būtisks pieaugums pēc ātrās rehidratācijas novērojams tikai šūnām, kas inkubētas ksilītā. Šūnas, kas tika inkubētas 1M ksilīta šķīdumā uzrādīja izdzīvotību 34% pēc ātrās rehidratācijas un 52% pēc lēnās rehidratācijas. Šūnas pēc inkubācijas 1M glicerīna šķīdumā uzrādīja izdzīvotību vidēji 60% pēc lēnās rehidratācijas. Tādējādi veiktie eksperimenti parādīja iespēju, ka arī raugi *S. cerevisiae*, kas kultivēti limitēta skābekļa apstākļos spēj pāriet anabiozes stāvoklī, bet tikai tad ja tie pirms tam speciāli apstrādāti.



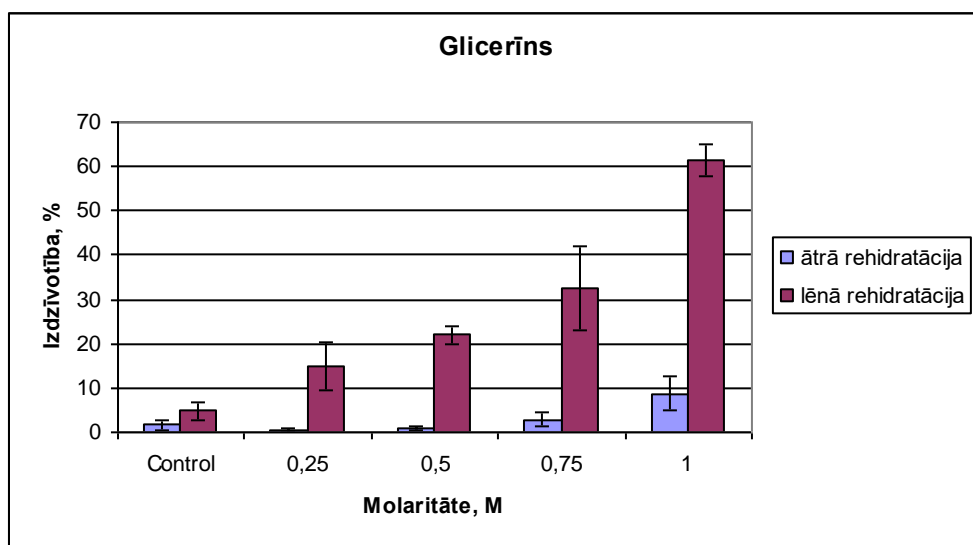
17.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos sorbīta šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



18.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos mannīta šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



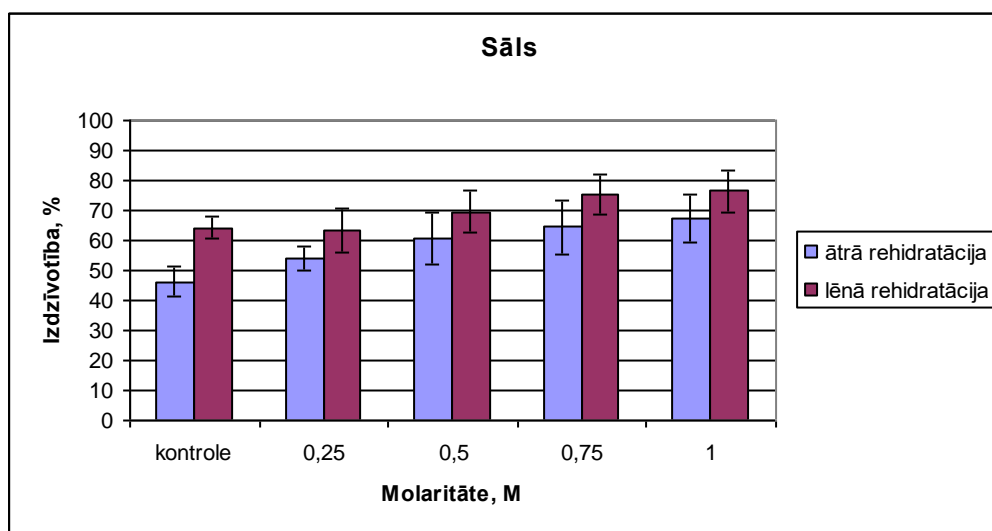
19.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos ksilīta šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



20.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos glicerīna šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

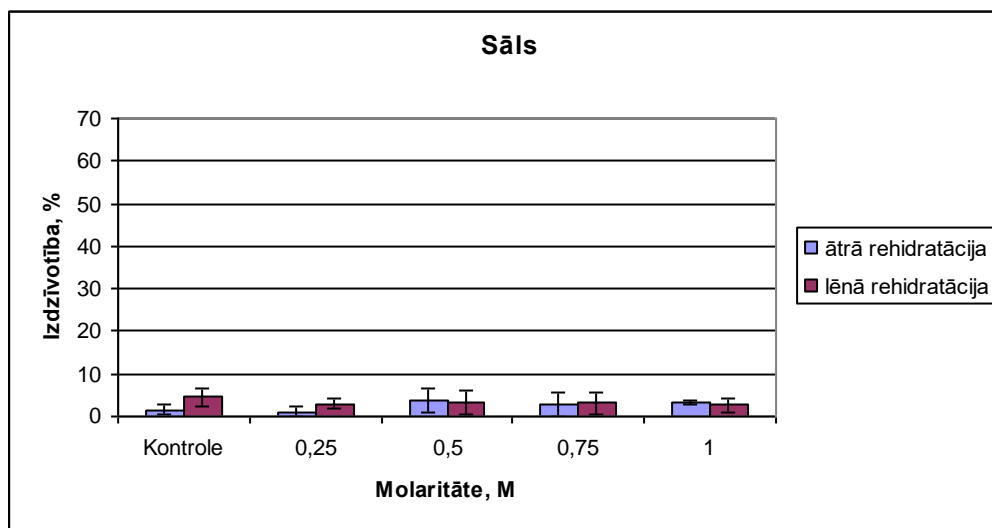
3.1.1.2. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot sāli

Tā kā eksperimentos ar ksilītu un glicerīnu tika parādīts šo vielu ar paaugstināto osmotisko spiedienu efekts, tika nolemts pamēģināt inkubācijai izmantot sāls šķīdumu ar paaugstinātu osmotisko spiedienu. Sāls tika izmantots kā lēts un plaši pieejams ķīmiskais savienojums, ko būtu ekonomiski izdevīgi izmantot šūnu priekšapstrādei. Tā kā iepriekš šādu eksperimentu nebija arī ar aerobi kultivētiem raugiem, veicām pētījumu izmantojot gan aerobus raugus, gan raugus izaudzētus limitēta skābekļa apstākļos. Sāls uzrādīja pozitīvu rezultātu pētījumos, kas tika veikti izmantojot aerobos apstākļos kultivētas rauga šūnas (21. att.). Sāls izmantošana palīdzēja paaugstināt aerobos apstākļos augušu šūnu izdzīvotību, sasniedzot 63% pēc ātrās un 72% pēc lēnās rehidratācijas.



21.attēls. Aerobos apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos sāls šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu šūnu izdzīvotības pēc inkubācijas sāls šķīdumos un sekojošas dehidratācijas-rehidratācijas parādītas 22. attēlā. Kā redzams no iegūtajiem datiem, priekšapstrāde ar sāli nav devusi pozitīvu rezultātu nevienā no izmantotajām šķīduma molaritātēm. Tas nozīmē, ka osmotiskā spiediena apstrāde, kas ir efektīva aerobo raugu gadījumā, limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu gadījumā tādu pozitīvu efektu nedod.



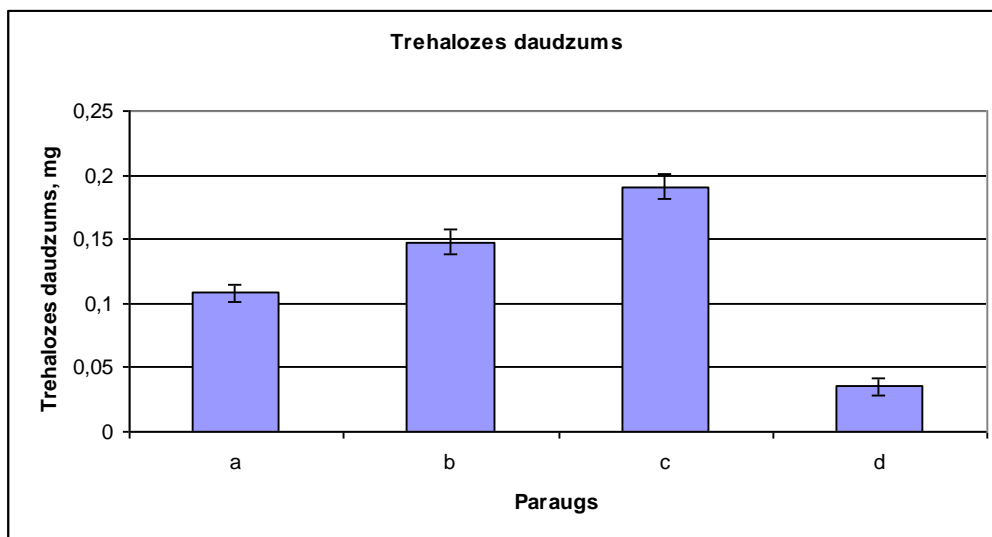
22.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos sāls šķīdumos (0.25, 0.5, 0.75 un 1M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

3.1.1.3. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot trehalozi

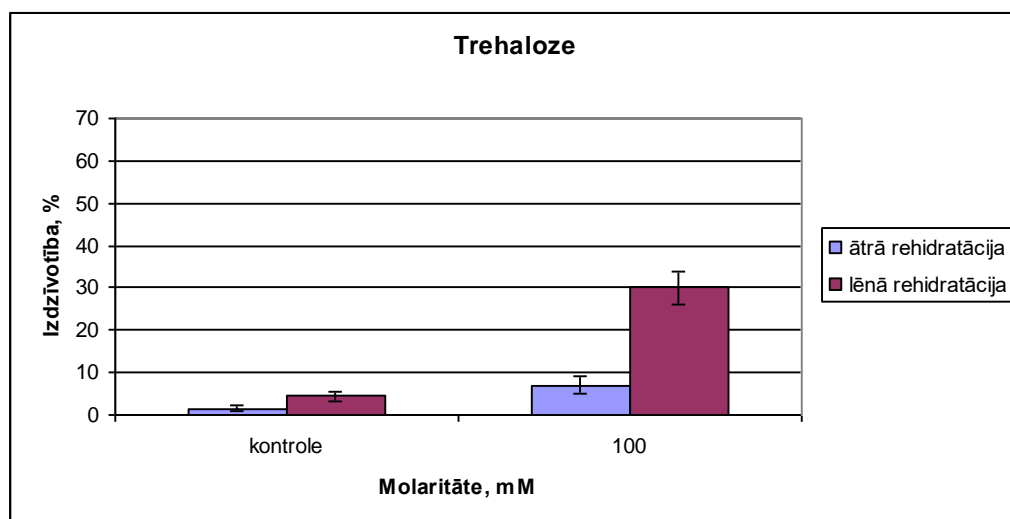
Trehaloze ir galvenais rezerves ogļhidrāts raugu šūnās, kā arī kalpo kā aizsargsavienojums stresa apstākļos. Lai novērtētu trehalozes ietekmi uz šūnu izdzīvotību, tās tika inkubētas 100 mM šī cukura šķīdumā ar inkubācijas laiku 3 stundas. Pēc inkubācijas šūnas dehidratētas līdz 8-10% mitrumam un sekojoši veikta to ātrā un lēnā rehidratācija un noteikta izdzīvotība. Iegūtie rezultāti parādīti 24. attēlā. Papildus tam veikts eksperiments izmantojot augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (HPLC) ar mērķi noteikt trehalozes daudzumu rauga šūnās pirms un pēc dehidratācijas, salīdzinot aerobos un anaerobos apstākļos kultivētas šūnas. Iegūtie rezultāti parādīti 23. attēlā.

Kā redzams pēc HPLC datiem, šūnās, kas kultivētas aerobos apstākļos, pēc to dehidratācijas novērojams iekššūnu trehalozes daudzuma palielinājums par 37 % salīdzinot ar natīvu biomasu. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētās natīvās šūnās novērojams par 76 % lielāks trehalozes saturs nekā aerobos apstākļos kultivētās šūnās, taču pēc dehidratācijas trehalozes daudzums ievērojami krītas par 5,4 reizēm, salīdzinot ar minētajos apstākļos kultivētu natīvu biomasu.

Pēc iegūtajiem izdzīvotības rezultātiem (24. att.) redzams, ka izmantojot inkubāciju trehalozē, žāvēto raugu šūnu izdzīvotības paaugstināšanās pēc ātrās rehidratācijas nepārsniedza 7%, tajā pat laikā, kad tika izmantota lēnā rehidratācija, šūnu izdzīvotība sasniedza 30%.



23.attēls. Trehalozes daudzums *Saccharomyces cerevisiae* 14 šūnās uz mg parauga sausā svara. Paraugi: aerobi kultivēta biomasa pirms (a) un pēc žāvēšanas (b); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa pirms (c) un pēc žāvēšanas (d)

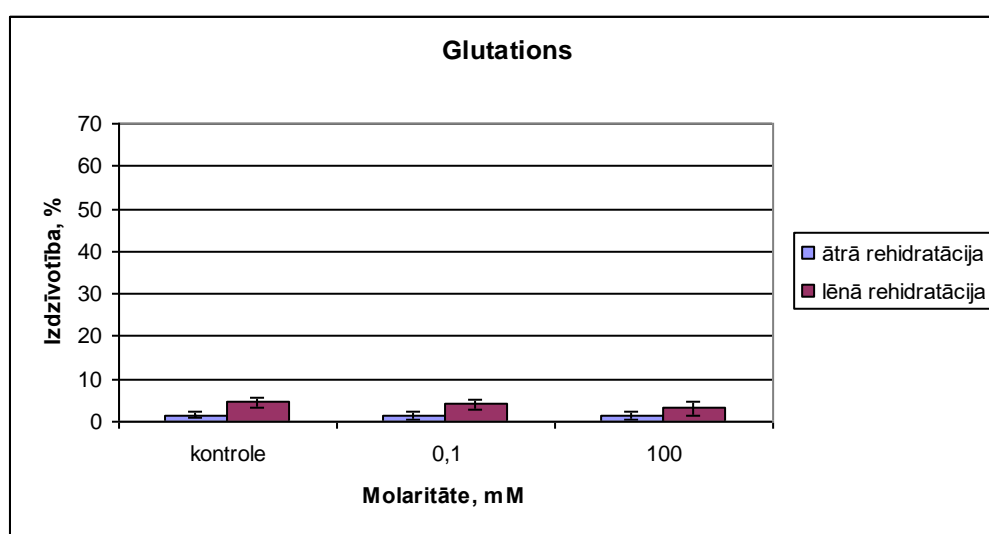


24.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas 100 mM trehalozes šķīdumā pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

3.1.1.4. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu rezistences palielināšana izmantojot antioksidantus

Nākošā eksperimentu sērija tika veikta izmantojot antioksidantus – glutationu un prolīnu. Ir zināms, ka starp faktoriem, kas ietekmē šūnu izturību pret dehidratāciju ir oksidatīvais stress. Ir parādīts, ka glutations spēlē milzīgu lomu intracelulārā redoks balances

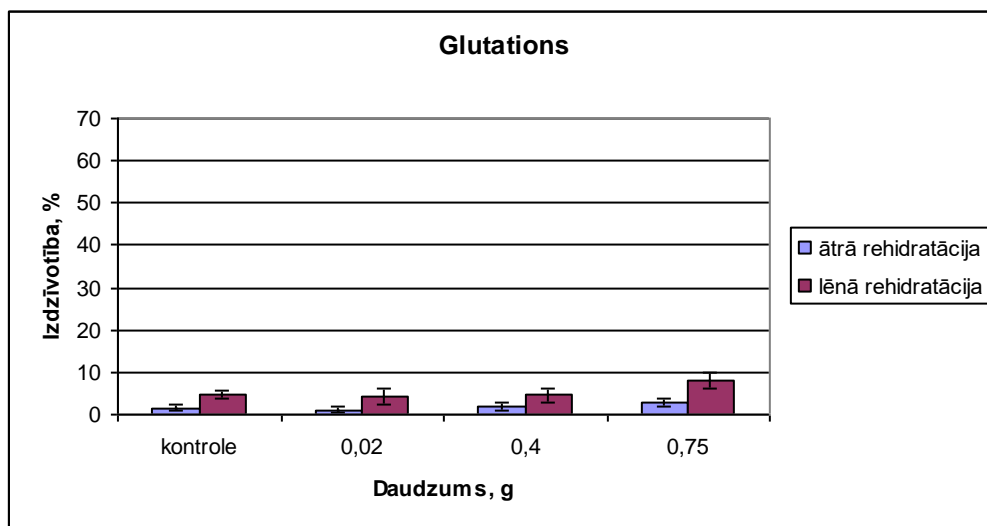
uzturēšanā dehidratācijas laikā aerobi kultivētās rauga šūnās (Espindola *et al.*, 2003). Līdzīga informācija ir saņemta arī par prolīna ietekmi (Takagi, 2008). Tādējādi tika veikti pētījumi par antioksidantu – glutaciona un prolīna - izmantošanu kā priekšapstrādi pirms šūnu dehidratācijas ar mērķi paaugstināt to izdzīvotību dehidratācijas-rehidratācijas laikā. Eksperimentos ar inkubāciju glutaciona šķīdumos izmantota molaritāte 100mkM un 100 mM un inkubācijas laiks 3 stundas (25. att.). Kā arī veikti eksperimenti ar glutaciona pievienošanu barotnei uzsākot kultivēšanu – 0,02 g, 0,4 g, 0,75 g uz 400 ml barotnes (26.att.). Eksperimentos ar inkubāciju prolīna šķīdumos izmantota molaritāte 100 mM un 300 mM (27.att.). Eksperimentos izmantotais inkubācijas laiks 3 stundas.



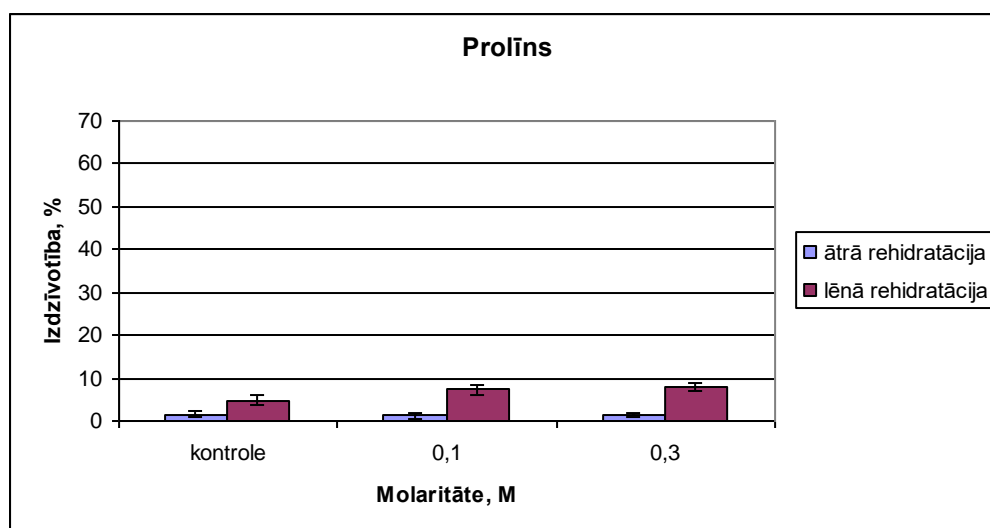
25.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos glutaciona šķīdumos (0.1 mM un 100 mM) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

Kā redzams no eksperimentiem ar glutacionu, kas tika pievienots barotnei pirms raugu kultivēšanas uzsākšanas vai izmantots inkubācijas šķīdumā, tie neuzrādīja nekādu pozitīvu efektu šūnu rezistencei pret dehidratāciju. Ņemot vērā pieņemto antioksidatīvo glutaciona lomu raugu šūnās, var tikt uzskatīts, ka neatgriezeniski šūnu bojājumi dehidratācijas laikā limitēta skābekļa augušās rauga šūnās nav saistīti ar oksidatīvo stresu vai vismaz oksidatīvais stress mūsu gadījumā nav galvenais faktors, kas atbildīgs par neatgriezenisku šūnu bojājumu.

Prolīns ir aminoskābe, kurai piemīt stresa aizsardzības aktivitāte un tā piedalās tādos aizsargmehānismos, kā proteīnu un membrānu stabilizācija, DNS fāzu pārejas temperatūras Tm pazemināšana, kā arī aizsardzība pret ROS (Takagi, 2008). Veiktie eksperimenti ar raugu šūnu inkubāciju prolīna šķīdumos neuzrādīja ievērojamu izdzīvotības pieaugumu un pēc lēnās rehidratācijas nepārsniedza 8 %.



26.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc glutaciona pievienošanas barotnei (0.02g, 0.4g, 0.75g), žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



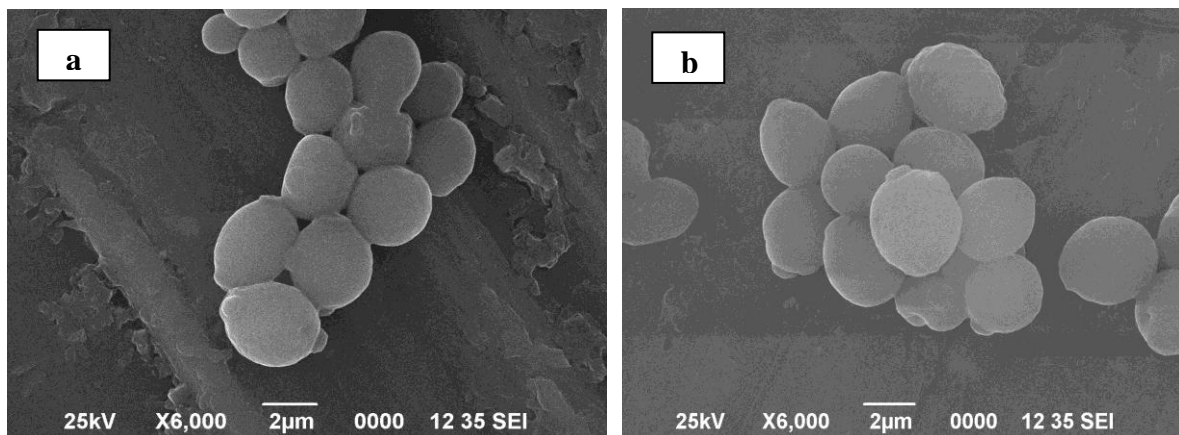
27.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu izdzīvotība pēc inkubācijas dažādos prolīna šķīdumos (0.1 M un 0.3 M) pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

3.1.2. Mikroskopijas pētījumi

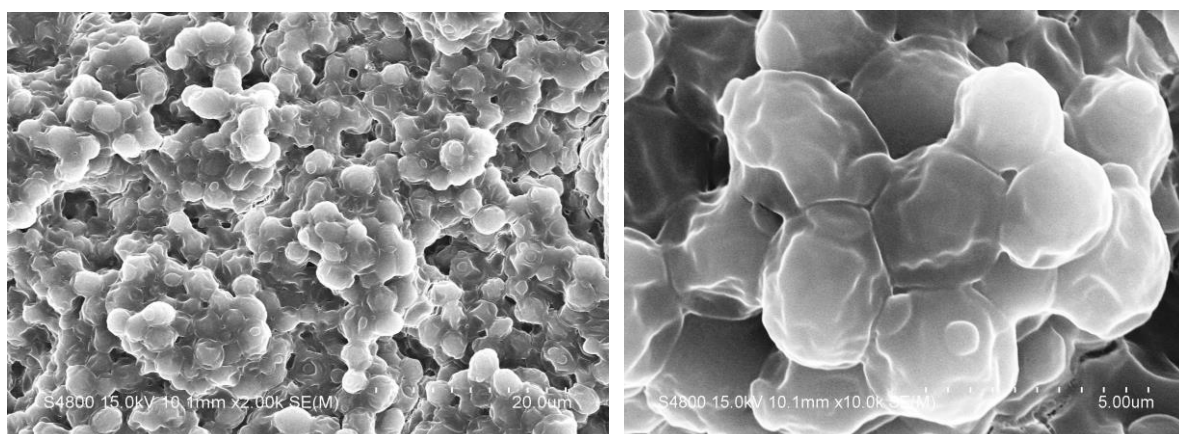
3.1.2.1. Skenējošās elektronu mikroskopijas pētījumi

Lai novērtētu raugu šūnu virsmas izmaiņas, tika izmantota skenējošā elektronu mikroskopija. Limitēta skābekļa apstākļos augušas šūnas tika salīdzinātas ar aerobi kultivētām

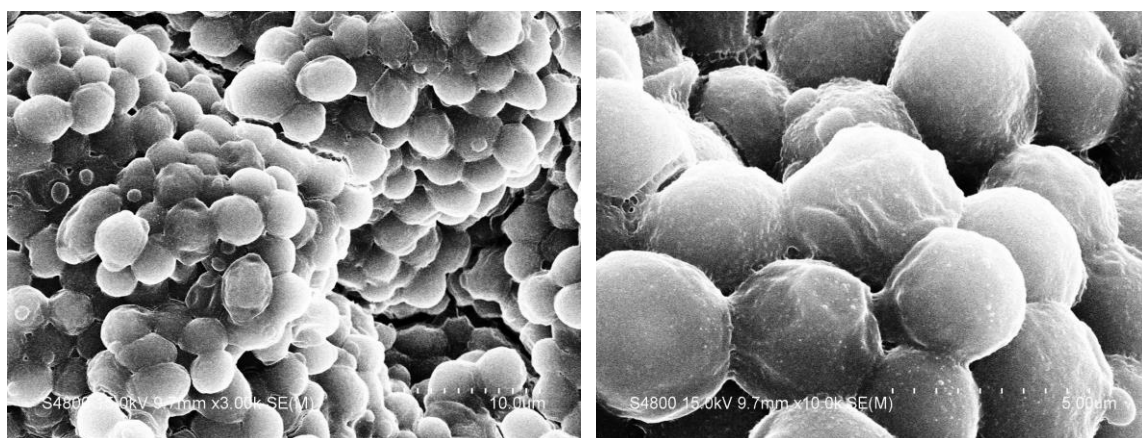
šūnām un pēc labākā izdzīvotības rezultāta, kas iegūts inkubējot šūnas 1 M ksilīta un glicerīna šķīdumā. 28. attēlā (a,b) parādītas natīvas aerobos un limitēta skābekļa apstākļos audzētās šūnas stacionārā fāzē. Abos gadījumos novērojama gluda šūnu virsma un redzams, ka šūnas veido nelielus sakopojumus.



28.attēls. Natīvas raugu šūnas. a - aerobos apstākļos kultivētas raugu šūnas, b – limitēta skābekļa apstākļos kultivētas šūnas



29.attēls. Aerobi kultivētas rauga šūnas pēc žāvēšanas

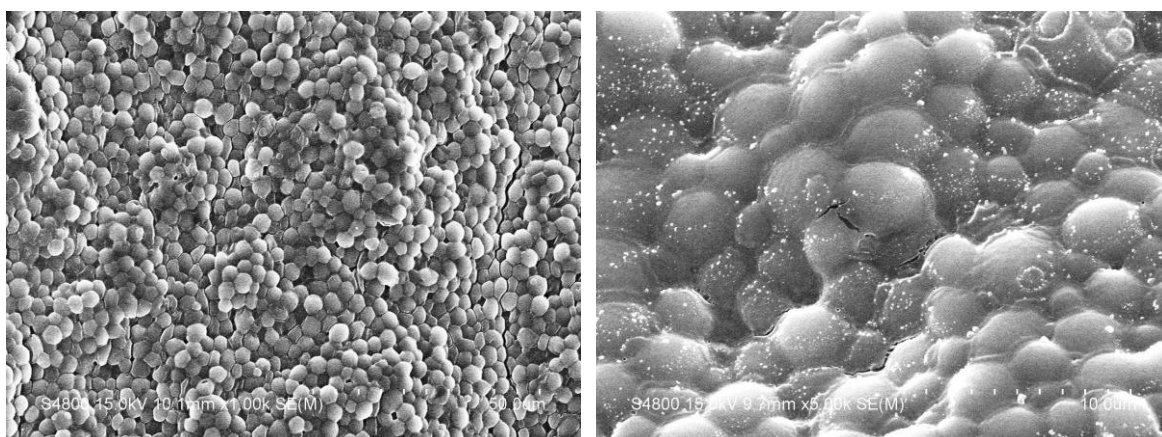


30.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētas rauga šūnas pēc žāvēšanas

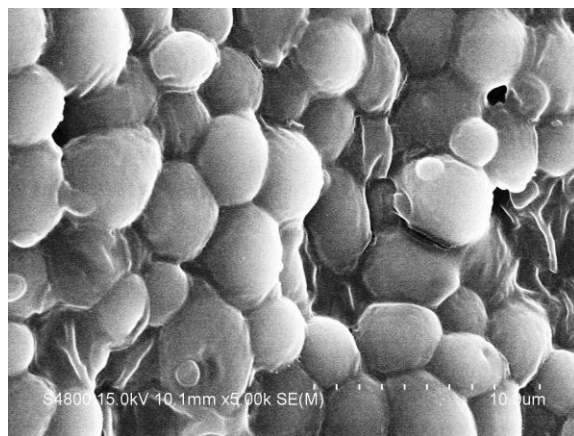
29. attēlā un 30. attēlā parādītas aerobos un limitēta skābekļa apstākļos audzētas šūnas pēc to dehidratācijas. Pamatojoties uz agrāk iegūtajiem elektronmikroskopijas datiem par žāvētām rauga šūnām zināms, ka pēc žāvēšanas šūnas veido konglomerātus un sakrokojas samazinoties šūnas tilpumam (Ventina *et al.*, 1984). Dažos attēlos parādās kristāli uz virsmas. Minētos novērojumus var redzēt arī mūsu gadījumā, tomēr salīdzinot aerobi kultivētas rauga šūnas un limitēta skābekļa apstākļos augušas šūnas pēc žāvēšanas var redzēt, ka otrās pēc žāvēšanas ir gludākas, kas varētu liecināt par mehāniski izturīgāku šūnas sienu.

Rezultāti par šūnu virsmas izmaiņām pēc šūnu apstrādes ar 1M ksilītu parādīti 31.attēlā un 32.attēlā. Pēc aerobos apstākļos augušu raugu šūnu inkubācijas ksilītā un sekojošas žāvēšanas, novērojams, ka šūnas veido lielus konglomerātus, tomēr šūnu virsma ir daudz gludāka nekā pēc žāvēšanas bez apstrādes un līdzinās nežāvētu šūnu virsmai. Uz virsmas novērojama kristālu veidošanās. Gadījumā ar limitētos apstākļos augušu šūnu inkubāciju ksilītā šķīdumā un tai sekojošu dehidratāciju, redzams, ka arī šo šūnu virsma ir gludāka salīdzinot ar neapstrādātu izžāvētu paraugu, tomēr atšķirībā no aerobos apstākļos kultivētām šūnām uz to virsmas kristālu veidošanās nav novērojama.

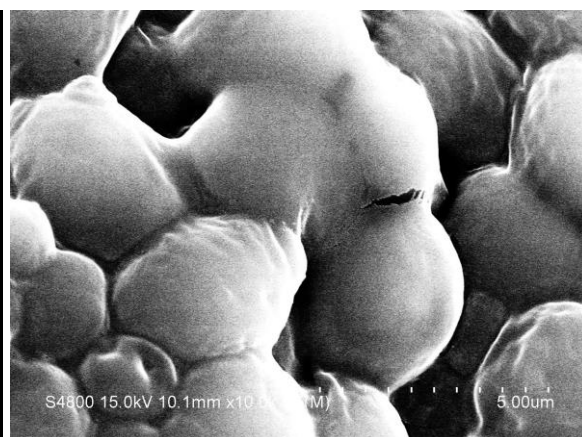
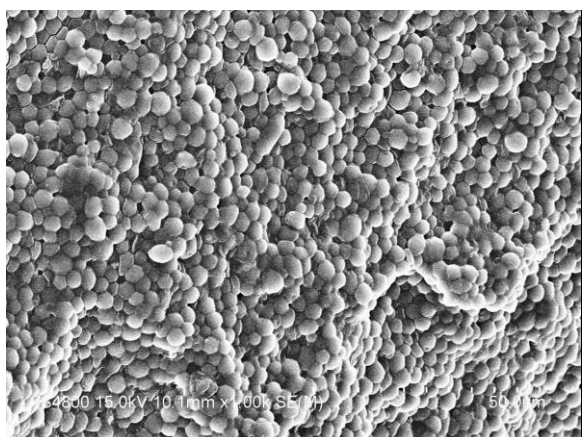
Rezultāti pēc šūnu apstrādes ar 1M glicerīnu parādīti 33.attēlā un 34.attēlā. Kā redzams pēc iegūtajiem attēliem, aerobi kultivētu šūnu inkubācija glicerīna šķīdumā arī nodrošina gludāku šūnu virsmu pēc dehidratācijas, tomēr atšķirībā no inkubācijas ksilītā šķīdumā, uz virsmas kristālu veidošanās nav novērojama. Arī gadījumā ar limitēta skābekļa apstākļos augušām rauga šūnām novērojama gludāka šūnu virsma bez kristālu veidošanās uz tās.



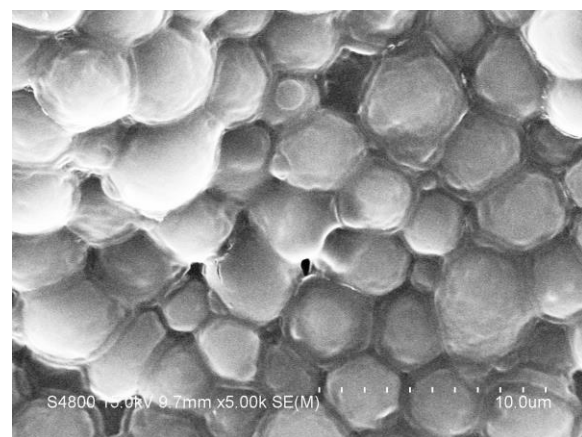
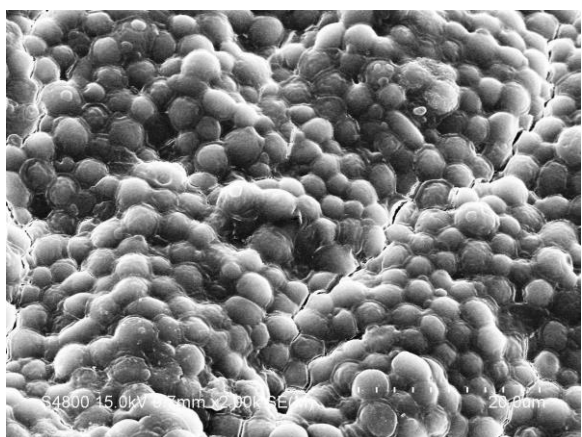
31.attēls. Aerobi kultivētas rauga šūnas pēc priekšapstrādes ar 1M ksilītu un tai sekojošas žāvēšanas



32.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētas rauga šūnas pēc priekšapstrādes ar 1M ksilītu un tai sekojošas žāvēšanas



33.attēls. Aerobi kultivētas rauga šūnas pēc priekšapstrādes ar 1M glicerīnu un tai sekojošas žāvēšanas



34.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētas rauga šūnas pēc priekšapstrādes ar 1M glicerīnu un tai sekojošas žāvēšanas

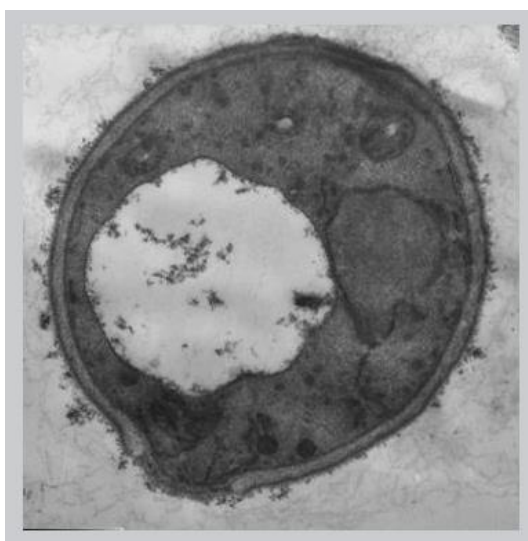
3.1.2.2. Caurstarojošās elektronu mikroskopijas pētījumi

Lai novērtētu raugu šūnu strukturālās izmaiņas dehidratācijas laikā, tika izmantota caurstarojošā elektronu mikroskopija. To pielieto iekššūnu izmaiņu novērošanai, ko iegūst pateicoties paraugu fiksācijai epoksīda sveķos un iespējai iegūt ultraplānus griezumus, kuros atainojas šūnu struktūras un organelas šķērsgriezumā. Aerobi augušas šūnas tika salīdzinātas ar limitēta skābekļa apstākļos kultivētām šūnām un pirms un pēc šūnu dehidratācijas.

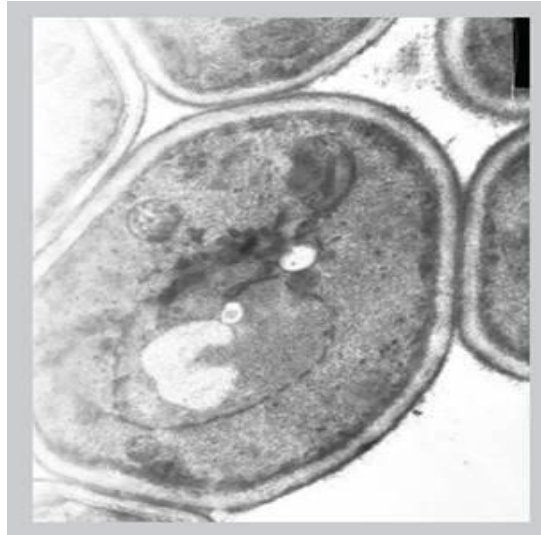
Pirmajā eksperimentu grupā apskatītas aerobos apstākļos kultivētas šūnas. 35.attēlā parādīta aerobi kultivēta natīva šūna stacionārajā augšanas fāzē. Kā redzams, šūnas minētajā augšanas fāzē ir ar izteiktu, lielu, barības vielām pildītu vakuolu. Redzams kodols ar membrānas porām un mitohondriji ar kristām, kā arī novērojamas pumpurrētas pēc šūnu dalīšanās.

36. attēlā redzamas aerobi kultivēts raugs *S. cerevisiae*, kas pakļautas dehidratācijai. Pēc žāvēšanas šūnās notiek dažādas iekššūnu izmaiņas gan molekulārā, gan strukturālā līmenī. Primāri tiek ietekmēta citoplazmatiskā membrāna un kodols. Izmainās organelļu forma un veidojas bojājumi vai pārrāvumi. Kā var novērot pēc iegūtajiem rezultātiem, šūnās parādās citoplazmatiskās membrānas invaginācijas. Kodolos veidojas ģenētiskā materiāla kondensācija un struktūru forma izmainās. Labi saskatāmas lipīdu granulas, kas veic reparācijas darbus bojātās kodola membrānas tuvumā. Pēc dehidratācijas šūnās vakuolas samazinās izmēros un paplašinās kodola membrānas poras, kas norāda uz lipīdu izmaiņām.

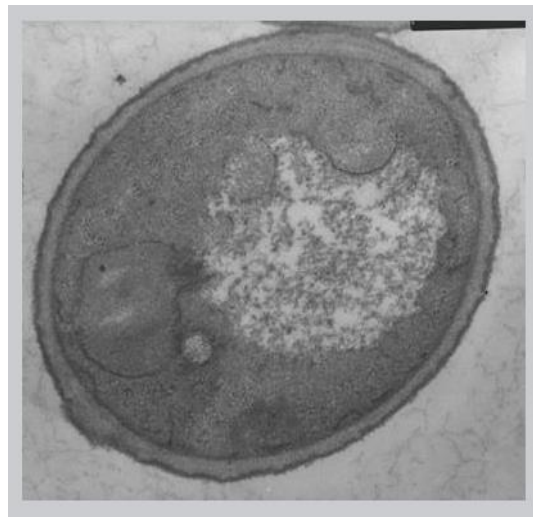
Otrajā eksperimentu sērijā izpētītas šūnas, kas kultivētas limitēta skābekļa apstākļos to natīvā stāvoklī un pēc dehidratācijas (37. attēls, 38. attēls).



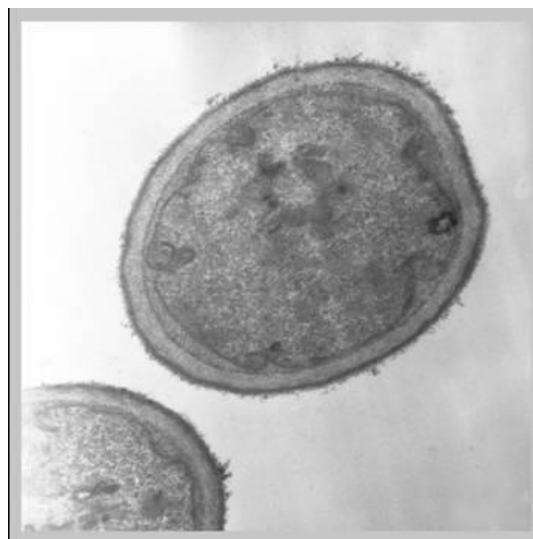
35. attēls. Aerobi kultivēts natīvs raugs



36.attēls. Aerobi kultivēts raugs pēc žāvēšanas



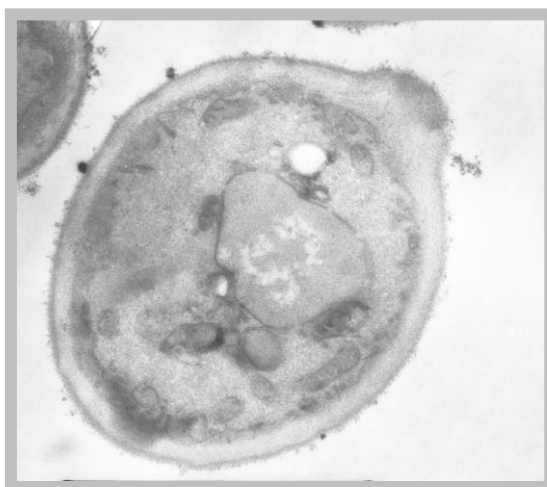
37.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts natīvs raugs



38.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts raugs pēc žāvēšanas

Natīvās rauga šūnās ir redzams simetrisks kodols un izteikti lielas vakuolas, kas liecina par nobriedušu šūnu lielo skaitu stacionārā fāzē. Šūnās nav atrodamī mitohondriji (37.att.) 38. attēlā parādīts limitēta skābekļa apstākļos kultivēts raugs, kas pakļauts dehidratācijai. Kā redzams, šūnās novērojama izteikta citoplazmatiskās membrānas sakrokošanās un spēcīga atraušānās no šūnas sienaiņas, kā arī bojāto apgabalu tuvumā ir sakoncentrējušās pūslīšu struktūras, kas visticamāk piedalās citoplazmatiskās membrānas, kodola membrānas un citu bojāto struktūru reparācijā.

Papildus tika apskatītas arī limitēta skābekļa apstākļos kultivētas šūnas pēc to inkubācijas 1M ksilita šķīdumā un tai sekojošas dehidratācijas (39. att.).



39.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētas rauga šūnas pēc priekšapstrādes ar 1M ksilitu un tai sekojošas žāvēšanas

Kā redzams, šūnās novērojamas citoplazmatiskās membrānas invaginācijas. Papildus novērojams, ka vakuolas ir samazinājušās izmēros, kas var būt saistīts arī ar šūnu inkubāciju šķīdumā ar paaugstinātu osmotisko spiedienu pirms dehidratācijas. Salīdzinot novērojumus ar dehidratētām šūnām, kas netika pakļautas priekšapstrādei (38. att.), pēc inkubācijas ksilita šķīdumā redzama vairāku aizsargmehānismu aktivācija, kas ir ļoti nozīmīgi žāvēšanas laikā. Uzskatāmi redzama ir viena no galvenajām aizsargreakcijām šūnā, kas ir hromatīna kondensācija kodolā DNS saglabāšanai, kā arī redzamas lipīdu granulu sargrupēšanās pie kodola, kur notiek kodola membrānu bojāto rajonu reparācija.

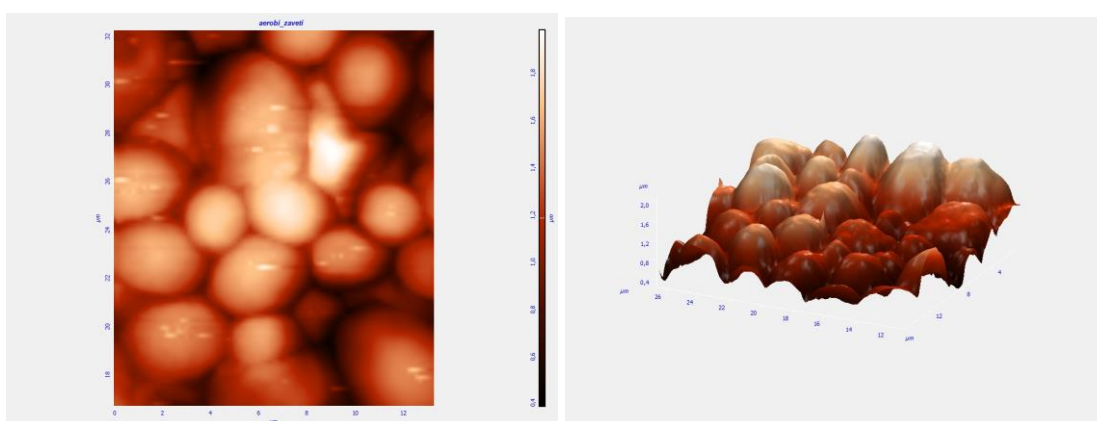
Kopumā, salīdzinot iegūtos attēlus, ir redzams, ka galvenās izmaiņas šūnās dehidratācijas rezultātā ir saistītas ar citoplazmatiskās membrānas izmaiņām, radot tajā ievērojamas invaginācijas, kā arī ar kodola formas un struktūras izmaiņām. Šūnās var tikt aktivizēti dzīvotspējas saglabāšanas mehānismi un dažādas struktūras, piemēram, lipīdu

granulas, iesaistās bojāto apgabalu "salabošanā", kā arī notiek hromatīna kondensācija kodolā.

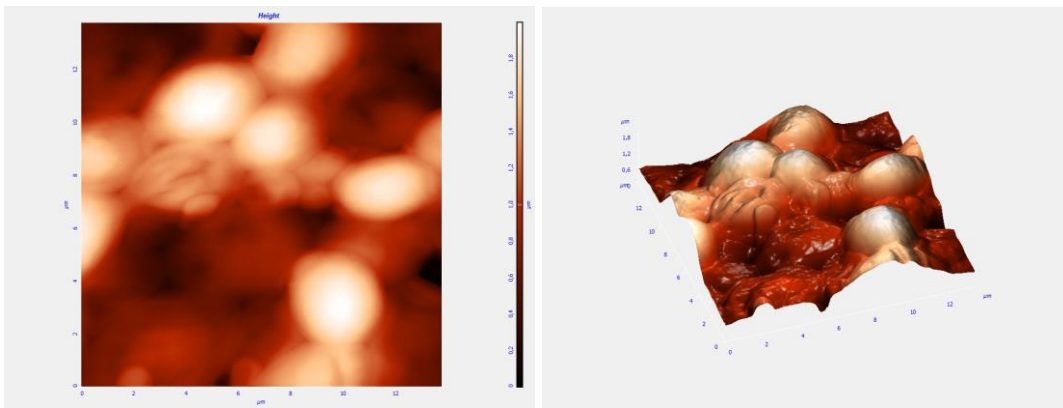
3.1.2.3. Atomspēku mikroskopijas pētījumi

Izmantojot atomspēku mikroskopu tika novērtētas šūnu virsmas izmaiņas pēc dehidratācijas, kā arī priekšapstrādes ar ksilītu un glicerīnu un tai sekojošas dehidratācijas. 40.attēlā parādītas aerobi kultivētas rauga šūnas. Kā redzams, salīdzinot ar elektronmikroskopijas datiem, arī šajā gadījumā novērojama gluda šūnu virsma, taču pēc dehidratācijas (41. att.) šūnas sakrokojas un šūnas zaudē savu tilpumu, lai gan tas nav tikt izteikts, kā novērotajos paraugos ar skenējošo elektronu mikroskopu. Salīdzinot limitēta skābekļa apstākļos augušas natīvas (42. att.) un dehidratētas šūnas (43. att.) novērojams, ka žāvēšana izraisa mazāku šūnu sakrokošanos un šūnas izskatās izturīgākas pret formas zudumu salīdzinot ar aerobām šūnām. Atsevišķos attēlos ir novērojama iekššūnu materiāla izdalīšanās, kā arī pilnīgi tukšās šūnas, lai gan šajā gadījumā iespējams novērotas jau pilnībā novecojušas rauga šūnas.

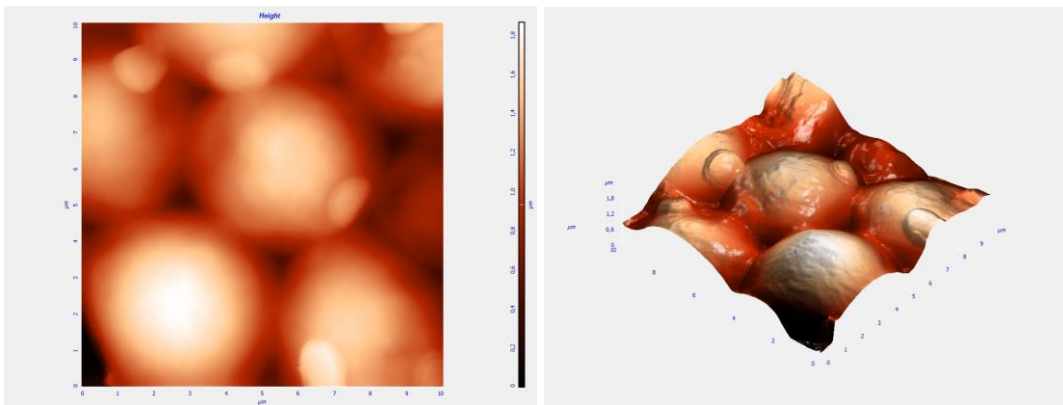
Lai gan kopumā šūnu novērojumi sakrīt ar elektronmikroskopijas attēliem, jāsecina, ka atomspēka mikroskopijas bildēs žāvēto šūnu virsma izskatās gludāka nekā skenējošās elektronu mikroskopijas attēlos. Var izvirzīt hipotēzi, ka tas varētu būt izskaidrojams ar paraugu sagatavošanas specifiku priekš atomspēku mikroskopijas, kur paraugs tiek sagatavots tam pievienojot ūdeni kā rezultātā šūnas spēj atgūt kādu noteiktu daļu sava tilpuma.



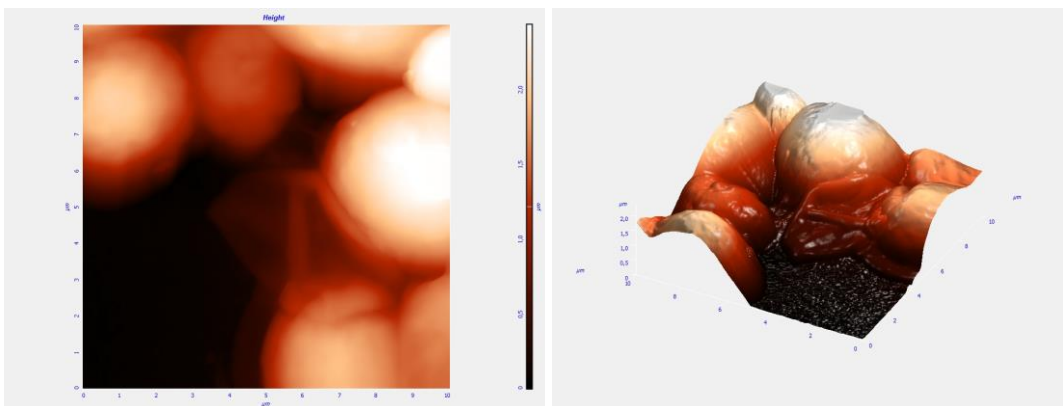
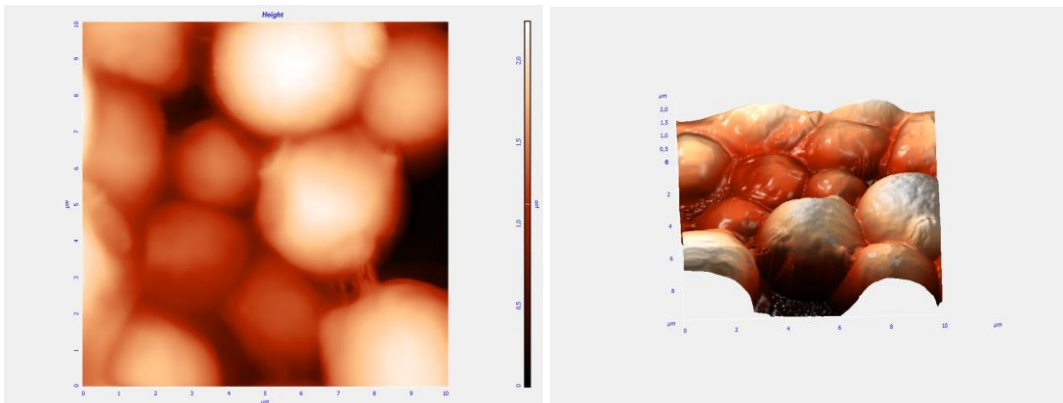
40.attēls. Aerobi kultivētu natīvu raugu šūnu virsma



41.attēls. Aerobi kultivētu raugu šūnu virsma pēc žāvēšanas

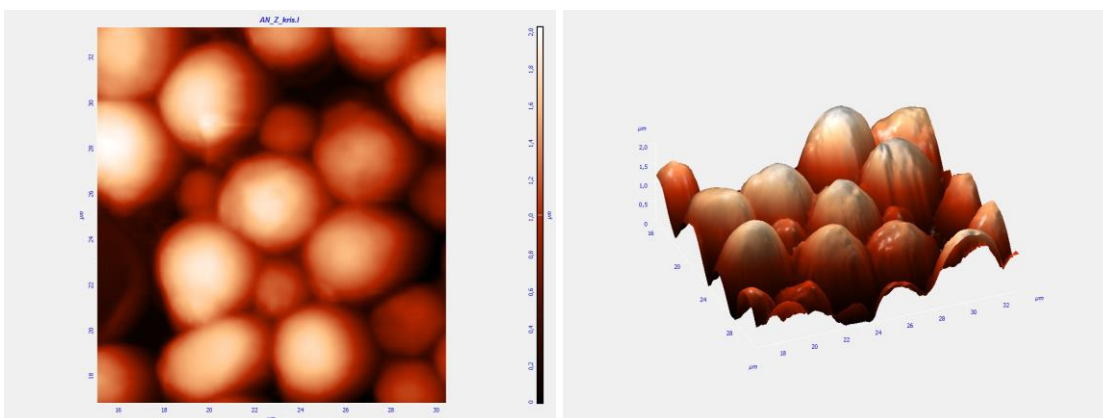


42.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu natīvu raugu šūnu virsma

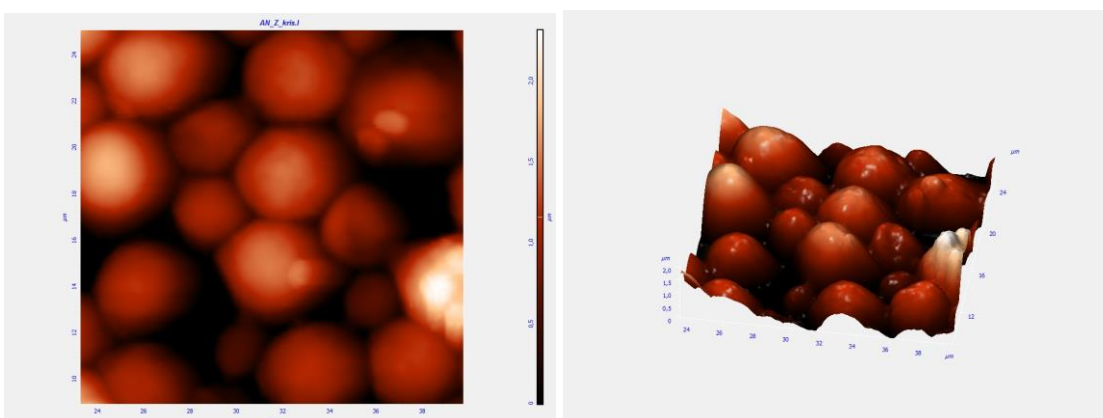


43.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu virsma pēc žāvēšanas

Eksperimentu rezultāti par limitēta skābekļa apstākļos kultivētu rauga šūnu virsmas izmaiņām pēc inkubācijas 1M glicerīnā un 1M ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas parādīti 44. attēlā un 45. attēlā.

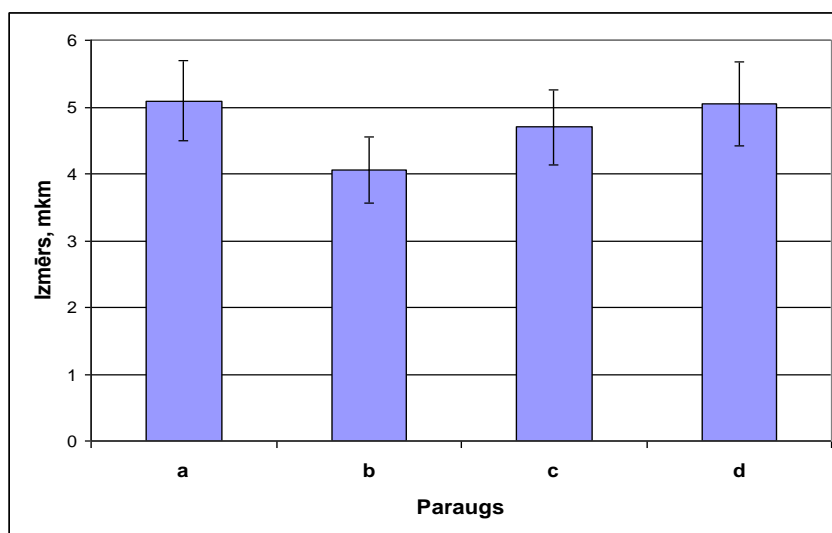


44. attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu virsma pēc priekšapstrādes ar 1M glicerīnu un tai sekojošas žāvēšanas



45. attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu virsma pēc priekšapstrādes ar 1M ksilitu un tai sekojošas žāvēšanas

Pēc iegūtajiem rezultātiem redzams, ka pēc apstrādes ar ksilitu šūnu virsma ir gluda un nav novērojama šūnu sakrokošanās. Gadījumā ar inkubāciju glicerīnā var novērot krokaināku šūnas virsmu, lai gan šūnu invaginācijas ir mērenas, kas kopumā sakrīt ar datiem, kas iegūti izmantojot skenējošo elektronu mikroskopiju. Lai precīzāk novērtētu šūnu tilpuma izmaiņas limitēta skābekļa apstākļos augušām raugu šūnām, tika noteiktas diametra vidējās izmaiņas. Iegūtie dati parādīti 46. attēlā.

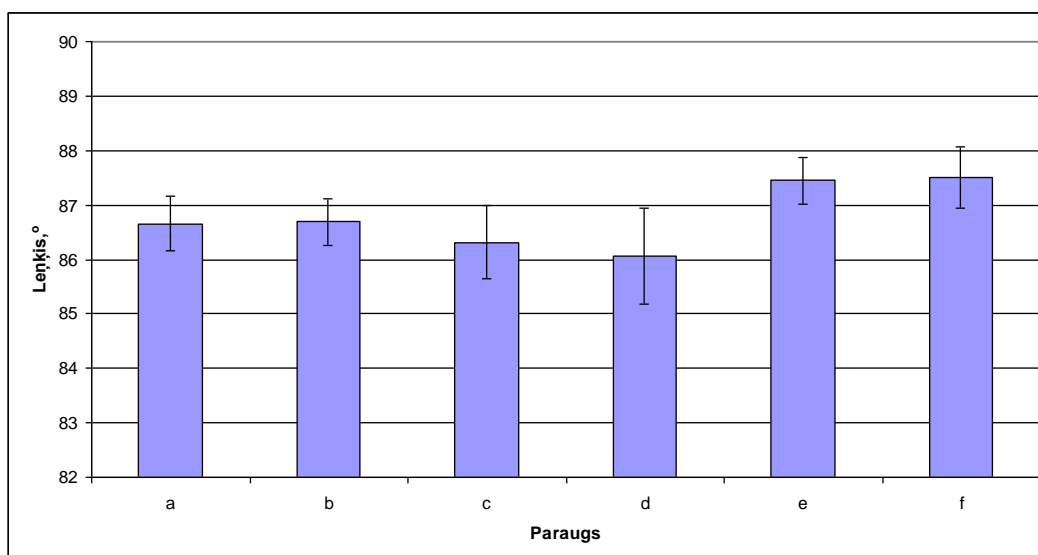


46.attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu rauga šūnu diametra izmēra izmaiņas.

Paraugi: limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa pirms (a) un pēc žāvēšanas (b); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa inkubēta ksilītā un tad žāvēta (c); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (d)

Salīdzinot limitēta skābekļa apstākļos augušu natīvu un žāvētu šūnu attēlus nebija iespējams novērot šūnu tilpuma samazināšanos, tomēr šūnu izmēra noteikšana palīdzēja uzrādīt vidēju šūnu lieluma samazinājumu par 1μm t.i. vidēji 20%. Pēc priekšapstrādes ar glicerīnu šūnu izmērs saglabājās gandrīz tāds pats kā biomasai. Otrais augstākais rezultāts novērojams ksilītā inkubētām šūnām. Tomēr jāņem vērā, ka iespējama arī šūnu izmaiņu mērījuma neprecizitāte, kas var būt saistīta ar paraugu sagatavošanas metodiku, kuras rezultātā paraugs pirms skenēšanas tiek pakļauts vidēji 2 minūšu rehidratācijai un atkārtotai izžāvēšanai, kā rezultātā nav iespējams noteikt atkal uzņemtā ūdens daudzumu šūnā un tā ietekmi uz šūnas tilpuma iespējamajām izmaiņām.

Papildus eksperimentos tika salīdzinātas AFM lāzera novirzes-konsoles pozīcijas līknes. Līknes slīpuma leņķis saistīts ar šūnas virsmas stingrību - jo lielāks leņķis (vairāk grādu), jo stingrāka ir skenējamā parauga virsma un jo mazāks leņķis, jo virsma ir elastīgāka. Kā redzams pēc iegūtajiem datiem (47. att.), aerobi kultivētu šūnu virsmas stingrība ir gandrīz vienāda gan natīvām, gan dehidratētām šūnām. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētās šūnās sieniņas stingrība ir zemāka, kā arī pēc dehidratācijas novērojams vēl lielāks leņķa samazinājums. Pēc inkubācijas glicerīna un ksilīta šķīdumos un sekojošas dehidratācijas, limitēta skābekļa apstākļos kultivētu šūnu sieniņas uzrāda tās stingrības pieaugumu, kā rezultātā varētu izvirzīt hipotēzi, ka šādi kultivētu šūnu sieniņas stingrības paaugstināšanās saistīta ar izdzīvotības saglabāšanos dehidratācijas-rehidratācijas laikā.



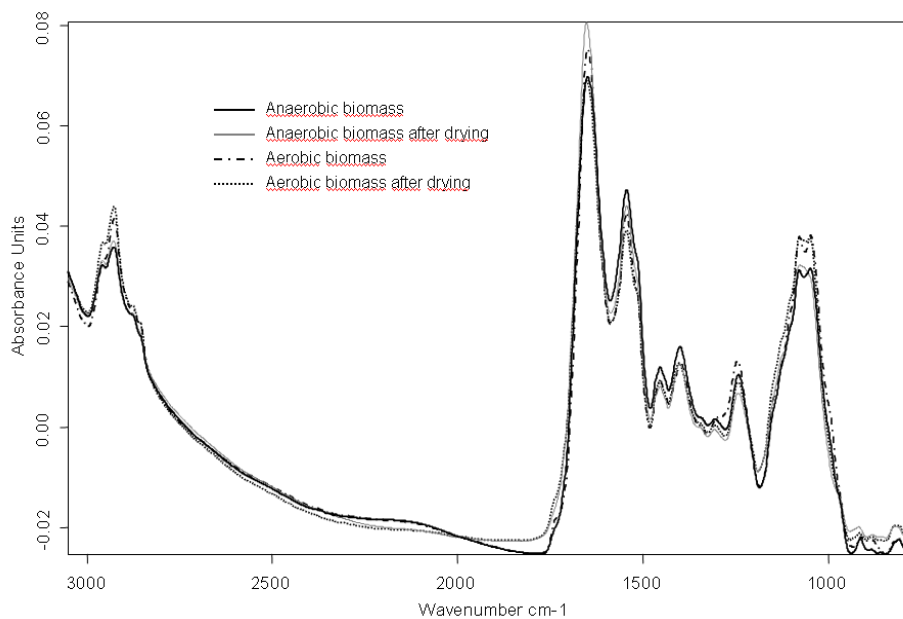
47.attēls. Rauga šūnu virsmas elastības moduļa leņķis. Paraugi: aerobi kultivēta biomasa pirms (a) un pēc žāvēšanas (b); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa pirms (c) un pēc žāvēšanas (d); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa inkubēta ksilitā un tad žāvēta (e); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (f)

3.1.3. Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas pētījumi

Lai izpētītu atšķirības starp raugu šūnām, kas audzētas aerobos apstākļos un limitēta skābekļa apstākļos, kā arī raksturotu šūnu izturību pret dehidratācijas – rehidratācijas procesu, tika veikta šūnu ķīmiskā sastāva Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas (FTIR) analīze. Ar šo metodi mēra dažādu ķīmisko saišu absorbēto enerģiju, tādējādi nosakot parauga funkcionālās grupas. Izmaiņas bioķīmiskajā sastāvā mikroorganisma šūnās novērojamas FTIR spektrā pēc vairākiem rādītājiem tajā izšķir ogļhidrātu, proteīnu, nukleīnskābju un lipīdu reģionus (Naumann, 2000; Helm and Naumann, 1995). Reģions starp 1300 cm^{-1} un 700 cm^{-1} primāri ataino nukleīnskābju un ogļhidrātu grupu (C-O, C-O-C, C-O-P un PO_2^- vibrācijas). Reģions starp 1700 cm^{-1} un 1500 cm^{-1} ataino proteīnu grupas (N-H un C=O vibrācijas). Reģions starp 3000 cm^{-1} un 2800 cm^{-1} ataino lipīdu grupas (CH_2 un CH_3 vibrācijas). Izmaiņas absorbcijas joslu profilos un/vai intensitātē norāda uz komponentu un/vai šo komponentu koncentrācijas izmaiņām šūnās.

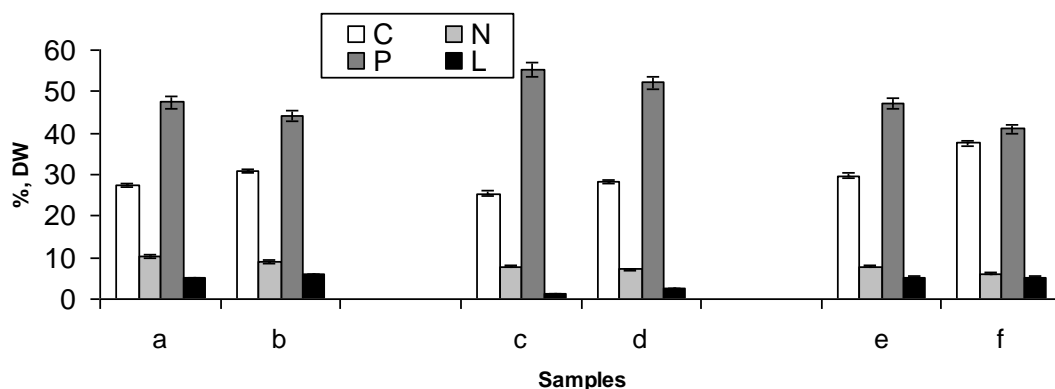
48. attēlā parādīti tipiski FTIR spektri raugu biomasai, kas kultivēta aerobi un limitēta skābekļa apstākļos pirms un pēc dehidratācijas. *Saccharomyces cerevisiae* 14 biomasas spektrs parādīja vairākas atšķirības absorbcijas joslu intensitātē. Dehidratēta rauga, kas kultivēts aerobos apstākļos un limitēta skābekļa apstākļos, biomasas spektri arī uzrādīja atšķirības bioķīmiskajā sastāvā. Pēc spektru profiliem redzams, ka ogļhidrātu, nukleīnskābju,

proteīnu un lipīdu reģionos joslu intensitāte atšķiras, atkarībā no augšanas apstākļiem un dehidratācijas.



48.attēls. FTIR spektrs

Tika veikta kvantitatīvā analīze, kuras rezultāti apstiprināja atšķirības makromolekulārajā sastāvā aeroabi kultivētajiem un limitēta skābekļa apstākļos kultivētajiem raugiem (49. att.).



49. attēls. Ķīmiskā sastāva izmaiņas raugu šūnās. Parādītas koncentrācijas (% Sausais svars) ogļhidrāti (C), nukleīnskābes (N), proteīni (P) un lipīdi (L). Paraugi: aeroabi kultivēta biomasa pirms (a) un pēc žāvēšanas (b); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa pirms (c) un pēc žāvēšanas (d); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa inkubēta ksilitā un tad žāvēta (e); limitēta skābekļa apstākļos kultivēta biomasa inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (f)

Pret dehidratāciju rezistentu aeroabi kultivēto raugu dehidratācija radīja pieaugumu ogļhidrātu sastāvā par 3,5% un pieaugumu lipīdu sastāvā par 0,8%. Pretēji tam, nukleīnskābju

un proteīnu daudzums samazinājās par 1,2% un 3,2%, attiecīgi (49. attēls - a, b). Natīvas raugu šūnas audzētas limitēta skābekļa apstākļos atšķirās no aerobi kultivētām rauga šūnām (49. attēls - a, c) pamatojoties uz zemāku ogļhidrātu (2.0% mazāk), lipīdu (3.8% mazāk) un nukleīnskābju (2.4% mazāk) sastāvu, kā arī lielāku proteīnu daudzumu (8.0% vairāk). Tādā veidā, ir parādīts, ka augšanas apstākļi (aerobi vai limitēta skābekļa) ietekmē *S. cerevisiae* 14 makromolekulāro kompozīciju, kur intracelulārie proteīni un lipīdi uzrāda vislielākās izmaiņas. Limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu dehidratācija, kas praktiski izraisa 100% šūnu nāvi, radīja pieaugumu ogļhidrātu (2.7%) un lipīdu (1.0%) sastāvā, bet samazināšanos nukleīnskābju (0.6%) un proteīnu (3.3%) sastāvā (49. attēls - c, d). Dati par samazināšanos proteīnu daudzumā pēc dehidratācijas izraisa interesi. Iepriekš veiktajos pētījumos, tika parādīts, ka dehidratācijas laikā limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu šūnās aktivējas proteīnu sintēze, kuri pieder karstuma šoka proteīnu grupai (Guzhova *et.al.*, 2008). Diemžēl, šīs aizsargsistēmas aktivācija nav pietiekama, lai saglabātu šūnu izdzīvotību dehidratācijas procesā. Tai pat laikā tas nozīmē, ja eksistē papildus proteīnu sintēze dehidratācijas posmā, tad ir jābūt arī nopietnam citu proteīnu destrūkcijas procesam. Tādējādi, varam izvirzīt hipotēzi, ka, iespējams, dažiem no šiem neatgriezeniski bojātajiem proteīniem ir svarīga loma šūnu dzīvotspējas saglabāšanā. Tomēr, salīdzinot šos rezultātus, iespējams secināt, ka abos apstākļos audzētu raugu dehidratācija izraisa vienādas izmaiņas ķīmiskajā sastāvā. Neskatoties uz to, ir skaidrs, ka šūnu rezistences mehānismi pret dehidratāciju raugu šūnām, kas augušas atšķirīgos apstākļos (aerobi vai limitēta skābekļa apstākļos) ir pilnīgi atšķirīgi.

Kopīgais ogļhidrātu, lipīdu un nukleīnskābju daudzums dehidratētās šūnās, kas augušas limitēta skābekļa apstākļos ir mazāks par 1.8–3.5%, nekā dehidratētās šūnās, kas augušas aerobos apstākļos (49. attēls - b, d). Vislielākā atšķirība novērojama lipīdu sastāvā, kur limitēta skābekļa apstākļos augušās šūnās ir tikai 40% no lipīdu sastāva, kas atrodams dehidratētās šūnās, kas augušas aerobos apstākļos. Citiem komponentiem šīs atšķirības ir mazāk izteiktas: ogļhidrātu sastāvs ir 91%, bet nukleīnskābju – 80% no aerobās kultūras sastāva. Tādējādi var izvirzīt hipotēzi par raugu šūnu atšķirīgās rezistences iemesliem pret dehidratāciju (ņemot vērā tikai kopīgo ķīmisko sastāvu). Var pieņemt, ka šie iemesli varētu būt sastīti ar lielajām atšķirībām lipīdu sastāvā, kuri ir viens no galvenajiem komponentiem iekššūnu membrānās. Iepriekšējie pētījumi par rauga šūnām parādīja, ka intracelulāro membrānu organizācija ir viens no galvenajiem faktoriem, kas nosaka šūnu stabilitāti dehidratācijas-rehidratācijas procesā (Simonin *et al.*, 2007; Leslie *et al.*, 1994; Rapoport *et al.*, 2009). Ja membrānas nav labi pasargātas ar intracelulārajiem aizsargmehānismiem, tās var tikt neatgriezeniski bojātas raugu šūnu dehidratācijas laikā. Tika izvirzīta hipotēze, ka limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu šūnu jutība pret dehidratāciju var arī tikt saistīta ar atšķirīgo

ķīmisko sastāvu to intracelulārajās membrānās, salīdzinot ar aerobi kultivēto šūnu membrānām. Iegūtie FTIR dati apstiprina šo hipotēzi. Ir izpētīts, ka limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu šūnu citoplazmātiskās membrānas satur vairāk piesātinātās taukskābes, mazāk sterolus un ergosterolu (Nurminen *et al.*, 1975; Snoek and Steensma, 2007). Pētījumi rāda, ka ergosterola akumulācija ir nepieciešama šūnu rezistencei pret dehidratāciju (Dupont *et al.*, 2010).

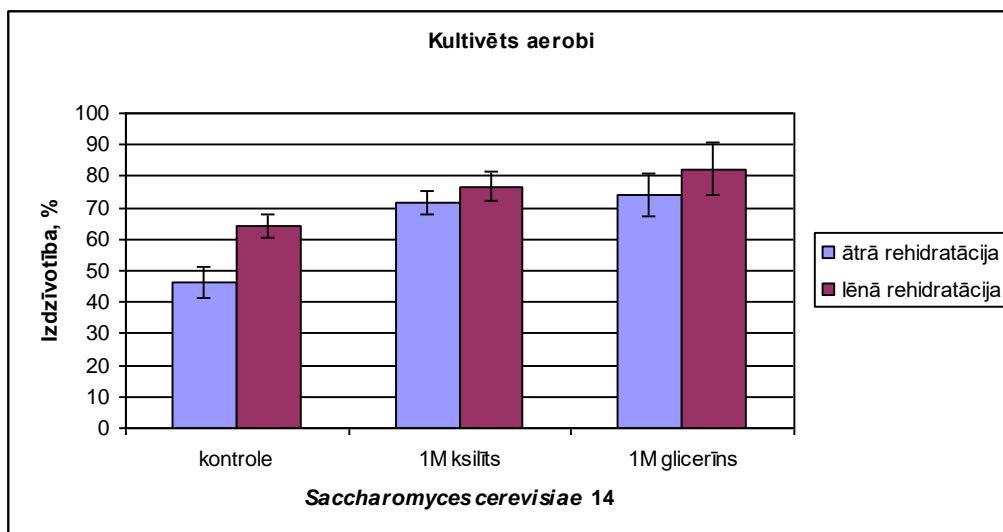
Tā kā pēc apstrādes ar ksilītu, žāvēto rauga šūnu izdzīvotība paaugstinājās vidēji no 0–4% līdz 34–52% atkarībā no izmantotās rehidratācijas metodes, bet inkubācija glicerīna šķīdumā paaugstināja izdzīvotību līdz vidēji 60% lietojot lēno rehidratāciju, saprotams, ka šo apstrāžu iedarbības mehānismi atšķiras. Neskatoties uz lielo izdzīvojušo šūnu skaitu pēc glicerīna apstrādes un lēnās rehidratācijas, nav novērojams līdzīgs efekts pēc sauso šūnu ātrās rehidratācijas. FTIR pētījuma rezultāti parādīja (49. attēls -e,f), ka pēc šūnu inkubācijas ksilītā (49. attēls - e) ogļhidrātu, lipīdu, nukleīnskābju un proteīnu saturs limitēta skābekļa apstākļos augušo žāvēto raugu šūnās pietuvojās aerobi kultivēto žāvēto raugu šūnu saturam. Tas bija - 96% ogļhidrātiem, 87% nukleīnskābēm, 107% proteīniem un 90% lipīdiem. Lipīdu sastāvs piedzīvoja vislielākās izmaiņas. Inkubācija glicerīna šķīdumā radīja līdzīgus efektus (49. attēls - f). Tai pat laikā ogļhidrātu procentuālais saturs limitēta skābekļa apstākļos augušo žāvēto raugu šūnās kļuva pat lielāks nekā žāvētās aerobās šūnās un sastādīja 122% no to satura žāvētās aerobās šūnās. Proteīnu saturs kļuva 93%, lipīdu - 90% un nukleīnskābju – 68% no to satura sausās aerobās rauga šūnās. Šie rezultāti parādīja, ka priekšapstrāde ar glicerīnu rada šūnās lielākas izmaiņas kopīgā ķīmiskā sastāvā (salīdzinot ar žāvētām aerobām šūnām) nekā priekšapstrāde ar ksilītu. Pēc šiem datiem var arī redzēt, ka kopumā nav izmaiņu (salīdzinot ar ksilītā apstrādātām šūnām) kopīgajā lipīdu daudzumā. Tai pat laikā proteīnu daudzums bija zemāks nekā rezistentās aerobi kultivētās žāvētās rauga šūnās un ar ksilītu apstrādātās limitēta skābekļa apstākļos augušās šūnās, bet nukleīnskābju daudzums bija ievērojami mazāks nekā abos iepriekš minētajos šūnu veidos. Tā kā šādas atšķirības nukleīnskābju saturā var būt saistītas tikai ar ribosomālā RNS daudzumu, šīs pārmaiņas labi korelē ar mazāku proteīnu daudzumu šādās šūnās – iespējams šeit bija mazāka proteīnu sintēze raugu dehidratācijas sākumposmā. Tāpat tika novērots arī ogļhidrātu satura pieaugums limitēta skābekļa apstākļos augušo žāvēto raugu sastāvā, salīdzinot ar rezistentām aerobi kultivētām šūnām, pēc glicerīna apstrādes. Glicerīna apstrādes efekts var būt saistīts ar papildus aizsardzības mehānismu salīdzinot ar ksilīta apstrādi t.i. tā var būt intracelulārā turgor spiediena saglabāšana, kuru nodrošina glicerīns citos ekstremālos apstākļos (Blomberg and Adler, 1992; Modig *et al.*, 2007). Iespējams, ka palielinātais intracelulārais ogļhidrātu daudzums kas parādās pie glicerīna apstrādes ir nepieciešams šī protektīvā mehānisma darbības nodrošināšanai.

3.1.4. Karstuma šoka proteīnu Hsp70 pētījumi

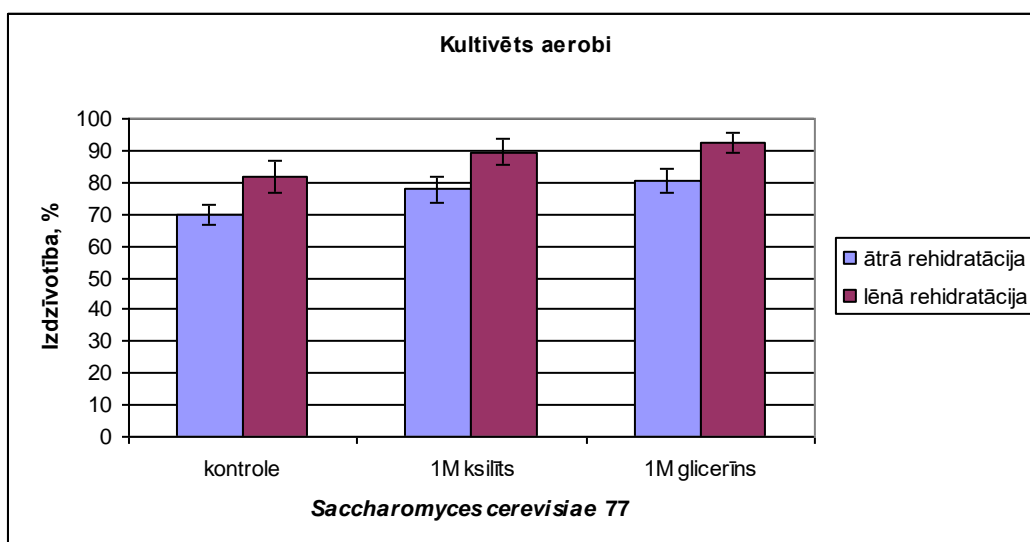
Karstuma šoka proteīni darbojas kā molekulārie šaperoni un tiem ir svarīgas funkcijas proteīnu biosintēzē, foldingā, intracelulārajā lokalizācijā un transportā, reparācijā, kā arī nepareiza foldinga rezultātā radušos proteīnu degradācijā (Feder and Hofmann, 1999). Lai noskaidrotu Hsp70 iespējamo nozīmi šūnu izturībā pret dehidratācijas – rehidratācijas procesu un atšķirības starp raugu šūnām, kas audzētas aerobos apstākļos un limitēta skābekļa apstākļos, tika veikta karstuma šoka proteīnu Hsp70 analīze. Pētījumam izvēlēti divi raugu celmi – laboratorijas celms *Saccharomyces cerevisiae* 14 un termotolerantais celms *Saccharomyces cerevisiae* 77. Termotolerantajam celmam piemīt spēja pārciest dehidratācijas-rehidratācijas procesu saglabājot augstāku dzīvotspēju, vidēji par 20% pārsniedzot *Saccharomyces cerevisiae* 14 izdzīvotību pēc ātrās un lēnās rehidratācijas kultivējot aerobi. Kā iepriekš noskaidrots, limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu šūnu *Saccharomyces cerevisiae* 14 inkubācija 1M ksilita un 1M glicerīna šķīdumos ievērojami paaugstina šūnu izdzīvotību. Tāds pats efekts novērojams arī šūnām, kas kultivētas aerobos apstākļos. Aerobi kultivētu celmu *Saccharomyces cerevisiae* 14 un *Saccharomyces cerevisiae* 77 izdzīvotība pēc inkubācijas 1M ksilita un 1M glicerīna šķīdumos attēlota 50.attēlā un 51.attēlā. Pēc iegūtajiem rezultātiem redzams, ka *Saccharomyces cerevisiae* 14 raugu šūnu izdzīvotība pēc ātrās rehidratācijas paaugstinājās par 25-27% un pēc lēnās rehidratācijas par 12-18%, inkubējot ksilita un glicerīna šķīdumā, attiecīgi.

Termotolerantā raugu celma *Saccharomyces cerevisiae* 77 gadījumā, izdzīvotība pēc ātrās rehidratācijas paaugstinājās par 8-10 % un pēc lēnās rehidratācijas papildus par 7-10 %, inkubējot ksilita un glicerīna šķīdumā, attiecīgi. Salīdzinot iegūtos datus, redzams, ka lielāks izdzīvotības pieaugums salīdzinot ar kontroli novērojams pēc *Saccharomyces cerevisiae* 14 raugu šūnu inkubācijas 1M ksilita un 1M glicerīna šķīdumā.

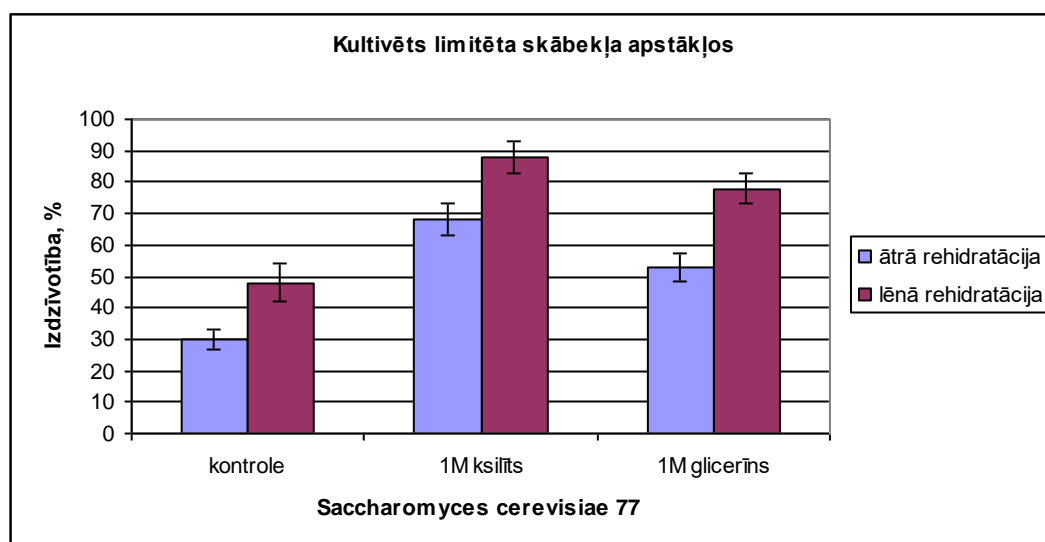
Arī kultivējot limitēta skābekļa apstākļos, raugu *Saccharomyces cerevisiae* 77 izdzīvotība ir augstāka vidēji par 30% pēc ātrās un 50% pēc lēnās rehidratācijas, salīdzinot ar *Saccharomyces cerevisiae* 14 kontroli (52. att.). Kā iepriekš noskaidrots limitēta skābekļa apstākļos kultivēta rauga *Saccharomyces cerevisiae* 14 izdzīvotība pēc inkubācijas 1M ksilita šķīdumā paaugstinās līdz 34–52% pēc ātrās un lēnās rehidratācijas, attiecīgi. Inkubācija glicerīna šķīdumā paaugstina izdzīvotību līdz vidēji 60% lietojot lēno rehidratāciju. Termotolerantā celma gadījumā inkubācija ksilita šķīdumā palīdz paaugstināt šūnu izdzīvotību vidēji līdz 68 % pēc ātrās un 88 % pēc lēnās rehidratācijas, un glicerīna gadījumā līdz 53 % pēc ātrās un 78 % pēc lēnās rehidratācijas.



50. attēls. Aerobos apstākļos kultivētu raugu šūnu *Saccharomyces cerevisiae* 14 izdzīvotība pēc inkubācijas 1M ksilīta un 1M glicerīna šķīdumā pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

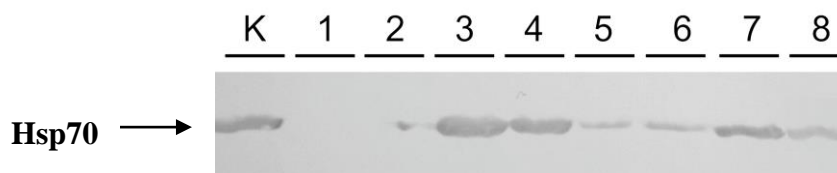


51. attēls. Aerobos apstākļos kultivētu raugu šūnu *Saccharomyces cerevisiae* 77 izdzīvotība pēc inkubācijas 1M ksilīta un 1M glicerīna šķīdumā pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas



52. attēls. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu šūnu *Saccharomyces cerevisiae* 77 izdzīvotība pēc inkubācijas 1M ksilīta un 1M glicerīna šķīdumā pirms žāvēšanas un tai sekojošas ātrās un lēnās rehidratācijas

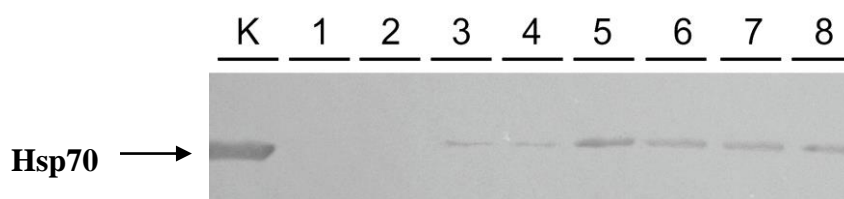
Lai izpētītu Hsp70 nozīmi termotoleranto raugu *Saccharomyces cerevisiae* 77 izturībā pret dehidratācijas-rehidratācijas stresu, kā arī veikt salīdzinājumu ar raugu celmu *Saccharomyces cerevisiae* 14, veikti eksperimenti izmantojot proteīnu imunoblotingu. Iegūtie rezultāti pēc šūnu kultivēšanas aerobos apstākļos parādīti 53. attēlā.



53. attēls. Hsp70 proteīni aerobi kultivētās raugu šūnās. Paraugi: kontrolē (K); Raugu celms *Saccharomyces cerevisiae* 14: biomasa pirms (1) un pēc žāvēšanas (2); biomasa inkubēta ksilītā un tad žāvēta (3); biomasa inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (4); Raugu celms *Saccharomyces cerevisiae* 77: biomasa pirms (5) un pēc žāvēšanas (6); biomasa inkubēta ksilītā un tad žāvēta (7); biomasa inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (8)

Kā redzams pēc 53. attēla, stacionārā augšanas fāzē esošu raugu šūnu *Saccharomyces cerevisiae* 14 biomasā nav novērojama Hsp 70 klātbūtne. Tas sakrīt ar Guzhova *et.al.* pētījuma datiem, kur parādīts, ka Hsp70 tiek sintezēts *Saccharomyces cerevisiae* 14 raugu šūnās eksponencionālajā augšanas fāzē, kuras specifiska iezīme ir aktīvs metabolisms un intensīva dažādu proteīnu sintēze. Tā kā viena no Hsp70 svarīgākajām funkcijām ir šapeirona

aktivitāte, tad var izvirzīt hipotēzi, ka šī īpašība ir praktiski nepieciešama minētajā augšanas fāzē. Sekojoši, kopīgais iekššūnu proteīnu sintēzes samazinājums stacionārajā fāzē nerada *Saccharomyces cerevisiae* 14 nepieciešamību pēc Hsp70 sintēzes (Guzhova *et al.*, 2008). Savukārt termotolerantā rauga *Saccharomyces cerevisiae* 77 biomasā stacionārajā augšanas fāzē novērojama proteīna Hsp70 sintēze, kā rezultātā var izdarīt secinājumu, ka termotolerantā celma paaugstinātā izturība pret dehidratāciju-rehidratāciju salīdzinot ar *Saccharomyces cerevisiae* 14 šūnām, var būt vismaz daļēji saistīta ar karstuma šoka proteīna sintēzes turpināšanos stacionārajā fāzē, kas raugu šūnās *Saccharomyces cerevisiae* 14 netiek novērota. Dehidratācijas process rada stresa atbildi *Saccharomyces cerevisiae* 14 šūnās, kas novērojams kā proteīna Hsp70 sintēze. Arī šūnās *Saccharomyces cerevisiae* 77 pēc dehidratācijas novērojama Hsp70 klātbūtne, lai gan proteīna daudzums pielīdzināms šūnu biomasā sintezētajam Hsp70. Raugu *Saccharomyces cerevisiae* 14 paraugos, kas inkubēti ksilīta un glicerīna šķīdumos pirms dehidratācijas, novērojama ļoti spēcīga molekulārā atbilde kā stipri izteikta Hsp70 proteīna sintēze. Intensīvāk izteikta sintēzes atbilde novērojama arī termotolerantajam celmam, kas visuzskatāmāk novērojama tieši pēc inkubācijas ksilīta šķīdumā.



54. attēls. Hsp70 proteīni limitēta skābekļa apstākļos kultivētās raugu šūnās. Paraugi: kontrole (K); Raugu celms *Saccharomyces cerevisiae* 14: biomasā pirms (1) un pēc žāvēšanas (2); biomasā inkubēta ksilītā un tad žāvēta (3); biomasā inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (4); Raugu celms *Saccharomyces cerevisiae* 77: biomasā pirms (5) un pēc žāvēšanas (6); biomasā inkubēta ksilītā un tad žāvēta (7); biomasā inkubēta glicerīnā un tad žāvēta (8)

54. attēlā parādīta Hsp70 proteīna saturs limitēta skābekļa apstākļos augušās rauga šūnās *Saccharomyces cerevisiae* 14 un *Saccharomyces cerevisiae* 77. Kā redzams pēc iegūtajiem datiem, raugos *Saccharomyces cerevisiae* 14 nav detektējami Hsp70 proteīni biomasā, kā arī raugos pēc dehidratācijas, savukārt pēc raugu inkubācijas ksilīta un glicerīna šķīdumos novērojama Hsp70 klātbūtne. *Saccharomyces cerevisiae* 77 gadījumā tā ir novērojama visos paraugos. Arī šajā gadījumā var izteikt secinājumu, ka termotoleranto raugu

spēja saglabāt augstāku izdzīvotību limitēta skābekļa apstākļos ir saistīta ar spēju sintezēt karstuma šoka proteīnus kā labvēlīgos, tā arī stresa apstākļos.

3.1.5. Kopsavilkums par limitēta skābekļa apstākļos augušu dzīvotspējīgu sausu raugu iegūšanu

Galvenie klasiskie biotehnoloģiskie rūgšanas procesi, kuros izmanto raugus - alus, vīna un spirta ražošana, notiek anaerobos apstākļos. Tomēr visu šo procesu sākumposms ir saistīts ar atbilstošo raugu celmu inokuluma izaudzēšanu aerobos apstākļos. Daudzos gadījumos tas ir saistīts ar to, ka biotehnoloģiskajos procesos kā izejas kultūru aizvien biežāk izmanto tieši aktīvus sausos raugus. Tie ir raugi, kas atrodas anhidrobiozes stāvoklī. Sauso maizes raugu kvalitāte, kurus ražo pasaules vadošās kompānijas, ir ļoti augsta un dzīvotspējīgo šūnu daudzums sastāda 95 – 98%. Tomēr atūdeņoto vīna, alus un spirta raugu raksturlielumi dažiem ražošanā izmantotajiem celmiem ir ievērojami zemāki. Un, izmantojot šādus raugus, to adaptācija anaerobiem apstākļiem aizņem noteiktu laiku un tas pagarina biotehnoloģisko procesu. Šajā gadījumā daudz ērtāk un ekonomiski izdevīgāk būtu izmantot aktīvus sausos raugus, kas iepriekš izaudzēti anaerobos apstākļos (limitēta skābekļa apstākļos). Diemžēl uz doto brīdi šādi raugi netiek rūpnieciski ražoti, jo tie nepanes atūdeņošanas procesu. Vadoties pēc Šūnu bioloģijas laboratorijā uzkrātās lielās pieredzes par anhidrobiozes pētījumiem arī tādiem raugiem, kas izaudzēti aerobos apstākļos, tika nolemts pamēģināt atrast iespēju kā limitēta skābekļa apstākļos augušiem raugiem paaugstināt rezistenci pret atūdeņošanu, un pārvest tos anhidrobiozes stāvoklī. Papildus tam mēģinājām izmantot to pašu metodiku, kas tika izstrādāta Šūnu bioloģijas laboratorijā aerobi kultivētu šūnu rezistences paaugstināšanai pret atūdeņošanu. Šī metode balstās uz raugu inkubāciju ogļhidrātu (saharozē un laktozē) šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu (Rapoport and Beker, 1983). Šajos apstākļos izdevās paaugstināt dažādu iemeslu dēļ sākotnēji pret dehidratāciju neizturīgu raugu dzīvotspēju pēc žāvēšanas, vidēji par 60% un sasniedzot atūdeņoto šūnu izdzīvotību līdz pat 80%. Šīs metodes ideja ir tajā, ka veicot šūnu inkubāciju šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu, šūnās var radīt atūdeņošanas procesa sākumposma imitāciju, kas dabiskajos apkārtējās vides apstākļos nenotiek momentāli, bet gan pakāpeniski. Tādējādi šūnām ir pietiekami daudz laika, lai „ieslēgtu” šo mikroorganismu ilgstošās evolūcijas procesā radušās dažādās aizsargreakcijas. Ar šādu priekšapstrādi, inkubējot pret dehidratāciju nenoturīgās šūnas, mākslīgi tiek paildzināts periods, kurā tās spēj adaptēties sekojošai atūdeņošanai. Veiktie pētījumi parādīja, ka šādās šūnās tiešām tiek iniciētas noteiktas aizsargreakcijas, kā, piemēram, šūnās sintezējās polioli (mannīts un

sorbīts), kuri ievērojami paaugstināja citoplazmatiskās membrānas stabilitāti un samazināja membrānu lipīdu fāzu pārejas temperatūru (Rapoport *et al.*, 1988, 2009). Diemžēl eksperimenti parādīja, ka augstāk aprakstītā metodika - limitēta skābekļa apstākļos augušu raugu inkubācija, cukuru (glikoze, saharoze, laktoze) ar paaugstinātu osmotisko spiedienu šķīdumos, nedod analogu efektu un nepaaugstina raugu rezistenci pret žāvēšanu. Tādējādi, lai vēlreiz pārliecinātos par pozitīvā efekta neesamību no paaugstinātā osmotiskā spiediena, veicām papildus eksperimentus ar šūnu inkubāciju NaCl šķīdumos. Šajā gadījumā, papildus paaugstinātā osmotiskā spiediena efektam pievienojās arī sāls, kā ūdens akceptora efekts. Tomēr arī šajā gadījumā aerobos apstākļos kultivētie raugi kļuva daudz izturīgāki pret dehidratāciju, bet limitēta skābekļa apstākļos kultivētie raugi, paaugstinātu izturību neieguva. Visticamāk, šādu atšķirību osmotiskā spiediena darbības efektos (neatkarīgi no izmantojamā šķīduma) var izskaidrot ar to, ka aerobos apstākļos kultivētajām šūnām mēs vienkārši pagarinājām to adaptācijas periodu un devām šūnām vairāk laika, lai aktivētu to jau evolucionāri noteiktos aizsargmehānismus. Gadījumā ar limitēta skābekļa apstākļos kultivētiem raugiem šādu evolucionāri izstrādātu aizsargmehānismu nav, jo dabiskaji apkārtējā vidē raugi dzīvo tikai aerobos apstākļos, kas pakļauti periodiskiem dehidratācijas-rehidratācijas cikliem. Pamatojoties uz šīm atziņām, nākamajos eksperimentos veica mēģinājumu dabiski paaugstināt šūnās aizsargsavienojumu daudzumu. Vispirms tika izvēlēta trehaloze, balstoties uz tās zināmajām aizsargreakcijām attiecībā uz membrānām un proteīniem. Agrāk veiktie pētījumi parādīja, ka neliela daudzuma trehalozes pievienošana kultivēšanas videi nedod ievērojamu šūnu rezistenci pret dehidratāciju. Trehalozes daudzuma noteikšana šūnās parādīja, ka augšanas procesā to vairāk uzkrāj limitēta skābekļa apstākļos augušie raugi, nekā raugi, kas auguši aerobos apstākļos, bet tomēr pret dehidratāciju tie izrādījās neizturīgi. Jau agrāk parādīts, ka arī, neskatoties uz nepieciešamā trehalozes daudzuma klātbūtni raugu šūnās, tās var būt nenoturīgas pret dehidratāciju, ja tām nav vai ir bojāts trehalozes pārneses proteīns, kas nepieciešams, lai nodrošinātu citoplazmatiskās membrānas ārējo daļu (Eleutherio *et al.*, 1993). Šajā gadījumā pozitīvu efektu ieguva šūnas pirms atūdeņošanas inkubējot vidē, kas satur trehalozi. Mēs atkārtojām tādu pašu eksperimentu ar raugiem, kas kultivēti limitēta skābekļa apstākļos un arī ieguvām pozitīvu efektu, kurš parādījās veicot lēno rehidratāciju ūdens tvaikos. Šis eksperiments parādīja iespēju kā sasniegt anhidrobiozes stāvokli arī tām šūnām, kas kultivētas limitēta skābekļa apstākļos, un tas ir liels solis uz priekšu anhidrobiozes pētījumos. Vienlaicīgi šis iegūtais rezultāts apstiprināja mūsu minējumus par citoplazmatiskās membrānas izteikti zemāku rezistenci raugiem, kas kultivēti limitēta skābekļa apstākļos, salīdzinot ar aerobiem raugiem. Šādas membrānas atjaunošanai līdz normālai struktūrai un tās molekulārajai organizācijai

nepieciešama gan aizsargsavienojumu klātbūtne (šajā gadījumā trehaloze) gan arī atjaunošanai nepieciešama saistītā (vai struktūru veidojošā) ūdens tvaiki vēl līdz rehidratācijas procesa sākumam, jau daļēji rehidratētas šūnas ievietojot ūdenī. Tā kā šajā gadījumā trehalozes efekts nebija pārāk liels un izdzīvotības līmenis pēc dehidratācijas sasniedza tikai 30%, tika nolemts nākamajos eksperimentos pamēģināt limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu inkubāciju citos aizsargsavienojumos, tai skaitā poliolos. Veiktie eksperimenti neuzrādīja pozitīvu efektu šūnas inkubējot mannīta un sorbīta šķīdumos, savukārt pirmoreiz tika noskaidrots, ka izteiktu pozitīvu efektīvu uzrāda inkubācija ksilīta un glicerīna šķīdumos. Šie eksperimenti parādīja, ka iespējams sasniegt pietiekami augstu izdzīvotību atūdeņotiem raugiem, kas izaudzēti limitēta skābekļa apstākļos, kas nozīmē arī šādu raugu rūpnieciskas ražošanas teorētisku iespējamību. Katrā ziņā, ļoti interesanti būtu nākotnē noskaidrot līdzīgo savienojumu-poliolu atšķirīgo iedarbības efektu uz šūnām. Tomēr vēl svarīgāk būtu saprast raugu rezistences paaugstināšanas mehānismus pēc to pakļaušanas ksilīta un glicerīna šķīdumiem ar paaugstinātu osmotisko spiedienu. Veiktie pētījumi ar skenējošās elektronu mikroskopijas izmantošanu neuzrādīja kādas izteiktas atšķirības starp aerobiem raugiem un raugiem, kas kultivēti limitēta skābekļa apstākļos, izņemot to, ka pēdējiem tika novērota gludāka virsmas struktūra. Tajā pat laikā atomspēku mikroskopijas dati parādīja, ka to sienīgas stingrība ir zemāka nekā aerobiem raugiem un pie tam tā arī nedaudz papildus samazinās šūnu dehidratācijas procesā. Taču atūdeņotiem raugiem, kas pakļauti priekšapstrādei ar ksilīta un glicerīna šķīdumiem, šis šūnu sienīgas stingrības rādītājs palielinās. Pie kam tas izrādās praktiski vienāds gan pēc ksilīta gan glicerīna iedarbības. Tādējādi, vismaz viena atšķirība no izturīgām un neizturīgām pret dehidratāciju raugu šūnām, var būt saistīta ar šūnu sienīgas stingrību. Tas ir ļoti interesants secinājums, kas labi korelē ar datiem, kas nesen iegūti Šūnu bioloģijas laboratorijā pētot aerobos raugus (Borovikova *et al.*, 2016). Šie dati parādīja, ka šūnu bojāeju žāvēšanas procesā var izraisīt šūnu sienīgas noteiktu proteīnu (mannoproteīni) bojājumi. Sakarā ar to mēs pieņemam, ka šūnu sienīgas ķīmiskais sastāvs un struktūra var izrādīties viens no ļoti svarīgajiem faktoriem šūnu noturībai pret dehidratāciju. Tādējādi varam izdarīt slēdzienu, ka šūnu sienīgas funkcionālā loma pie ekstremālām iedarbībām uz šūnu nav tikusi līdz galam novērtēta un šis pētījumu virziens ir ļoti perspektīvs tālākai mehānismu noskaidrošanai eukariotisko šūnu pārejā uz anhidrobiozes stāvokli. Šī darba turpinājumā, lai noskaidrotu iespējamās atšķirības šūnas ķīmiskajā sastāvā, kuras atšķiras pēc rezistences pret dehidratāciju, izmantoja FTIR analīzi. Novēroja ļoti ievērojamu atšķirību kopīgajā nukleīnskābju, proteīnu, ogļhidrātu un lipīdu sastāvā gan salīdzinot raugus, kas izaudzēti apstākļos ar dažādu skābekļa pieejamību, gan salīdzinot natīvas gan atūdeņotas šūnas. Īpaši jāvērs uzmanība uz būtisku faktu par daudz zemāku lipīdu

daudzumu tādās natīvajās šūnās, kas audzētas limitēta skābekļa apstākļos, tās salīdzinot ar aerobos apstākļos kultivētajām šūnām. Interesanti ir arī dati par proteīna daudzuma samazināšanos dehidratējot šos raugus, kas ļauj izteikt pieņēmumu, ka dehidratācijas laikā šajos raugos notiek ievērojama proteīnu sabrukšana, kas var būt viens no faktoriem, kas ietekmē raugu rezistenci pret žāvēšanu. Savukārt, rezistences paaugstināšanos sākotnēji pret dehidratāciju neizturīgām šūnām pēc to apstrādes ar paaugstināta osmotiskā spiediena ksilīta un glicerīna šķīdumiem pavadīja visai ievērojamas raugu šūnu ķīmiskā sastāva izmaiņas. Pie kam kopīgais visu pētāmo savienojumu grupu (lipīdi, ogļhidrāti, proteīni un nukleīnskābes) saturs pietuvojās daudzumam, kas novērojams pret žāvēšanu rezistentos aerobos raugos. Tādējādi var izteikt slēdzienu par pozitīvas korelācijas esamību starp raugu šūnu ķīmisko sastāvu un to rezistenci pret dehidratāciju. Veiktie eksperimenti arī neuzrādīja aizsargājošu efektu inkubējot pret žāvēšanu jutīgas šūnas antioksidantu – glutaciona un prolīna – šķīdumos, kas uzrādīja pozitīvu efektu aerobu šūnu gadījumā. Tas ļauj izteikt minējumu, ka oksidatīvais stress, limitēta skābekļa apstākļos augušu šūnu gadījumā, nav galvenais iemesls to nenoturībai pret žāvēšanu. Ļoti svarīgu secinājumu var iegūt, ja veic vēl kāda nozīmīga šūnu aizsargmehānisma - karstuma šoka proteīnu Hsp70 analīzi. Pret dehidratāciju izteikti rezistentie raugi *S. cerevisiae* 77 atšķirībā no mēreni rezistentajiem raugiem *S. cerevisiae* 14 arī kultūras stacionārajā augšanas fāzē satur karstuma šoka proteīnus Hsp70. Papildus tam, raugu *S. cerevisiae* 14 izturības paaugstināšanos pret dehidratāciju pēc to priekšapstrādes ar ksilīta un glicerīna šķīdumiem arī pavada diezgan liela karstuma šoka proteīnu Hsp70 daudzuma sintēze. Tas nozīmē, ka rezistence dehidratācijas procesā var būt saistīta ar šo proteīnu klātbūtni šūnās. Tādējādi veiktajos eksperimentos pirmoreiz tika atklāta iespēja sasniegt anhidrobiozes stāvokli raugiem, kas izaudzēti limitēta skābekļa apstākļos, tāpat noskaidrota iespējamā šūnas sienas stabilitātes un karstuma šoka proteīnu Hsp70 klātbūtnes un sintēzes nozīme, kā arī parādīta korelācija starp šūnu ķīmisko sastāvu (lipīdi, ogļhidrāti, proteīni, nukleīnskābes) un to noturību dehidratācijas procesā. Visi šie iegūtie dati nepārprotami atvērš jaunas iespējas tālākajos raugu anhidrobiozes mehānismu pētījumos.

3.2. Biotehnoloģijai svarīgo mikroorganismu celmu metabolisma aktivācija

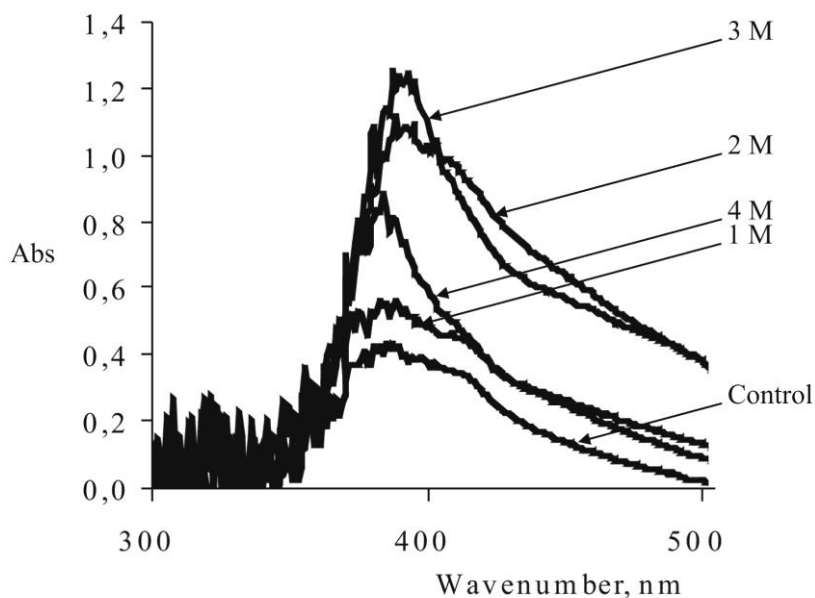
Kā jau tika parādīts šajā darbā un arī agrākajos Šūnu bioloģijas laboratorijas pētījumos, raugu šūnu dehidratācija ir saistīta ar dažādām iekššūnu izmaiņām molekulārā, strukturālā un šūnu līmenī. Pārbaudot vai raugu žāvēšana nesamazina šūnu fizioloģisko aktivitāti pēc tās reaktivācijas no anhidrobiozes stavokļa, novērots, ka dažos gadījumos tā var pat tikt paaugstināta. Tā tika parādīts, ka izmantojot sauso raugu kā inokulumu, var palielināt amilolītisko enzīmu sintēzi, kā arī biomasas pieaugumu (Rapoport *et al.*, 1986; Rapoport *et al.*, 1997). Tika izvirzīta hipotēze, ka žāvēšanas laikā šūnās notiek „snaudošo” gēnu aktivācija, kuras rezultātā ieslēdzas šūnu aizsargreakciju komplekss, kā arī citi metaboliskie procesi. Šis efekts tika nosaukts par „fizioloģisko inženieriju”. Mūsu darbā nolemts pārbaudīt vai līdzīga metabolisko procesu aktivācija var notikt arī bakteriālo šūnu žāvēšanas rezultātā un vai tas var tikt izmantojams biotehnoloģiskos nolūkos.

3.2.1. Metabolisma aktivācija izmantojot inkubāciju šķīdumā ar paaugstinātu osmotisko spiedienu

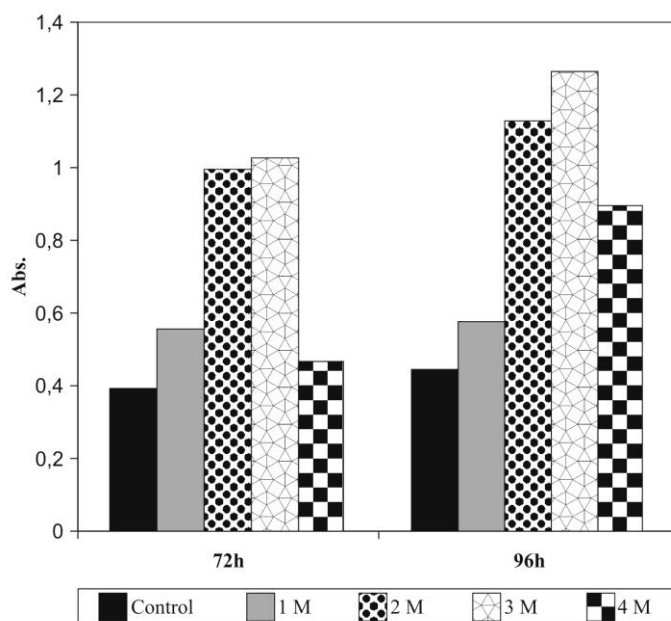
Mūsu darbā meklējām iespēju, lai paaugstinātu baktērijas *Pseudomonas aurantiaca*, kas ir biopesticīdu ražotāja, biotehnoloģijai nozīmīgo aktivitāti. Pirmajā šī darba etapā pārbaudījām vai šī aktivācija var notikt jau agrajā žāvēšanas stadijā, kuru var imitēt ar šūnu inkubāciju šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu. Iepriekš tika minēts, ka NaCl šķīdumu ar paaugstinātu osmotisko spiedienu izmantošana palielināja aerobo raugu *Saccharomyces cerevisiae* 14 rezistenci pret dehidratāciju. Tādējādi tika nolemts pamēģināt izmantot sāls šķīdumus, lai noskaidrotu vai tas var paaugstināt baktērijas *Pseudomonas aurantiaca* biotehnoloģiski svarīgo aktivitāti – biopesticīdu biosintēzi. Tas, ka sāls ir drošs, plaši pieejams un lēts savienojums, ir svarīgi, jo pozitīvu rezultātu gadījumā NaCl apstrādi var rekomendēt biotehnoloģiskam pielietojumam. Eksperimentos tika izmantotas sāls koncentrācijas no 1M līdz 4M. Kontroles paraugi netika pakļauti sāls iedarbībai. Antifungālā aktivitāte tika novērtēta spektrofotometriski un izmantojot standarta agara difūzijas metodi (bedrīšu metode). 55. attēls parāda tipisku spektrālās analīzes ainu *Ps. aurantiaca* S-1 kultūras barotnes bezšūnu supernatantam – izmaiņas absorbcijas līkņu pīķu augstumos pie 390 – 400 nm, kurš kā pierādīts, parāda šī baktēriju celma antifungālo aktivitāti (Mandryk *et al.*, 2007).

No 56. attēla redzams, ka inokuluma izmantošana, kas pirms tam tika ietekmēts ar NaCl koncentrācijās no 1 – 4M, palielināja 72 vai 96 stundas kultivēto baktēriju kultūras antifungālo aktivitāti. Tāpat redzams, ka NaCl koncentrācijas no 1M līdz 3M noteikti rada

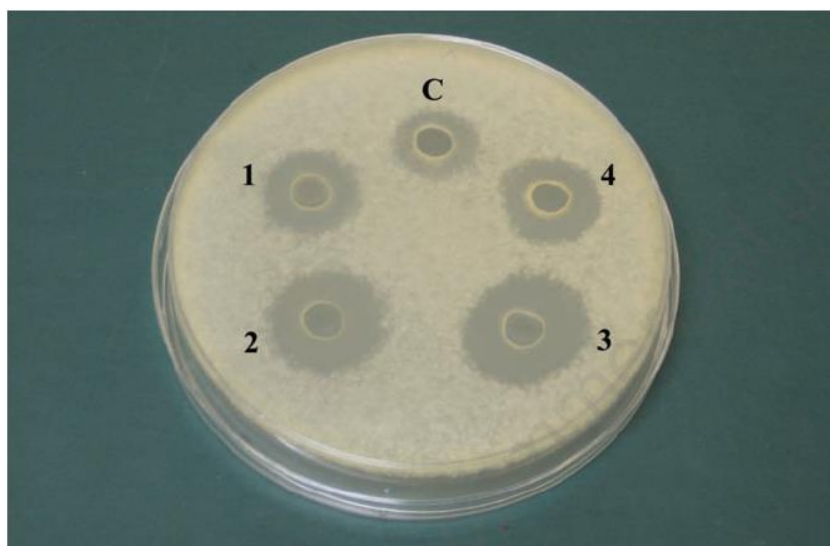
apstrādes efektu. Visaugstākā antifungālā aktivitāte - līdz 3,25 reizu pieaugums salīdzinot ar kontroli, sasniegta pēc 96 stundu kultivēšanas, ja inokulums iepriekš apstrādāts 3M NaCl šķīdumā. Lai pārbaudītu iegūtos rezultātus, izmantota arī agara difūzijas metode. Klasisks eksperimentu rezultāts parādīts 57. attēlā. Abu minēto metožu salīdzinājums atainots Tabulā 2., kas norāda uz iegūto rezultātu savietojamību.



55.attēls. Spektrālās analīzes aina *Ps. aurantiaca* kultivēšanas vides bezšūnu supernatantam, kas iegūts šūnas kultivējot jaunā barotnē pēc to inkubācijas sāls šķīdumos ar atšķirīgu koncentrāciju (1 – 4M)



56.attēls. Bezšūnu supernatantu absorbcija pie 400 nm baktērijām *Ps. aurantiaca*, kas kultivētas jaunā barotnē 72 – 96 stundas pēc apstrādes ar nātrija hlorīdu (1M-4M)



57.attēls. Bezšūnu supernatanta, kas iegūts no *Ps. aurantiaca*, pēc apstrādes ar NaCl šķīdumiem (1 M- 4 M) un audzēšanas jaunā barotnē 96 stundas, antifungālā aktivitāte pret sēni *F. oxysporum*. 1 – 1 M, 2 - 2 M, 3 - 3 M, 4 - 4 M, C - kontrole

Tabula 2. Antifungālās aktivitātes rezultātu salīdzinājums *Ps. aurantiaca*, kas audzētas 96 stundas, bezšūnu supernatantam pēc spektrālās un agara difūzijas metodes

Paraugs	Spektrālā metode		Agara difūzijas metode	
	Absorbcija pie 400 nm	Absorbcijas pieaugums salīdzinot ar kontroli, (reizes)	Sēņu augšanas inhibīcijas zona, (cm)	Inhibīcijas zonas pieaugums salīdzinot ar kontroli, (reizes)
Kontrole	0,4	-	0,30	-
1M NaCl	0,5	1,25	0,4	1,43
2M NaCl	1,1	2,75	0,65	2,16
3M NaCl	1,3	3,25	0,82	2,73
4M NaCl	0,8	2	0,61	2

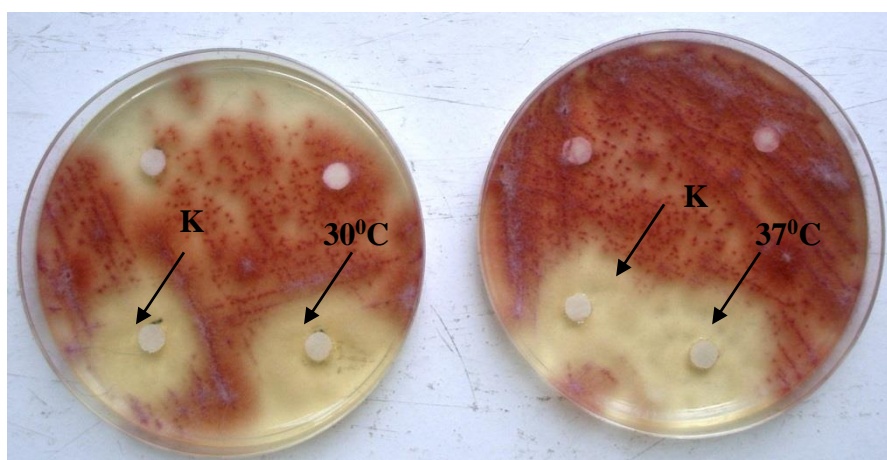
Tādējādi mūsu pētījumi parādīja ievērojamu metabolisma aktivāciju *Ps. aurantiaca* kultūrai, kas tika lietota kā inokulums antifungālo savienojumu producēšanai. Metabolisma aktivācija ir saistīta ar NaCl koncentrācijas paaugstināšanos un attiecīgi osmotiskā spiediena pieaugumu šķīdumā. Ka jau bija minēts, šie apstākļi nodrošina dehidratācijas sākšanos mikroorganismu šūnās, kas nenoved šūnas līdz pilnīgai metabolisma izslēgšanai (anhidrobioze), bet ietekmē intracelulāro metabolismu, aktivējot dažādas aizsargreakcijas, kas virzītas uz šūnu dzīvotspējas saglabāšanu, kā arī šajos apstākļos notiek citas metabolisma izmaiņas, kuras var radīt fizioloģiskās aktivitātes paaugstināšanos.

3.2.2. Metabolisma aktivācija izmantojot dehidratāciju gaisā

Nākamā eksperimentu sērija saistīta ar šūnu aktivitātes pārbaudi tās žāvējot termostatā. Noskaidrojās, ka žāvēšana 45 °C temperatūrā izraisa šūnu pilnīgu bojā eju, tāpēc turpmākajos eksperimentos dehidratācijai izmantoja zemākas temperatūras: 30 °C un 37 °C. Atūdeņotās baktērijas izmantoja sējmateriāla pagatavošanai un no šāda inokulma izaudzētās jaunās kultūras antimikrobiālo aktivitāti salīdzināja ar kontroles kultūras rādītājiem. Kontroles kultūra tika audzēta analogos kultivēšanas apstākļos līdz 96 stundām, tikai par inokulmu tika izmantota intakta, atūdeņošanai nepakļauta biomasa. Eksperimentos izdevās panākt paaugstinātu fizioloģisko aktivitāti (pretsēņu aktivitāte) šūnām pēc atūdeņošanas procesa, to nosakot spektrofotometriski (Tabula 3), kā arī izmantojot agara difūzijas metodi (disku metode) (58. att.).

Tabula 3. Antifungālās aktivitātes rezultātu salīdzinājums *Ps. aurantiaca*, kas audzētas 96 stundas, bezšūnu supernatantam pēc spektrālās metodes

Paraugs	Spektrālā metode	
	Absorbcija pie 400 nm	Absorbcijas pieaugums salīdzinot ar kontroli, (reizes)
Kontrole	0,5	-
Žāvēts 30 °C	1	2,0
Žāvēts 37 °C	1,1	2,2
Žāvēts 30 °C un uzglabāts	0,9	1,8
Žāvēts 37 °C un uzglabāts	1,0	2,0



58.attēls. Bezšūnu supernatanta, kas iegūts no *Ps. aurantiaca*, pēc dehidratācijas un audzēšanas jaunā barotnē 96 stundas, antifungālā aktivitāte

Kā redzams pēc iegūtajiem rezultātiem, ir novērojams baktēriju antifungālās aktivitātes pieaugums pēc šūnu dehidratācijas līdz pat 2,2 reizēm salīdzinot ar kontroli, un tas būtu vidēji pielīdzināms šūnu priekšapstrādei ar 3M NaCl šķīdumu (Tabula 2).

Izmantojot dehidratāciju iegūtās, fizioloģiski aktīvās kultūras tika pārnestas uz jaunām barotnēm un uzglabātas pie pazeminātas temperatūras (4 °C). Tika veikta vēl viena eksperimentu sērija, lai noskaidrotu uzglabāšanas ietekmi uz kultūru antifungālo aktivitāti, tādējādi, pēc uzglabāšanas, šos celmus atkal izmantoja kā inokulmu. Salīdzinot svaigi izaudzēto kultūru antifungālo aktivitāti, noskaidrojās, ka genoma aktivācijas efekts saglabājas neskatoties uz ilgstošu jauno celmu variantu uzglabāšanas (3 mēneši) pie pazeminātas temperatūras (Tabula 3).

3.2.3. Metabolisma aktivācija izmantojot saharozi un trehalozi un baktēriju dehidratāciju

Šajā pētījumā tika pārbaudīta baktēriju antifungālā aktivitāte, pirms žāvēšanas šūnu videi pievienojot aizsargsavienojumus - saharozi un trehalozi, kas zināmi kā šūnu osmolīti. Pirmajā eksperimentu grupā šūnas inkubēja 3 stundas 0,5 M saharozes šķīdumā. Atūdeņotās baktērijas izmantoja sējmateriāla pagatavošanai un no šāda inokuluma izaudzētās jaunās kultūras aktivitāti salīdzināja ar kontroles kultūras rādītājiem. Otrajā eksperimentu grupā baktērijas tika audzētas barotnē, tai pievienojot 100 mM trehalozes. Pēc kultivēšanas biomasa tika izžāvēta un tika noteikta tās antifungālā aktivitāte. Iegūtie rezultāti parādīti Tabula 4.

Tabula 4. Antifungālās aktivitātes rezultātu salīdzinājums *Ps.aurantiaca*, kas audzētas 96 stundas, bezšūnu supernatantam pēc agara difūzijas metodes

Paraugs	Agara difūzijas metode	
	Sēņu augšanas inhibīcijas zona, (cm)	Inhibīcijas zonas pieaugums salīdzinot ar kontroli, (reizes)
Kontrole	0,4	-
Žāvēts 30 °C	0,9	2,25
Inkubēts 0,5M saharozes šķīdumā un žāvēts 30 °C	0,8	2
Ar trehalozi kultivēta kontrole	0,6	1,5
Ar trehalozi kultivēts un žāvēts 30 °C	0,8	2

Kā redzams pēc iegūtajiem rezultātiem, vislielāko ietekmi uz baktēriju antifungālo aktivitāti atstāj šūnu dehidratācija. Pēc šūnu inkubācijas saharozes šķīdumā un audzēšanas barotnē ar pievienotu trehalozi, arī tika novērots antifungālās aktivitātes pieaugums, taču tas var tikt saistīts ar dehidratācijas ietekmi uz antifungālo aktivitāti kopumā, nevis atsevišķa savienojuma iedarbību. Tādējādi iegūtie rezultāti liecina par iespēju izmantot dehidratācijas stresu šūnu *Ps. aurantiaca* metabolisma aktivācijai. Mēs pieņemam, ka rezultātos parādītais efekts arī var būt viens no fizioloģiskās inženierijas paņēmieniem un var tikt efektīvi izmantots biopesticīdu ražošanai izmantojot *Ps. aurantiaca* mikroorganismus.

3.2.4. Kopsavilkums par biotehnoloģijai svarīgo mikroorganismu celmu metabolisma aktivāciju

Veiktie pētījumi apstiprināja iespēju prognozēt nākotnes tendences iegūto rezultātu un secinājumu novērtēšanā, kas apkopoti pētot gan eikariotiskās raugu šūnas gan prokariotiskās baktērijas. Atkārtoti tika apstiprināta “fizioloģiskās inženierijas” ideja – “snaudošo” gēnu aktivācijai fizioloģisko stresu rezultātā, pret kuriem mikroorganismi ir izstrādājuši specifiskas aizsardzības un adaptācijas reakcijas ilgstošā evolūcijas periodā. Tāpat nepieciešams atzīmēt, ka šajā darbā izmantotā metodika atšķiras no agrāk Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā izmantotās baktēriju – *Zymomonas mobilis* produktivitātes paaugstināšanas metodes, par cik tajā gadījumā tika izmantota sāls pievienošana baktēriju kultivēšanas barotnē (Bekers *et al.*, 2000; Vigants *et al.*, 1996, 1998). Tā tika sasniegta baktēriju metabolisma regulācija konkrētas fermentācijas laikā. Pie tam izmantotās sāls koncentrācijas bija daudz zemākas (līdz 0,6 M) salīdzinot ar mūsu izmantotajām (1 – 4M). Kā parādīja eksperimenti, mūsu gadījumā tika sasniegta noturīga gramnegatīvo baktēriju *Ps. aurantiaca* biotehnoloģisko raksturlielumu uzlabošanās, kas saglabājās arī tās ilgstoši uzglabājot. Šis darbs tika veikts Latvijas-Baltkrievijas sadarbības projekta ietvaros un Baltkrievijas kolēģiem veiksmīgi izdevās pārnest mūsu izstrādāto metodiku par šāda stresa iedarbību arī uz citām baktērijām - biopesticīdu ražotājām – grampozitīvajām *Bacillus subtilis*, lai tām iegūtu stabilu biotehnoloģisko raksturlielumu uzlabošanos. Tas vēlreiz pierāda, ka mūsu izstrādātā metodika ir universāla un praktiska.

3.3. Atjaunojamo substrātu hidrolīze bioetanola iegūšanai

Kā jau agrāk minēts, mūsu darbs ir veltīts raugu anhidrobiozes izpētei un atklāto likumsakarību izmantošanai dažādos mūsdienīgos biotehnoloģiskos procesos. Darbs aizsākas ar pētījumiem par iespēju iegūt sausus aktīvus preparātus no raugiem, kas izaudzēti limitēta skābekļa apstākļos, un kurus būtu iespējams izmantot klasiskajos biotehnoloģiskajos procesos rūpniecībā, tai skaitā etanola ražošanā. Tāpēc sekojošā darba daļa ir tieši saistīta ar jaunām izstrādēm šajā virzienā.

Bioetanola ražošana šobrīd ir viena no svarīgākajām tehnoloģijām, jo pieaug nepieciešamība lietot alternatīvus enerģijas avotus fosilās degvielas vietā (Wheals *et al.*, 2009; Grad, 2006). Aprēķini parāda, ka etanola globālie ražošanas apjomi pieaugs no 70×10^9 l/gadā 2008.gadā līdz aptuveni 150×10^9 l/gadā 2018.gadā (Alexandratos, 2009). Bioetanola ražošanas tehnoloģijas var būt it sevišķi pievilcīgas, ja balstās uz lētu, atjaunojamo resursu izmantošanu, kurus nevar izmantot pārtikā (Escobar *et al.*, 2012; Calinescu *et al.*, 2012). Šajā ziņā perspektīvi resursi ir celulozi un hemicelulozi saturošie augu valsts produkti. Bet vēl izdevīgāk, ja ir iespējams iegūt etanolu no lauksaimniecības un ražošanas atlikumiem. Etanola ražošana no lignocelulozes materiāla un tā izmantošana par benzīna aizstājēju var palīdzēt samazināt vides piesārņojumu un nodrošināt ekonomisko neatkarību (Demirbas, 2005).

Kā zināms, celulozi saturošie augu valsts substrāti satur C_5 un C_6 savienojumus (cukurus). Šobrīd etanolu ražošanā rūpniecības līmenī izmanto C_6 savienojumus. Tādejādi ievērojama daļa izejvielas, kas satur C_5 savienojumus tiek zaudēta. Sakarā ar to pēdējos 40 gadus pasaulē tiek veikti intensīvi pētījumi par iespēju iegūt ģenētiski modificētus raugus, kas efektīvi izmantotu C_5 savienojumus un no tiem ražotu etanolu. Neskatoties uz to, ka laboratorijas apstākļos šis process ir jau diezgan sen realizēts, pārnest to uz rūpniecības apstākļiem neizdodas. 2016.gada vidū masu informācijas līdzekļos parādījās ziņas par šādas rūpnīcas izveidi ASV, tomēr papildus informācija par tur realizēto procesu un tā efektivitāti netiek sniegta.

Tajās ražotnēs, kurās izmanto C_6 savienojumus tiek zaudēta liela daļa materiāla, kas satur C_5 savienojumus. Tajā pat laikā zināms, ka C_5 savienojumus var izmantot dažādu svarīgu tautsaimniecības produktu ieguvei. Viens no šādiem produktiem ir furfurols, kas ir ļoti svarīgs savienojums ķīmiskajai rūpniecībai, tostarp naftas aizstāšanai, kuras pieejamība aizvien straujāk samazinās. Šobrīd globāli vidēji izmanto 3,8 biljonus tonnu naftas un aprēķināts, ka apmēram 70% no visiem naftas krājumiem jau ir iztērēti (Kerr, 1998). Sakarā ar to jau šobrīd furfurols tiek ražots lielos apmēros no celulozi un hemicelulozi saturošiem dabas materiāliem. Tomēr ražojot furfurolu izejmateriāla C_6 savienojumu saturošā daļa tiek

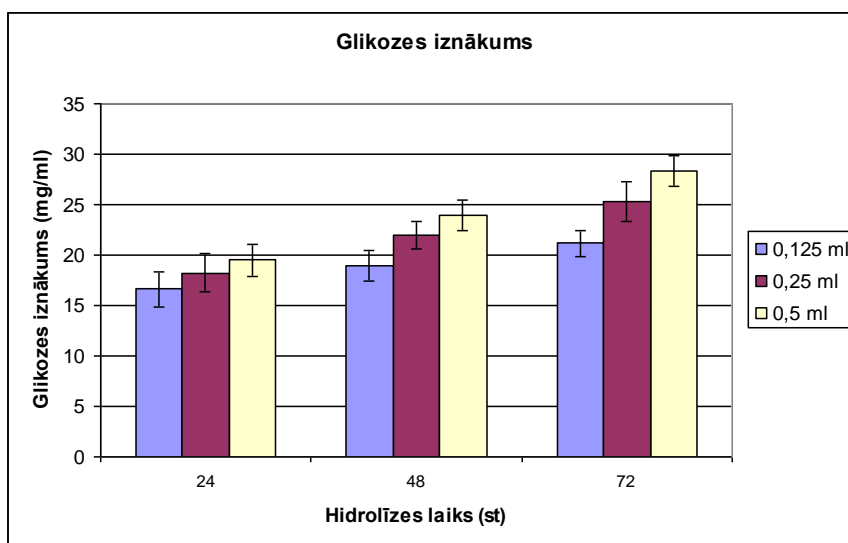
neatgriezeniski bojāta un vairs nevar tikt izmantota tālākai etanola biotehnoloģiskai iegūšanai. Latvijas pētnieki no Koksnes ķīmijas institūta Profesora N.Vedernikova vadībā ir izstrādājuši unikālu procesu furfurola iegūšanai, kura laikā netiek bojāta C₆ savienojuma daļa, kuru tālāk var izmantot etanola biosintēzei (Latvijas Republikas patents Nr. 13676 no 20.07.2008). Šūnu bioloģijas laboratorijā ir uzsākti kopīgi pētījumi ar prof. Vedernikovu, kas virzīti uz bezatlikuma tehnoloģijas izstrādāšanu vienlaicīgi furfurola un etanola iegūšanai no lauksaimniecības atlikumiem.

Viens no mūsu darba virzieniem ir saistīts ar materiāla sagatavošanu pēc tam, kad no tā jau ir iegūts furfurols, un no atlikuma ar klasiskiem mikrobioloģiskiem (biotehnoloģiskiem) procesiem būtu iespējams iegūt etanolu. Tas saistīts ar to, ka līdz etanola fermentācijas etapam, ko veic raugu šūnas vēl ir jāveic vairāki nozīmīgi fermentējamā materiāla apstrādes posmi, kas ietver sevī priekšapstrādi un enzimatisko hidrolīzi. Lignocelulozes biomasu nepieciešams pakļaut dažādām priekšapstrādēm, kas var izmainīt celulozes struktūru, piemēram, palielinot pieejamās virsmas laukumu un tās poru lielumu, tā padarot to pieejamāku enzīmu darbībai (Singh *et al.*, 2011). Mūsu darbā veikti pētījumi, lai noskaidrotu apstākļus, kas nepieciešami lai paaugstinātu enzimatiskās hidrolīzes procesa efektivitāti ar mērķi iegūt maksimālu glikozes daudzumu, kas tālāk tiek lietota etanola mikrobioloģiskai iegūšanai. Mūsu darbā enzimatiskajai hidrolīzei izmantojam komerciālus enzīmus Accellerase 1500 un Accellerase XC, kā arī pārbaudījām papildus iedarbību izmantošanu uz lignocelulozi pirms hidrolīzes, lai uzlabotu procesa tālāku efektivitāti.

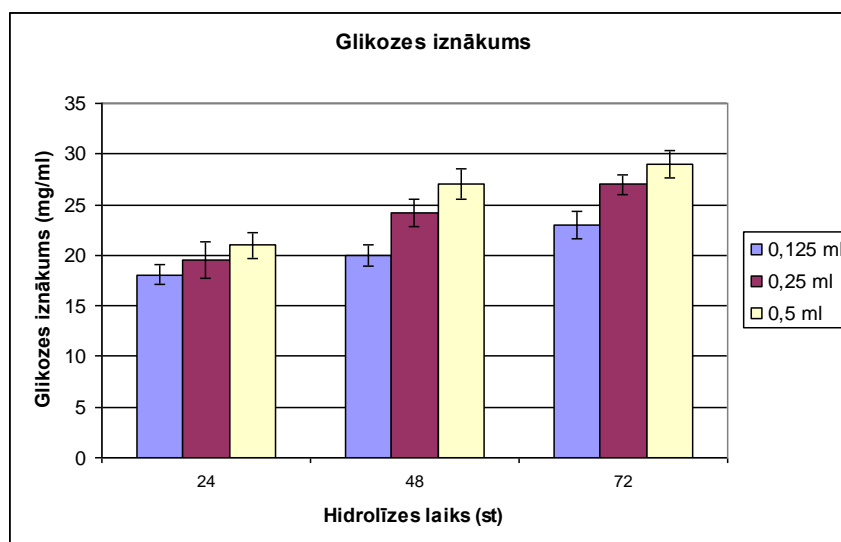
3.3.1. Bērza koksnes enzimatiskā hidrolīze

Pirmajā šī pētījuma eksperimentālajā daļā kā lignocelulozes izejmateriāls tika izmantoti bērza koksnes atlikumi no kokapstrādes rūpniecības. Eksperimentos izmantoti trīs paraugi - Nr.1, Nr.2 un Nr.3. Tika veikti pētījumi, lai, pirmkārt, noskaidrotu enzimatiskās hidrolīzes dinamiku laikā, kā arī glikozes daudzuma atkarību no pievienotā enzīmu daudzuma. Glikozes iznākums paraugos tika noteikts ik pēc 24 stundām, izmantojot HPLC. Eksperimentos tika pielietoti divu veidu komerciālie enzīmi. Kā pamatenzīmu kompleksu izmantoja Accellerase 1500. Šis komplekss satur dažādus enzīmus, tādus kā ekzoglikanāze, endoglikanāze, betaglikozidāze u.c. Kā arī pievienoja papildenzīmu kompleksu - Accellerase XC. To lieto kā enzīmu kompleksu, kas uzlabo glikānu konversiju. Otrkārt, tika pārbaudīta temperatūras ietekme uz hidrolīzes efektivitāti, izmantojot dažādas hidrolīzes temperatūras: 45 °C, 50 °C un 55 °C. 59.attēlā parādīts glikozes iznākums pēc atšķirīga daudzuma pamatenzīma kompleksa izmantošanas, hidrolizējot paraugu Nr.1 45 °C temperatūrā. Tāpat

tika pārbaudīta enzīmu kompleksa Accellerase 1500 un Accellerase XC kopīga iedarbība. Eksperimentos 0,1 ml Accellerase XC pievienots visiem paraugiem ar atšķirīgiem Accellerase 1500 daudzumiem. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 60. attēlā.



59. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 pievienošanas un hidrolīzes 45°C

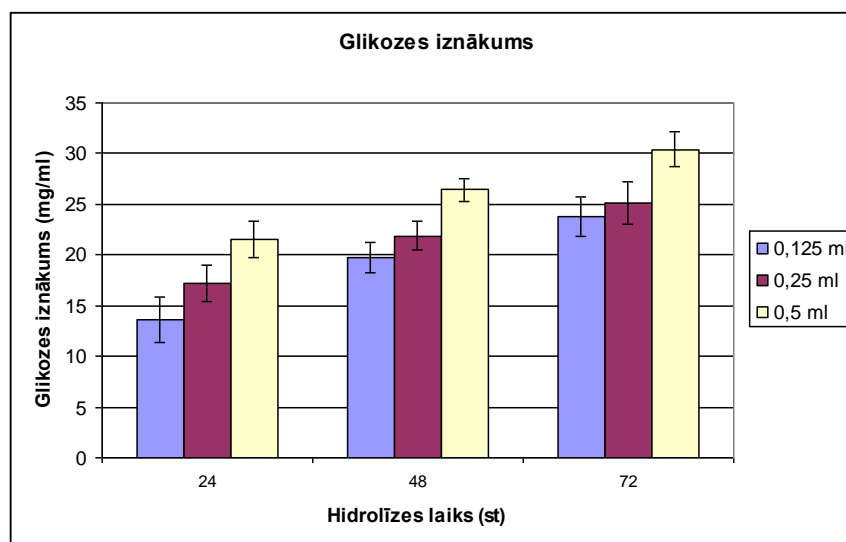


60.attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 un Accellerase XC pievienošanas un hidrolīzes 45°C

Pēc 59.attēlā parādītajiem rezultātiem redzams, ka palielinoties enzimatiskās hidrolīzes laikam, palielinās arī hidrolizētās glikozes daudzums paraugos. Pēc 48 stundu hidrolīzes glikozes daudzuma pieaugums, salīdzinot ar 24 stundu hidrolīzi, ir vidēji 4 mg/ml, bet pēc 72 stundu hidrolīzes – vidēji 6,7 mg/ml. Visos gadījumos maksimālais glikozes daudzums tika sasniegts pēc 72 stundu hidrolīzes. Tāpat noskaidrots, ka glikozes daudzums

paraugos palielinās, palielinot enzīma Accellerase 1500 daudzumu. Lielākais glikozes daudzums visā hidrolīzes laikā tika iegūts lignocelulozes paraugiem pievienojot 0,5 ml enzīma uz 1,2 g substrāta. Pēc 60. attēlā parādītajiem rezultātiem redzams, ka pievienojot 0,1 ml papildenzīma kompleksa, paaugstinās glikozes iznākums, sasniedzot augstāko vērtību pēc 72 stundu hidrolīzes. Pēc 48 stundu hidrolīzes glikozes daudzuma pieaugums, salīdzinot ar 24 stundu hidrolīzi, ir no 2 līdz 6 mg/ml, bet pēc 72 stundu hidrolīzes no 4,9 līdz 7,5 mg/ml. Lielākais glikozes iznākums pievienojot papildenzīmu ir par 0,8 mg/ml augstāks nekā izmantojot tikai pamatenzīmu kompleksu un sastāda vidēji 29 mg/ml.

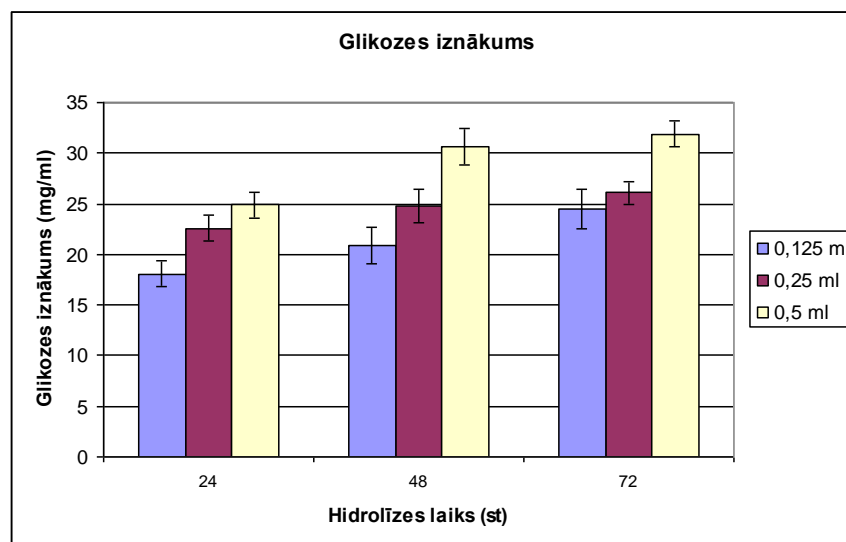
Nākamajos eksperimentos tika pārbaudīta parauga Nr.1 hidrolīzes efektivitāte 50 °C temperatūrā. 61.attēlā parādīts glikozes iznākums pēc pamatenzīma kompleksa izmantošanas.



61. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 pievienošanas un hidrolīzes 50 °C

Kā redzams (61.att.), arī šajā gadījumā palielinoties enzīmātiskās hidrolīzes laikam un pievienotā enzīma daudzumam, palielinās hidrolizētās glikozes daudzums paraugos. Pēc 48 stundu hidrolīzes glikozes daudzuma pieaugums, salīdzinot ar 24 stundu hidrolīzi, ir vidēji 4,8 mg/ml, bet pēc 72 stundu hidrolīzes – vidēji 8,8 mg/ml. Visos gadījumos maksimālais glikozes daudzums tika sasniegts pēc 72 stundu hidrolīzes. Lielākais glikozes daudzums visā hidrolīzes laikā tika iegūts lignocelulozes paraugiem pievienojot 0,5 ml enzīma.

Tālāk tika pārbaudīta enzīmu kompleksa Accellerase 1500 un Accellerase XC kopīga iedarbība. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 62.attēlā.



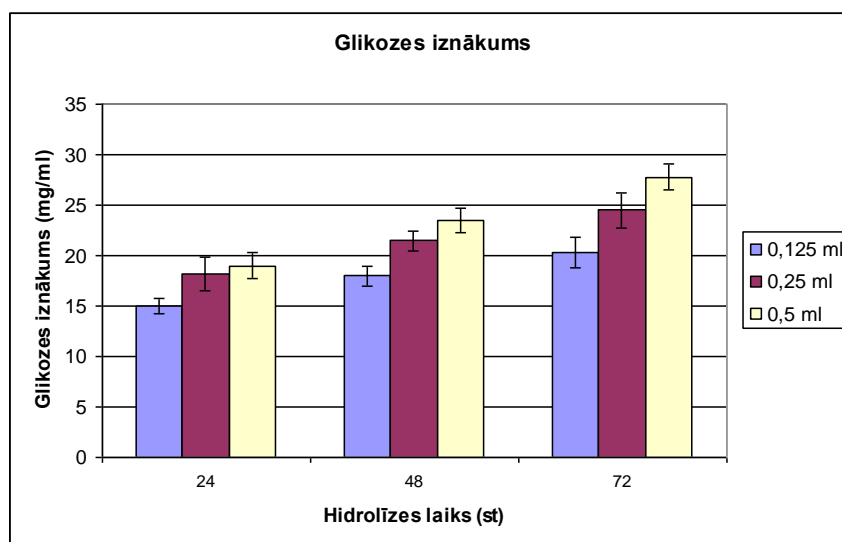
62. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 un Accellerase XC pievienošanas un hidrolīzes 50 °C

Kā redzams (62.att.), pievienojot papildenzīma kompleksu, paaugstinās celulozes konversija un iegūtās glikozes daudzums palielinās jau pēc 24 stundām, sasniedzot lielāko iznākumu pēc 72 stundu hidrolīzes. Maksimālais glikozes daudzums 31,9 mg/ml tiek iegūts lignocelulozes paraugam pievienojot 0,1 ml Accellerase XC un 0,5 ml Accellerase 1500. Tātad var secināt, ka hidrolīzes temperatūras palielināšana no 45 līdz 50 °C paaugstina glikozes iznākumu.

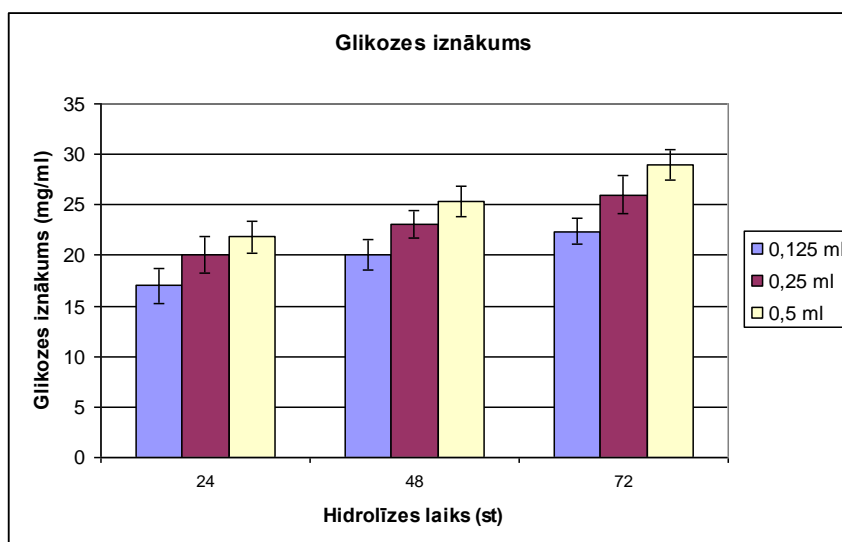
Lai noskaidrotu, vai enzimatiskās hidrolīzes laika palielināšana līdz 96 stundām vēl vairāk paaugstinātu glikozes iznākumu, tika veikti papildus eksperimenti ar hidrolīzes laiku līdz 96 stundām (rezultāti nav attēloti). Rezultāti parādīja, ka iegūtais glikozes daudzums saglabājās 72 stundu hidrolīzes līmenī, tāpēc tālākajos eksperimentos tika nolemts izmantot tikai 72 stundu hidrolīzes laiku.

Nākamajā eksperimentā tika pārbaudīta parauga Nr.1 un 55 °C temperatūras izmantošana hidrolīzes laikā. Pētījumā tika izmantots pamatenzīmu komplekss – 0,125 ml, 0,25 ml un 0,5 ml bez un ar 0,1 ml Accellerase XC pievienošanu (63.att., 64.att.).

Pēc iegūtajiem rezultātiem (63.att.) novērojams, ka paaugstinoties hidrolīzes temperatūrai, hidrolīzes dinamika saglabājas nemainīga. Tomēr redzams, ka maksimālais glikozes iznākums ir mazāks salīdzinot ar paraugu hidrolīzi 45 °C temperatūrā vidēji par 0,5 mg/ml un 50 °C temperatūrā vidēji par 2,6 mg/ml. 64.attēla dati parāda, ka Accellerase XC pievienošana dod hidrolīzes efektivitātes paaugstināšanos par apmēram 0,5 – 2 mg/ml, tomēr tā ir vidēji par 2,9 mg/ml zemāka salīdzinot ar maksimāli iegūto glikozes iznākumu 31,9 mg/ml, izmantojot hidrolīzes temperatūru 50 °C.



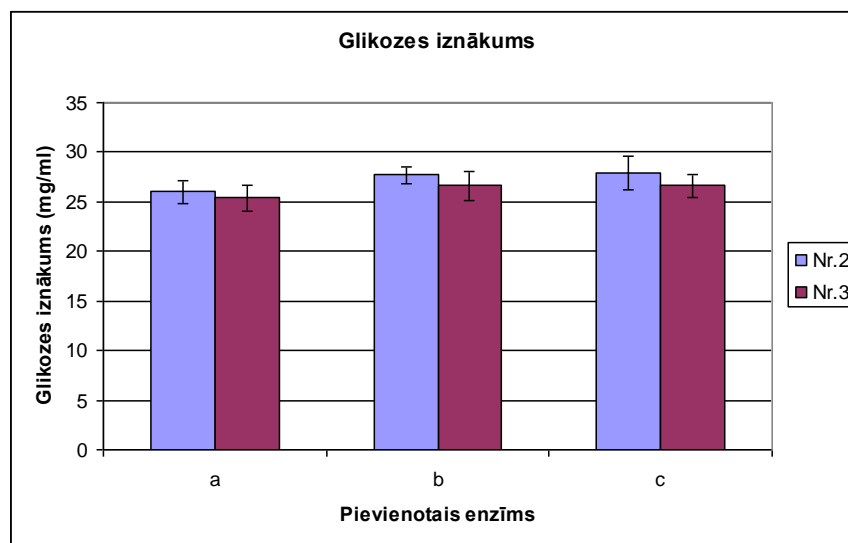
63. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 pievienošanas un hidrolīzes 55 °C



64. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 un Accellerase XC pievienošanas un hidrolīzes 55 °C

Tālāk darbā tika veikti pētījumi, lai noskaidrotu glikozes daudzumu, ko iespējams iegūt enzimatiski hidrolizējot substrātu Nr.2 un Nr.3. Tā kā iepriekšējā eksperimentu sērijā noskaidrojās, ka 72 stundu hidrolīze sniedz vislabākos rezultātus un iespējams iegūt visaugstāko glikozes iznākumu, tika nolemts izmantot minēto hidrolīzes laiku. Tāpat tika izmantota hidrolīzes procesa temperatūra, kas iepriekšējos eksperimentos uzrādīja vislabāko rezultātu t.i. 50 °C. Tika pievienots 0,5 ml enzīma Accellerase 1500, kas iepriekšējos eksperimentos bija uzrādījis vislabāko iznākumu. Tika nolemts arī pārbaudīt vai palielinot

papildenzīma Accellerase XC daudzumu no 0,1 ml līdz 0,25 ml iespējams iegūt augstāku glikozes iznākumu. Iegūtie rezultāti atainoti 65. attēlā.

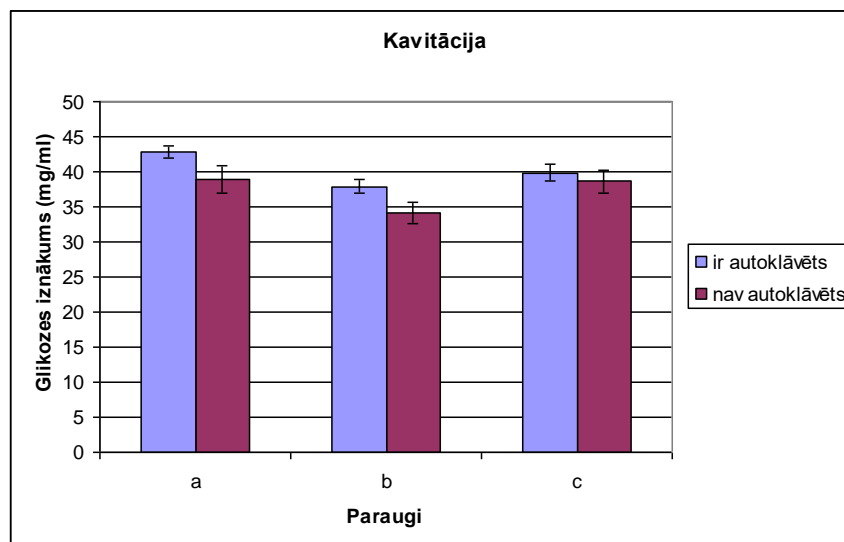


65. attēls. Glikozes iznākums pēc enzīmu kompleksu pievienošanas. Pievienotie enzīmi: a – Accellerase 1500, b – Accellerase 1500 + 0,1 ml Accellerase XC, c - Accellerase 1500 + 0,25 ml Accellerase XC

Kā redzams pēc iegūtajiem datiem, visos gadījumos nav izdevies sasniegt glikozes iznākuma maksimumu, salīdzinot ar paraugu Nr.1. Arī papildenzīma Accellerase XC daudzuma palielināšana nedeļa redzamu uzlabojumu hidrolīzes efektivitātei. Izmantojot substrātu Nr.2 maksimālais glikozes iznākums iegūts 27,9 mg/ml un substrātam Nr.3 – 26,6 mg/ml.

Ievērojama daļa celulozes koksne atrodas kristāliskā stāvoklī, kas ir grūti pieejama enzīmu iedarbībai. Neskatoties uz to, ka priekšapstrādes laikā, kas tiek veikta ar mērķi iegūt furfuroļu, notiek lielas daļas celulozes kristāliskās formas pāreja uz amorfo struktūru, noteikta daļa celulozes tomēr paliek kristāliskā stāvoklī. Sakarā ar to ir nepieciešams pamēģināt atrast veidus, kā pārvērst papildus celulozes daudzumu amorfā formā, uz kuru var iedarboties enzīmi. Tādējādi nākamajā eksperimentu sērijā tika izmantotas vairākas papildus priekšapstrādes pirms hidrolīzes - sārmu apstrāde, kavitācija, autoklāvēšana un žāvēšana. Pētījumi veikti sadarbībā ar Prof. S. Cifanski (RTU Mehānikas institūts). Pirms enzimātiskās hidrolīzes etapa, lignocelulozes paraugs Nr.3 (veikta papildus skalošana) tika apstrādāts izmantojot autoklāvēšanu un sārmu iedarbību (KOH – 10 un 12 (g/l)). Autoklāvēšana veikta 20 minūtes 121 °C temperatūrā. Paraugiem pievienots 0,5 ml Accellerase 1500 un 0,1 ml Accellerase XC. Hidrolīzes laiks 72 stundas un hidrolīzes temperatūra 50 °C. Pēc autoklāvēšanas iegūtais glikozes iznākums sastādīja vidēji 31,1 mg/ml. Sārma pievienošana

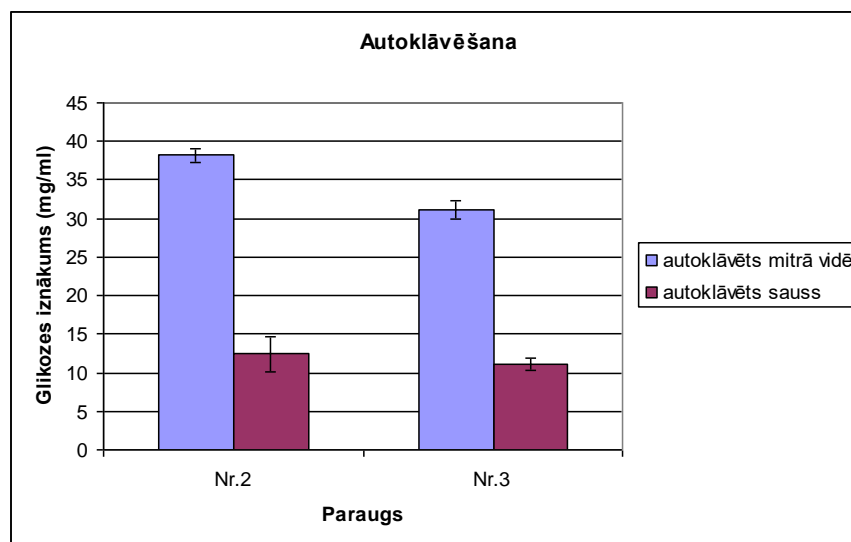
visaugstāko rezultātu deva pie 10 g/l, sasniedzot glikozes iznākumu 38,6 mg/ml. Palielinoties sārma daudzumam rezultāts samazinājās un glikozes iznākums bija 28,6 mg/ml. Tādējādi var secināt, ka gan autoklāvēšana, gan sārma izmantošana palielina glikozes iznākumu pēc sekojošas hidrolīzes. Tālāk tika nolemts pārbaudīt arī kavitācijas papildus iedarbību uz paraugiem. Paraugi tika pakļauti sārma un kavitācijas iedarbībai, kā arī pārbaudīts vai vēl sekojoša autoklāvēšana paaugstina iegūto glikozes iznākumu. Iegūtie rezultāti parādīti 66. attēlā.



66. attēls. Glikozes iznākums pēc kavitācijas iedarbības. Paraugi: a – bez pievienota sārma, b – pievienots sārms 12 g/l, c – pievienots sārms 10 g/l

Kā redzams (66. att.), autoklāvēšanas un kavitācijas iedarbība sniedz ievērojamu glikozes iznākuma pieaugumu, sasniedzot vidēji 42,8 mg/ml. Pēc sārma un kavitācijas iedarbības, glikozes daudzums paaugstinās paraugiem, kam pievienots lielāks sārma daudzums, salīdzinot ar iepriekš iegūtajiem datiem, tomēr kopumā pievienojot mazāk sārma glikozes daudzums ir augstāks. Papildus autoklāvēšana, paaugstina glikozes iznākumu vēl par 1 – 3 mg/ml. Pēc iegūtajiem datiem var secināt, ka kavitācijas apstrāde ietekmē celulozes struktūru, tādējādi to padarot pieejamāku enzīmu darbībai un paaugstinot glikozes iznākumu pēc hidrolīzes. Vēl ievērojamāk rezultātu ietekmē papildus autoklāvēšanas izmantošana.

Tā kā autoklāvētajiem paraugiem tika uzrādīts visaugstākais glikozes iznākums, tika nolemts salīdzināt autoklāvēšanas ietekmi uz paraugiem tos autoklāvējot sausā veidā un mitrā veidā, kā tas tika darīts iepriekš. Eksperimenti veikti lignocelulozes paraugiem Nr.2 un Nr.3. Sekojoša hidrolīze veikta pievienojot paraugiem 0,5 ml Accellerase 1500 un 0,1 ml Accellerase XC. Rezultāti atainoti 67. attēlā. Pēc iegūtajiem datiem redzams, ka autoklāvēšana sausā veidā stipri samazina glikozes iznākumu.



67. attēls. Glikozes iznākums pēc autoklāvēšanas

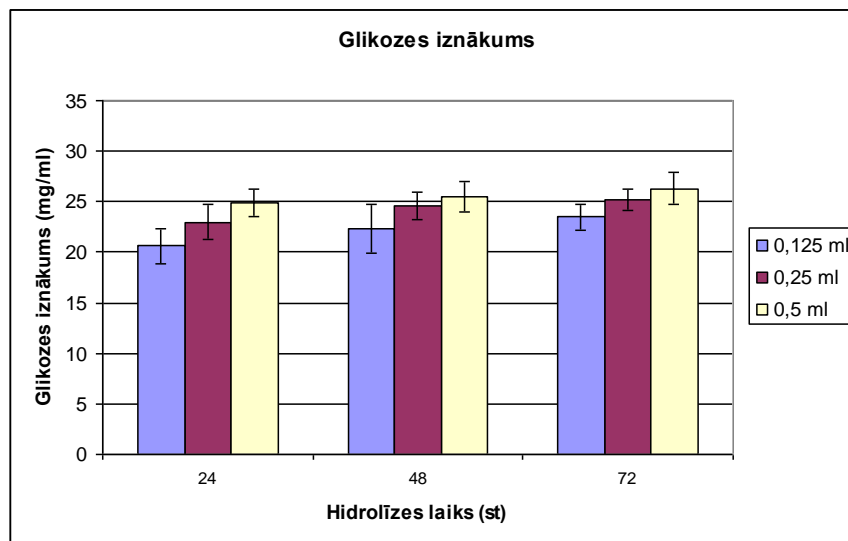
Tādējādi šajā eksperimentu serijā tika parādīts, ka laboratorijas apstākļos, izmantojot komerciālo enzīmu Accellerase 1500 vislabākos hidrolīzes rezultātus var sasniegt 50 °C temperatūrā 72 stundu laikā. Pie tam glikozes iznākuma palielināšanu dod pamatenzīma koncentrācijas palielināšana, papildus enzīma Accellerase XC izmantošana, kā arī papildus iedarbības ar sārmu, kavitāciju un autoklāvēšanu.

3.3.2. Kviešu salmu enzimatiskā hidrolīze

Šajā pētījumā kā hidrolizējamais lignocelulozes materiāls tika izmantoti lauksaimniecības atlikumi - kviešu salmi. Pirmkārt tika pārbaudīta enzimatiskās hidrolīzes temperatūras ietekme uz hidrolīzes efektivitāti, izmantojot hidrolīzes temperatūru 45 °C, 50 °C un 55 °C. Otrkārt tika pārbaudīta pamatenzīma Accellerase 1500 kompleksa iedarbība uz substrātu, kā arī kopīga pamatenzīma kompleksa un papildenzīma Accellerase XC iedarbība. Enzīmu daudzumi izvēlēti pamatojoties uz iepriekš veiktajiem pētījumiem. 68. attēlā parādīts glikozes iznākums, hidrolizējot kviešu salmu substrātu 45 °C temperatūrā un izmantojot hidrolīzei 0,5 ml, 0,25 ml, 0,125 ml un Accellerase 1500. 69. attēlā parādīts glikozes iznākums, izmantojot Accellerase 1500 un 0,1 ml Accellerase XC kopā.

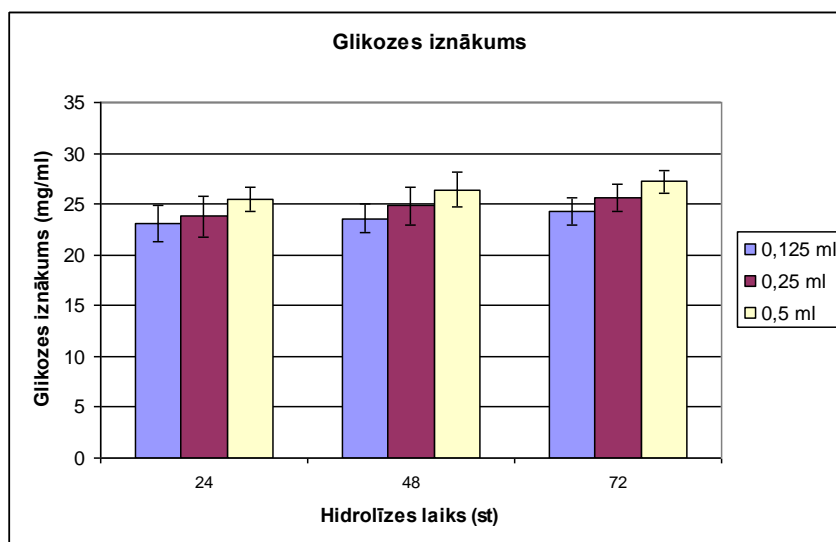
Pēc iegūtajiem rezultātiem (68.att.) redzams, ka palielinoties enzimatiskās hidrolīzes laikam, palielinās arī hidrolizētās glikozes daudzums paraugos. Visos gadījumos maksimālais glikozes daudzums tika sasniegts pēc 72 stundu hidrolīzes. Salīdzinājumā ar koksnes materiāla hidrolīzi, kurā novērojams pakāpenisks glikozes iznākuma pieaugums laikā, hidrolizējot kviešu salmu materiālu, augsts glikozes iznākums sasniedzams jau pēc 24 stundām un tālākais glikozes pieaugums novērojams 0,5 – 0,9 mg/ml robežās. Lielākais

glikozes daudzums visā hidrolīzes laikā tika iegūts lignocelulozes paraugiem pievienojot 0,5 ml enzīma un sastāda vidēji 26,3 mg/ml.



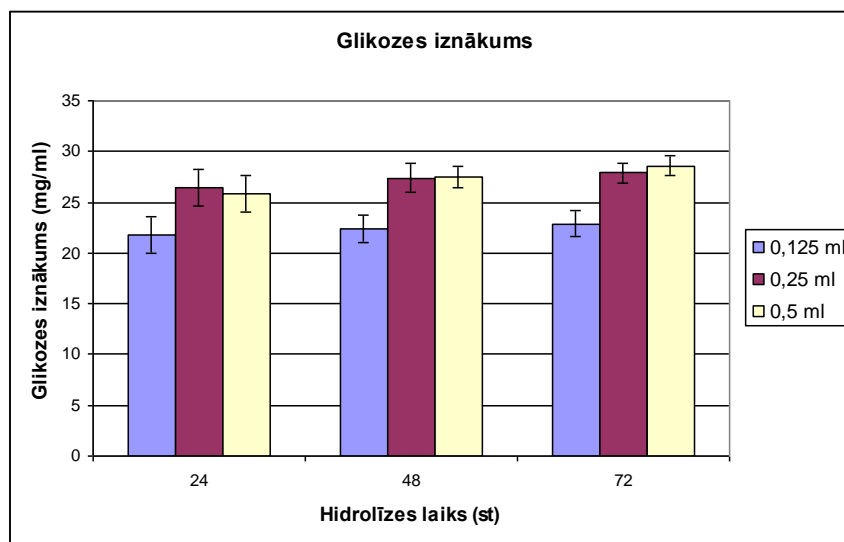
68. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 pievienošanas un hidrolīzes 45°C

Izmantojot pamatenzīmu kompleksu kopā ar papildenzīmu (69.att.) novērojama straujāka hidrolīze paraugiem ar pievienoto zemāko (0,125 ml) pamatenzīmu daudzumu, bet izmantojot 0,25 ml un 0,5 ml hidrolīzes dinamika saglabājas līdzīga. Maksimāli sasniegtais glikozes iznākums ir par 0,8 mg/ml augstāks nekā bez papildenzīma izmantošanas, izmantojot maksimālo pamatenzīma daudzumu un sastāda 27,1 mg/ml.

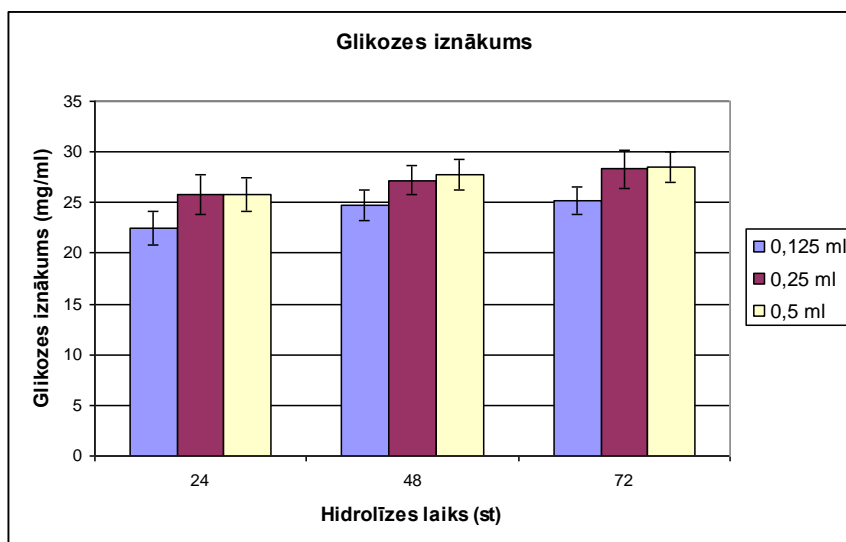


69. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 un Accellerase XC pievienošanas un hidrolīzes 45°C

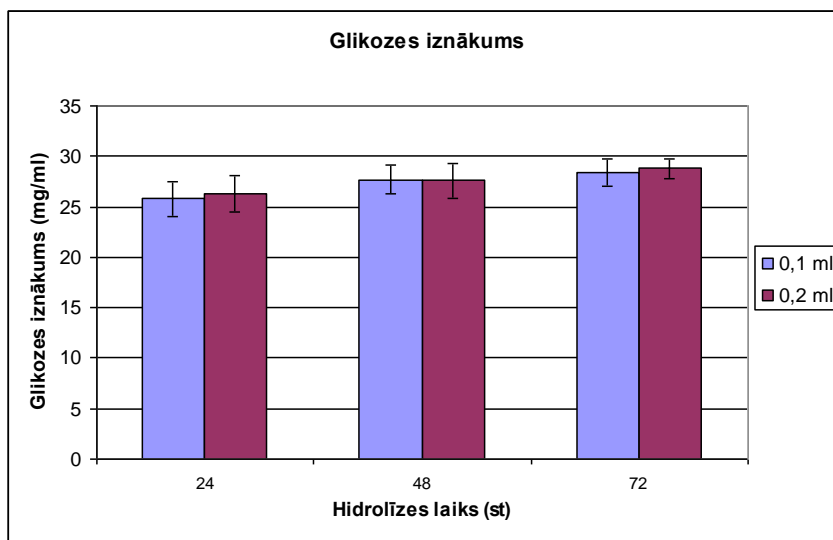
Tālāk tika apskatīta enzimatiskā hidrolīze pie temperatūras 50 °C. 70.attēlā parādīts glikozes iznākums, izmantojot hidrolīzei Accellerase 1500 un 71. attēlā parādīts glikozes iznākums, izmantojot Accellerase 1500 kopā ar 0,1 ml Accellerase XC. Pēc iegūtajiem datiem (70.att.) novērojams, ka pēc 48 stundu hidrolīzes glikozes daudzuma pieaugums, salīdzinot ar 24 stundu hidrolīzi, ir vidēji 1,7 mg/ml, bet pēc 72 stundu hidrolīzes – vidēji 2,76 mg/ml. Novērots, ka salīdzinot ar hidrolīzi 45 °C temperatūrā, šajos eksperimentos cukura koncentrācijas pieaugums ir straujāks un maksimālais glikozes daudzums visā hidrolīzes laikā tika iegūts lignocelulozes paraugiem pēc 72 stundu hidrolīzes pievienojot 0,5 ml vai 0,25 ml Accellerase 1500 un maksimums sastāda vidēji 28,6 mg/ml. Tādējādi noskaidrots, ka 50 °C ir veiksmīgāk izmantojami hidrolīzei, jo iegūtais glikozes daudzums ir par 1,5 mg/ml vairāk nekā pie 45 °C, kā arī labāks rezultāts tiek sasniegts ar mazāku enzīma daudzumu, t.i. 0,25 ml Accellerase 1500. Lielāks un straujāks glikozes daudzuma pieaugums novērojams arī paraugiem, kur izmantots mazākais enzīma daudzums. Izmantojot pamatenzīmu kompleksu kopā ar papildenzīmu (71.att.) nebija iespējams sasniegt augstāku rezultātu kā izmantojot tikai pamatenzīmu kompleksu atsevišķi, tādēļ tika veikts vēl viens eksperiments ar mērķi noskaidrot vai papildenzīma daudzuma palielināšana varētu sniegt papildus glikozes iznākuma uzlabojumu. Lai noskaidrotu tika pievienots 2x vairāk Accellerase XC t.i. 0,2 ml pie paraugiem, kas hidrolizēti pie maksimālā rezultāta ieguvušajiem parametriem – pamatenzīma daudzums - 0,5ml (72.att.).



70. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 pievienošanas un hidrolīzes 50 °C



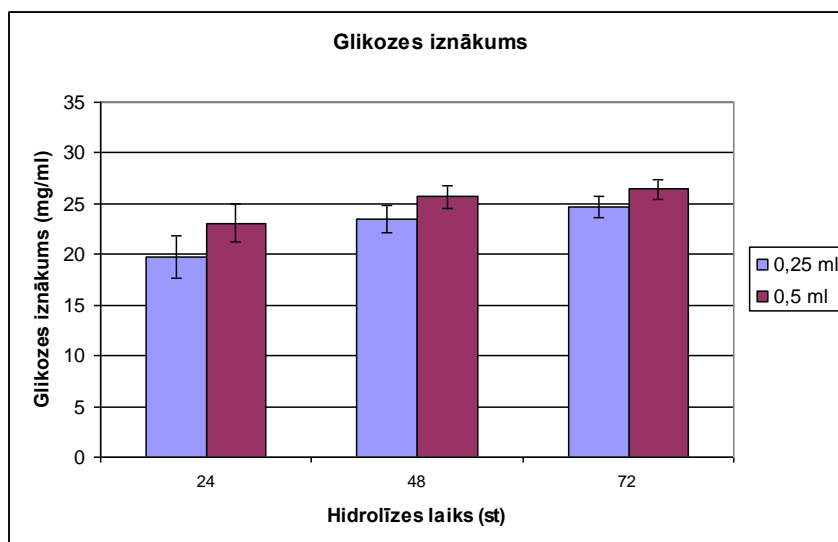
71. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 un Accellerase XC pievienošanas un hidrolīzes 50 °C



72. attēls. Glikozes iznākums pēc papildus Accellerase XC pievienošanas

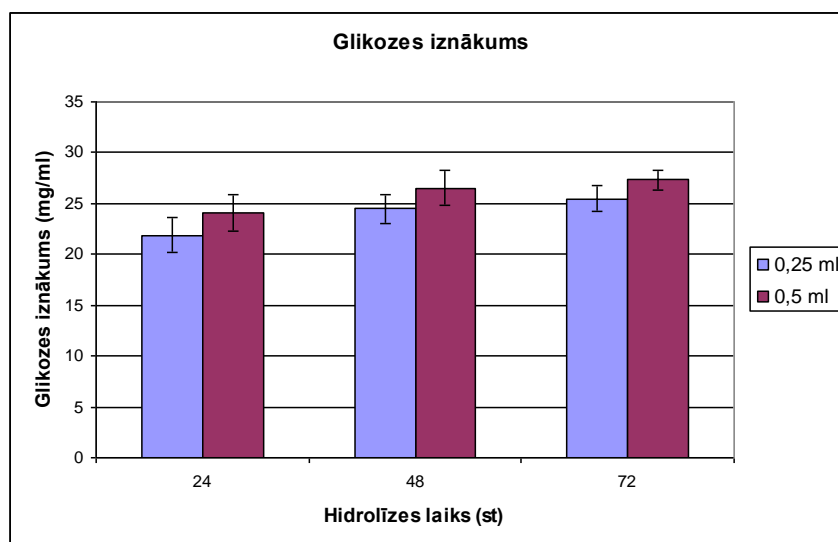
Pēc iegūtajiem rezultātiem (72.att.) noskaidrojās, ka papildenzīma daudzuma palielināšana, nedeva ievērojamu rezultātu hidrolīzes efektivitātes paaugstināšanā.

Nākamie tika veikti eksperimenti ar hidrolīzes temperatūru 55 °C. Tā kā iepriekšējos eksperimentos noskaidrojās, ka labu rezultātu iespējams sasniegt izmantojot arī tikai Accellerase 1500, tad sekojošajā eksperimentu sērijā tika izmantots minētais pamatenzīmu komplekss - 0,25 un 0,5 ml (73.att., 74.att.).



73. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 pievienošanas un hidrolīzes 55 °C

Iegūtie rezultāti parādīja, ka paaugstinot temperatūru uz 55 °C maksimāli iegūtais cukura daudzums bija par vidēji 1,3 mg/ml mazāks nekā pēc 50 °C izmantošanas, bet kopumā līdzīgs rezultātiem pēc temperatūras 45 °C izmantošanas.

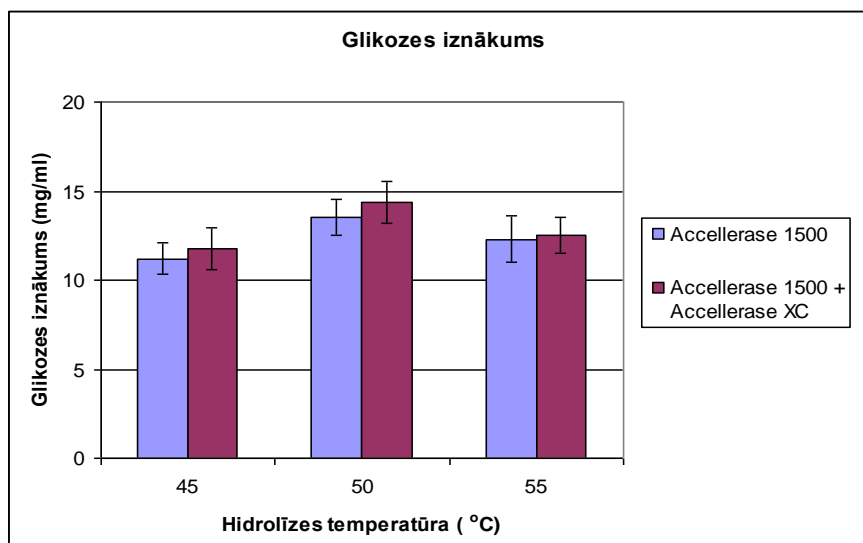


74. attēls. Glikozes iznākums pēc Accellerase 1500 un Accellerase XC pievienošanas un hidrolīzes 55 °C

3.3.3. Rapšu salmu enzimatiskā hidrolīze

2017.gada vasarā tika aizsākta jauna eksperimentu sērija, ar mērķi noskaidrot, vai iespējams priekšapstrādes un tālākā bioetanol ražošanas procesā izmantot lauksaimniecības atlikumus - rapšu salmus. Pētījumā izmantots rapšu salmu materiāls, kas priekšapstrādāts LV

KĶI. Paraugiem izmantots hidrolīzes laiks 72 stundas, kā arī temperatūras 45 °C, 50 °C un 55 °C, pamatenzīma un papildenzīma pievienošana - 0,25 ml un 0,1 ml attiecīgi (75.att.).



75. attēls. Glikozes iznākums pēc hidrolīzes 45 °C, 50 °C un 55 °C

Pēc iegūtajiem rezultātiem var redzēt, ka augstāko glikozes iznākumu sasniedz pie hidrolīzes temperatūras 50 °C, tomēr kopīgais glikozes iznākums pēc hidrolīzes ir zemāks kā gadījumos ar citiem atjaunojamiem substrātiem, kas norāda uz nepieciešamību veikt tālāku priekšapstrādes un hidrolīzes parametru efektivitātes uzlabošanu.

Tādējādi šajos eksperimentos tika parādīts, ka arī izmantojot kviešu un rapša salmus jauna furfurola iegūšanas tehnoloģija dod iespēju izmantot palikušo ligoceļulozes substrātu glikozes iegūšanai enzīmatiskas hidrolīzes rezultātā.

3.3.4. Etanola iegūšana no atjaunojamiem substrātiem

Šis pētījums tika veikts ar mērķi noskaidrot vai iespējams izmantot etanola sintēzei glikozi saturošu hidrolizātu, kas iegūts no koksnes un salmu materiāla pēc furfurola izdalīšanas un tai sekojošas lignocelulozes hidrolīzes. Kā arī tika pārbaudīta iespēja etanola sintēzei izmantot limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu, kas inkubēts ksilitā un glicerīnā un tai sekojošas dehidratācijas. Tabulā 5 parādīti etanola iznākuma rezultāti pēc bērza koksnes hidrolizāta un dehidratēto raugu izmantošanas. Kā redzams pēc iegūtajiem rezultātiem, bērza koksnes hidrolizātu var izmantot kā glikozes avotu etanola sintēzei, kā arī limitēta skābekļa apstākļos kultivēts raugs, kas pakļauts inkubācijai ksilitā un glicerīna šķīdumā pirms šūnu dehidratācijas, paaugstina etanola iznākumu, salīdzinot ar aeroobi kultivētu žāvētu raugu. Vislabākie rezultāti tika novērojami raugu celmam *Saccharomyces cerevisiae* 77, kur

augstākais rezultāts sasniegts pirms dehidratācijas raugu inkubējot ksilitā vai glicerīna šķīdumos.

Tabula 5. Etanola iznākums kā fermentācijas vidi izmantojot bērza koksni

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 14	Etanols (g) /Glikoze (g)	Etanols(g) /Celuloze (g)
Aerobi kultivēts žāvēts	0,46	0,195
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas	0,5	0,212
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas glicerīnā un tai sekojošas žāvēšanas	0,49	0,208
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 77		
Aerobi kultivēts žāvēts	0,49	0,206
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas	0,51	0,219
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas glicerīnā un tai sekojošas žāvēšanas	0,51	0,221

Tabula 6. Etanola iznākums kā fermentācijas vidi izmantojot kviešu salmus

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 14	Etanols (g) /Glikoze (g)	Etanols(g) /Celuloze (g)
Aerobi kultivēts žāvēts	0,42	0,201
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas	0,43	0,205
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas glicerīnā un tai sekojošas žāvēšanas	0,43	0,204
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 77		
Aerobi kultivēts žāvēts	0,43	0,206
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas	0,44	0,211
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas glicerīnā un tai sekojošas žāvēšanas	0,43	0,207

Veikts arī pētījums par kviešu un rapšu salmu hidrolizātu izmantošanu etanola sintēzei. Kā redzams, pēc iegūtajiem rezultātiem ar kviešu salmu hidrolizātu (Tabula 6), etanola iznākuma pieaugumu uzrāda limitēta skābekļa apstākļos kultivēts raugs, kas pakļauts inkubācijai ksilitā pirms šūnu dehidratācijas abiem raugu celmiem. Rapšu salmu hidrolizāta izmantošanas gadījumā (Tabula 7) visi limitēta skābekļa apstākļos kultivēto raugu paraugi uzrāda vienādu etanola pret glikozes attiecību, neatkarīgi no izmantotā raugu celma.

Tabula 7. Etanola iznākums kā fermentācijas vidi izmantojot rapšu salmus

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 14	Etanols (g)/Glikoze (g)	Etanols(g) /Celuloze (g)
Aerobi kultivēts žāvēts	0,48	0,337
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas	0,49	0,340
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas glicerīnā un tai sekojošas žāvēšanas	0,49	0,340
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 77		
Aerobi kultivēts žāvēts	0,49	0,340
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas ksilitā un tai sekojošas žāvēšanas	0,49	0,342
Limitēta skābekļa apstākļos kultivēts pēc inkubācijas glicerīnā un tai sekojošas žāvēšanas	0,49	0,341

Kopumā iegūtie rezultāti parāda iespēju veiksmīgi izmantot bioetanola ražošanas procesā atjaunojamus substrātus glikozi saturošas fermentācijas vides sagatavošanai, kā arī sausus, žāvētus limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu preparātus, kuru etanola sintēzes efektivitāte paaugstinās pēc to inkubācijas ksilitā un glicerīna šķīdumā pirms to dehidratācijas.

3.3.5. Kopsavilkums par atjaunojamo substrātu (lignoceluloze) hidrolīzi bioetanola iegūšanai

Veiktie pētījumi apstiprināja iespēju izmantot atjaunojamus resursus veiksmīgai vienlaicīgai furfurola un celulozes iegūšanai. Celulozes tālāka hidrolīze sekmīgi realizējama izmantojot komerciālos enzīmus, kā arī papildus priekšapstrādes pirms hidrolīzes etapa. Eksperimenti parādīja, ka palielinoties hidrolīzes laikam, paaugstinās glikozes iznākuma

vērtība un sasniedz maksimumu pēc 72 stundu hidrolīzes. Pētījumi rāda, ka ilgāks hidrolīzes laiks līdz 96 stundām vairs nedod glikozes iznākuma pieaugumu. Novērojams arī hidrolīzes iznākuma pieaugums palielinoties pievienotā pamatenzīmu kompleksa daudzumam. Tāpat balstoties uz iegūtajiem rezultātiem var izdarīt secinājumu, ka papildus enzīmu kompleksa Accellerase XC pievienošana paaugstina enzīmātiskās hidrolīzes efektivitāti un palielina glikozes iznākumu. Pētot temperatūras režīmus optimālai enzīmu darbībai, noskaidrots, ka 50 °C izmantošana sniedz visaugstākos glikozes iznākuma rezultātus. Salīdzinot bērzu koksnes un kviešu salmu hidrolīzes dinamiku, noskaidrojās, ka bērzu koksnes hidrolīze norit pakāpeniski, sasniedzot visaugstāko glikozes iznākuma līmeni pēc 72 stundu hidrolīzes. Savukārt kviešu salmu hidrolīzes laikā jau pēc 24 stundām novērojams augsts glikozes iznākums, kas pieaug vidēji par 0,5 – 0,9 mg/ml pēc sekojošas 72 stundu hidrolīzes. Tāpat bija novērojams, ka bērza koksnes paraugos, kuru priekšapstrādei tika izmantota augstāka sērskābes koncentrācija, bija zemāks glikozes iznākums hidrolīzes posmā. Tas saistīts ar faktu, kas izmantojot priekšapstrādē augstāku sērskābes koncentrāciju (50 %) iespējams iegūt lielāku furfurola iznākumu, taču tā rezultātā samazinās pieejamās celulozes daudzums. Tādējādi, lai palielinātu enzīmātiskās hidrolīzes darbības efektivitāti, tika pārbaudītas vairākas papildus apstrādes metodikas, kas parādīja, ka izteikti efektīvu iedarbību uz lignocelulozes materiālu atstāj kavitācijas un autoklāvēšanas izmantošana. Pēc šīm iedarbībām bija iespējams sasniegt augstāko glikozes iznākumu pēc bērza koksnes hidrolīzes - 42,8 mg/ml. Pētījumos ar kviešu salmu izmantošanu augstākais glikozes iznākums sastādīja 28,6 mg/ml. Pēc LV KĶI kolēģu datiem, tika noskaidrots, ka pēc LV KĶI veiktās priekšapstrādes no 1 kg kviešu salmu var iegūt 688 g lignocelulozes (68,8%), kas satur 17,1% neatgriezeniski bojātās celulozes, 17,8% lignīna un 33,9% celulozes. Veicot pārrēķinu uz mūsu paraugiem, iegūstam, ka teorētiski iespējamais maksimāli iegūstamais glikozes daudzums būtu 33,2 mg/ml. Tā kā eksperimentos iegūtais maksimālais iznākums sastādīja 28,6 mg/ml, secinām, ka mums ir izdevies iegūt 86,1 % no teorētiski iespējamā glikozes daudzuma. Bērza koksnes gadījumā zināms, ka tā satur vidēji 25% lignīna un 47% celulozes, no kuras apmēram 80% atrodas kristāliskā stāvoklī. Pēc LV KĶI veiktās apstrādes kristāliskā stāvoklī saglabājas apmēram 45% celulozes. Sekojoši pēc furfurola izdalīšanas paliek 75g apstrādātas koksnes, kas satur 47 g celulozes t.i. 100 g apstrādātas koksnes satur 61 g celulozes, no kuras 55 % ir enzīmiem pieejamā formā. Veicot pārrēķinu uz mūsu paraugiem, iegūstam, ka teorētiski iespējamais maksimāli iegūstamais glikozes daudzums būtu 44 mg/ml. Tā kā eksperimentos iegūtais maksimālais iznākums sastādīja 42,8 mg/ml, secinām, ka mums ir izdevies iegūt 97,2 % no teorētiski iespējamā glikozes daudzuma. Turpinot meklēt iespējas iegūt furfurolu un bioetanolu no atjaunojamiem resursiem, uzsākti pētījumi par rapšu salmu izmantošanu

hidrolīzes procesā, kur materiāla priekšapstrādes un hidrolīzes parametri vēl optimizējami. Tāpat eksperimenti parādīja iespēju iegūtos glikozi saturošos hidrolizātus izmantot raugu fermentācijas procesā. Augstākā etanola sintēzes aktivitāte novērota izmantojot limitēta skābekļa apstākļos kultivētu žāvētu raugu, kas inkubēts ksilīta vai glicerīna šķīdumos pirms dehidratācijas. Tas viss pierāda jaunās tehnoloģijas efektivitāti un nozīmību arī tālāku pētījumu veikšanai ar mērķi uzlabot glikozes iegūšanas efektivitāti, vienlaicīgi furfurola un bioetanola ražošanai, kā arī tās tālāko perspektīvu arī citu atjaunojamo resursu izmantošanai minēto savienojumu iegūšanā.

SECINĀJUMI

1. Pirmo reizi parādīts, ka raugi *Saccharomyces cerevisiae*, kas auguši limitēta skābekļa apstākļos un parasti pilnībā zaudē dzīvotspēju dehidratācijas-rehidratācijas procesā, spēj veiksmīgi pāriet anabiozes stāvoklī, ja pielieto priekšapstrādi inkubējot ksilīta un glicerīna šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu.
2. Noskaidrots, ka žāvētos limitēta skābekļa apstākļos augušos raugos, kas inkubēti ksilīta un glicerīna šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu, ievērojami izmainās šūnu ķīmiskais sastāvs. To nukleīnskābju, proteīnu, lipīdu un ogļhidrātu saturs pietuvojas aerobi kultivētajām tā paša celma *Saccharomyces cerevisiae* raugu šūnām, kas rezistentas pret dehidratāciju-rehidratāciju.
3. Raugu *Saccharomyces cerevisiae* šūnām, kas augušas limitēta skābekļa apstākļos, raksturīga gludāka virsmas struktūra salīdzinot ar šūnām, kas kultivētas aerobos apstākļos. Limitēta skābekļa apstākļos kultivētu raugu inkubācija ksilīta un glicerīna šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu un tai sekojoša dehidratācija izraisa šūnas sienīgas stingrības pieaugumu.
4. Raugu inkubācija ksilīta un glicerīna šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu un tai sekojoša dehidratācija, izraisa ievērojamu karstuma šoka proteīnu Hsp70 sintēzi. Tas varētu nodrošināt iekššūnu proteīnu tostarp citoplazmatiskās membrānas proteīnu papildus aizsardzību.
5. Novērotās likumsakarības raugu šūnu atbildes reakcijās pret šķīdumu ar paaugstinātu osmotisko spiedienu iedarbību, tika izmantotas pie biopesticīdu producentu fizioloģiskās inženierijas. Tika sasniegts baktēriju *Pseudomonas aurantiaca* biotehnoloģisko raksturlielumu uzlabojums attiecībā pret biopesticīdu sintēzi ar antifungālo aktivitāti.

6. Noskaidrots, ka augu valsts hemicelulozi saturošus lauksaimniecības un rūpniecības atlikumus pēc furfurola izdalīšanas iespējams izmantot glikozi saturoša hidrolizāta iegūšanai veiksmīgai tālākai raugu izmantošanai bezatlikuma tehnoloģijā, lai ražotu bioetanolu. Optimāla lignocelulozes enzimatiskā hidrolīze līdz glikozei tiek sasniegta 72 stundu laikā pie 50 °C, izmantojot komerciālos enzīmu kompleksus Accellerase 1500 un Accellerase XC.
7. Noskaidrots, ka glikozes daudzuma pieaugumu pēc lignocelulozi saturošo atlikumu enzimatiskās hidrolīzes var sasniegt, ja kristāliskās celulozes daļu pārvērš amorfajā formā, pielietojot papildus kavitācijas un autoklāvēšanas metodes.
8. Noskaidrots, ka limitēta skābekļa apstākļos augušus raugus pēc inkubācijas ksilīta un glicerīna šķīdumos ar paaugstinātu osmotisko spiedienu un tai sekojošas dehidratācijas var efektīvi izmantot bioetanola sintēzei no lignocelulozes hidrolizāta.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Par promocijas darba rezultātiem ziņots 8 starptautiskās un 1 Latvijas konferencēs:

- 1) L.Rozenfelde, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeasts: is it possible for yeast grown in anaerobic conditions? 1st Congress of Baltic Microbiologists. Riga, Latvia, 2012, (stenda referāts)
- 2) M.Grube, M.Gavare, L.Rozenfelde, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeast: FTIR spectroscopy studies of yeast grown in anaerobic conditions. 1st Congress of Baltic Microbiologists. Riga, Latvia, 2012, (stenda referāts)
- 3) N.Vedernikov, M.Puke, I.Kruma, L.Rozenfelde, G.Khroustalyova, D.Borovikova, A.Patmalnieks, N.Matyushkova, A.Katashev, Yu.Dekhtyar, A.Rapoport. New approaches for waste-less bioethanol production from hardwood. 1st Congress of Baltic Microbiologists. Riga, Latvia, 2012, (stenda referāts)
- 4) A. Rapoport, G. Khroustalyova, L. Rozenfelde, D. Borovikova, E. Kolomiets. Anhydrobiosis in microorganisms and new biotechnological solutions. Microbial Biotechnologies: Fundamental and Applied Issues. Minsk, 2013
- 5) N. Vedernikov, I. Kruma, M. Puke, D. Borovikova, L. Rozenfelde, G. Khroustalyova, N. Matyuskova. Waste-less bioethanol and other valuable substances production from hardwood / A. Rapoport, International Conference on Future Energy, Environment, and Materials (FEEM 2013), Hong Kong, China, December 24-25, 2013
- 6) L.Rozenfelde, M.Gavare, M.Grube, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeast grown in anaerobic conditions. 5th Congress of European Microbiologists, FEMS 2013. Leipzig, Germany, 2013. (stenda referāts)
- 7) A.Rapoport, D.Borovikova, L.Rozenfelde, G.Khroustalyova. Anhydrobiosis in yeasts: current achievements and trends. BioMicroWorld 2013. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Madrid, 2013.
- 8) L. Rozenfelde. Uz *Pseudomonas aurantiaca* bāzes veidotu biopesticīdu preparatīvo formu izstrāde. - LU 72.konference, Rīga, Latvija, 2014.
- 9) L.Rozenfelde, V.Vendina, L.Purins, Yu.Dekhtyar, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeast: AFM studies of yeast grown in conditions with severe oxygen limitation. 2nd Congress of Baltic Microbiologists. Tartu, Estonia, 2014.(stenda referāts)
- 10) A.Rapoport, D.Borovikova, L.Rozenfelde, S.Lisi, P.Buzzini. Anhydrobiosis in yeast: unique state of live organisms and its possible non-conventional applications. 32nd

International Specialized Symposium on Yeasts “Yeasts Biodiversity and Biotechnology in the twenty-first century”. Perugia, Italy, 2015.

- 11) A.Rapoport, D.Kulikova, L.Rozenfelde. Anhydrobiosis in yeasts: from live nature to modern biotechnologies. 3rd Congress of Baltic Microbiologists. Vilnius, 2016.
- 12) L.Rozenfelde, M.Puke, I.Kruma, N.Vedernikov, N.Matjuskova, A.Rapoport. Enzymatic hydrolysis of ligno(hemi)cellulose after pretreatment with laccase. 3rd Congress of Baltic Microbiologists. Vilnius, 2016. (stenda referāts)

Promocijas darba rezultāti publicēti 8 zinātniskajās publikācijās:

- 1) Rozenfelde L., Khroustalyova G., Mandryk M., Kolomiets E.& Rapoport A.(2012) Physiological engineering of *Pseudomonas aurantiaca* antimicrobial activity: effects of sodium chloride treatment. *Microbiology Research*, 3: 108-111
- 2) Rapoport A., Khroustalyova G., Rozenfelde L., Borovikova D., Kolomiets E. (2013) Anhydrobiosis in microorganisms and new biotechnological solutions. *Microbial Biotechnologies: Fundamental and Applied Issues*. Minsk, Belaruskaya navuka, 5: 141-154 (in Russian).
- 3) Rozenfelde L., Rapoport A. (2014) Anhydrobiosis in yeast: is it possible to reach anhydrobiosis for yeast grown in conditions with severe oxygen limitation? *Antonie Van Leeuwenhoek*.106(2):211-217
- 4) Borovikova D., Rozenfelde L., Pavlovska I., Rapoport A.(2014) Immobilisation increases yeast cells' resistance to dehydration–rehydration treatment. *Journal of Biotechnology*. 184: 169–171
- 5) Grube M., Gavare M., Rozenfelde L., Rapoport A. (2014) Anhydrobiosis in yeast: FT-IR spectroscopic studies of yeast grown under conditions of severe oxygen limitation. *Biotechnol Appl Biochem*. 61(4):474-479
- 6) Rapoport A., Vedernikov N., Kruma I., Puke M., Borovikova D., Rozenfelde L., Khroustalyova G., Matyuskova N. (2014) Waste-less bioethanol and other valuable substances production from hardwood.- *WIT Transactions on Engineering Sciences*, 88: 311-317
- 7) Matjuskova N., Okmane L., Zala D., Rozenfelde L., Puke M., Kruma I., Vedernikov N., Rapoport A. (2017) Effect of lignin-containing media on growth of medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Proceedings of the Latian Academy of Sciences, Section B*, 71:38-42

- 8) Rozenfelde L., Puke M., Kruma I., Poppele I., Matjuskova N., Vedernikov N., Rapoport A. (2017) Enzymatic hydrolysis of lignocellulose for bioethanol production. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, 71: 275 - 279

Promocijas darba rezultāti publicēti 14 tēzēs:

- 1) L.Rozenfelde, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeasts: is it possible for yeast grown in anaerobic conditions? - In: 1rd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Riga, Latvia, 2012, P20.
- 2) M.Grube, M.Gavare, L.Rozenfelde, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeast: FTIR spectroscopy studies of yeast grown in anaerobic conditions. - In: 1rd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Riga, Latvia, 2012, P19.
- 3) N.Vedernikov, M.Puke, I.Kruma, L.Rozenfelde, G.Khroustalyova, D.Borovikova, A.Patmalnieks, N.Matyushkova, A.Katashev, Yu.Dekhtyar, A.Rapoport. New approaches for waste-less bioethanol production from hardwood. - In: 1rd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Riga, Latvia, 2012, P40.
- 4) A.Rapoport, G.Khroustalyova, L.Rozenfelde, D.Borovikova. Anhydrobiosis in yeast: mechanisms and applications. - In: 1rd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Riga, Latvia, 2012, I16.
- 5) L.Rozenfelde, M.Gavare, M.Grube, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeast grown in anaerobic conditions. – In: 5th Congress of European Microbiologists, FEMS 2013. Book of Abstracts. Leipzig, Germany, 2013, 177.
- 6) A.Rapoport, D.Borovikova, L.Rozenfelde, G.Khroustalyova. Anhydrobiosis in yeasts: current achievements and trends. – In: BioMicroWorld 2013. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Book of Abstracts. Madrid, 2013, 527.
- 7) A.Rapoport, N.Vedernikov, I.Kruma, M.Puke, D.Borovikova, L.Rozenfelde, G.Khroustalyova. Waste-less bioethanol and other valuable substances production from hardwood. – In: FEEM 2013. International Conference on Future Energy, Environment and Materials. Book of Abstracts. Hong Kong, 2013, 8.
- 8) D.Borovikova, J.Freivalds, L.Rozenfelde, A.Rapoport. Benefits of immobilization for cells' physiology.- In: 2nd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Tartu, 2014, 18.

- 9) A.Rapoport, D.Borovikova, L.Rozenfelde, O.Muter, I.Muiznieks. Yeast anhydrobiosis and modern biotechnology: can they be connected? – In: 2nd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Tartu, 2014, 57.
- 10) L.Rozenfelde, A.Rapoport. Anhydrobiosis in yeast: AFM studies of yeast grown in conditions with severe oxygen limitation.- In: 2nd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Tartu, 2014, 58.
- 11) A.Rapoport, D.Borovikova, L.Rozenfelde, S.Lisi, P.Buzzini. Anhydrobiosis in yeast: unique state of live organisms and its possible non-conventional applications. 32nd International Specialized Symposium on Yeasts “Yeast Biodiversity and Biotechnology in the Twenty-First Century. Book of Abstracts, Perugia. 2015, 16.
- 12) A.Rapoport, D.Kulikova, L.Rozenfelde. Anhydrobiosis in yeasts: from live nature to modern biotechnologies.- In: 3rd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Vilnius, 2016, 28.
- 13) L.Rozenfelde, M.Puke, I.Kruma, N.Vedernikov, N.Matjuskova, A.Rapoport. Enzymatic hydrolysis of ligno(hemi)cellulose after pretreatment with laccase.- In: 3rd Congress of Baltic Microbiologists. Book of Abstracts. Vilnius, 2016, 96.
- 14) A.Rapoport, L.Rozenfelde, D.Kulikova, G.Khroustalyova, M.Grube, P.Buzzini, G.Soveral, A.Sibirny. Anhydrobiosis in yeasts: mechanisms of cell resistance.-In: 33rd International Specialized Symposium on Yeasts "Exploring and Engineering Yeasts for Industrial Application". Abstracts. Cork, Ireland, 2017,45.

Promocijas darba gaitā iegūtie rezultāti izmantoti metodikām (tehnoloģijām), kas ir pieteiktas aizsardzībai ar 2 Latvijas valsts patentiem:

- 1) A.Rapoports, N.Vedernikovs, L.Rozenfelde, J.Dehtjars, S.Cifanskis, M.Puke, I.Kruma, A.Katasevs, V.Jakusevics. Method of enzymatic pretreatment of cellulose. – Latvian Patent, 2013, LV14742B
- 2) L.Rozenfelde, M.Puke, I.Kruma, N.Matjuskova, N.Vedernikovs, A.Rapoports. Method of enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. – Latvian Patent, 2015, LV15064 B

LITERATŪRAS SARAKSTS

Abe F. & Hiraki T. (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1788: 743-752

Adya A.K., Canetta E. & Walker G.M. (2006) Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res*, 6: 120–128

Aguilar-Uscanga, B. & Francois J. M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol*, 37:268-274

Aitchisona J.D. & Rout M.P. (2000) The road to ribosomes. Filling potholes in the export pathway. *J Cell Biol*, 151: 23–26

Aitchison J.D. & Rout M.P. (2012) The Yeast Nuclear Pore Complex and Transport Through It. *Genetics*, 190: 855–883

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science, 1616 pp

Allison S.D., Chang B., Randolph T.W. & Carpenter J.F. (1999) Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys*, 365:289-298

Alpert P. (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol*, 45: 685-695

Amoros M. & Estruch F. (2001) Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol*, 39:1523-1532

Armstrong J. (2010) Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends Cell Biol*, 20:580-585

Bakthisaran R., Tangirala R. & Rao C.M. (2015) Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta*, 1854:291-319

Bauer B.E., Wolfger H. & Kuchler K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1461:217-236

Berner J.L. & Gervais P. (1993) A new visualization chamber to study the transient volumetric response of yeast cells submitted to osmotic shifts. *Biotechnol Bioeng*, 43: 165–170

Beker M.J., Damberga B.E. & Rapoport A.I. (1981) *Anabiosis of Microorganisms*. Zinatne, Riga, 252 pp.

Beker M.J. & Rapoport A.I. (1987) Conservation of yeasts by dehydration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 35:127-171

Bekers M., Vigants A., Laukevics J., Toma M., Rapoport A. & Zikmanis P. (2000) The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Int J Food Microbiol*, 55: 147-150

Belton P.S. & Gil A.M. (1994) IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers*, 34:957-961

Benaroudj N., Lee D.H. & Goldberg A.L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem*, 276:24261-24267

Billi D., Friedmann E.I., Hofer K.G., Caiola M.G. & Ocampo-Friedmann R. (2000) Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Appl Environ Microbiol*, 66:1489-1492

- Billi D. & Potts M. (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol*, 153: 7-12
- Biryusova V.I. & Rapoport A.I. (1978) Cryofractographic investigation of the structure of yeast cells in an anabiotic state. *Microbiology*, 47: 245-251
- Blomberg A. & Adler L. (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 171: 1087–1092
- Blomberg A. & Adler L. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol*, 33:145-212
- Bogner A., Jouneau P.H., Thollet G., Basset D. & Gauthier C.(2007) A history of scanning electron microscopy developments: towards "wet-STEM" imaging. *Micron*, 38:390-401
- Bohnert H.J., Nelson D.E. & Jensen R.G. (1995) Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell*, 7:1099-1111
- Bohnert H.J. & Shen B. (1999) Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae*, 78: 237-260
- Borovikova D., Teparić R., Mrša V. & Rapoport A. (2016) Anhydrobiosis in yeast: cell wall mannoproteins are important for yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistance to dehydration. *Yeast*, 33:347-353
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, 72:248–254
- Briggs D.E., Boulton C.A., Brookes P.A. & Stevens R. (2004) *Brewing: Science and practice*. Woodhead Publishing, Cambridge UK/CRC. Press, Boca Raton, Florida, USA, 881 pp
- Brohée S., Barriot R., Moreau Y. & André B. (2010) YTPdb: a wiki database of yeast membrane transporters. *Biochim Biophys Acta*. 1798:1908-1912

Bublitz M., Morth J.P. & Nissen P. (2011) P-type ATPases at a glance. *J Cell Sci*, 124:2515-2519

Burg M.B. & Ferraris J.D.(2008) Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem*, 283:7309-7313

Burnie J.P., Carter T.L., Hodgetts S.J.& Matthews R.C.(2006) Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev*, 30:53-88

Butt H.J., Cappella B.& Kappl M. (2005) Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, 59: 1–152

Bösl B., Grimminger V. & Walter S.(2006) The molecular chaperone Hsp104-a molecular machine for protein disaggregation. *J Struct Biol*, 156:139-148

Cabiscol E., Piulats E. & Echave P.(2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275:27393-27398

Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R. & Tanner W. (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J*, 13: 4737 – 4744

Cappellaro C., Mrsa V. & Tanner W. (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol*, 180: 5030–5037

Carmelo V. & Sa-Correia I. (1997) HySP26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiol Lett*, 149:85-88

Castillo L., Martinez A.I., Garcera A., Elorza M.V., Valentín E. & Sentandreu R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast*, 20:973-983

Catalá A. (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 1482–1495

- Catalá A. (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*, 157: 1-11
- Chang K.C., Chiang Y.W., Yang C.H. & Liou J.W. (2012) Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, 24:162-169
- Chaturvedi V., Bartiss A. & Wong B. (1997) Expression of bacterial mtlD in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. *J Bacteriol*, 179:157-162
- Cheng M.Y., Hartl F.U. & Horwich A.L. (1990) The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature*, 348:455-458
- Clegg J.S. (2001) Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 128:613-624
- Connerly P.L. (2010) How do proteins move through the Golgi apparatus? *Nat Educ*, 3: 60
- Cooper G.M. (2000) *The Cell*, 2nd edition. A Molecular Approach. Boston University. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 689 pp.
- Crawford D.R. & Davies K.J. (1994) Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect*, 102:25-28
- Crowe J.H., Carpenter J.F. & Crowe L.M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 60:73-103
- Crowe J.H., Crowe L.M., Oliver A.E., Tsvetkova N., Wolkers W. & Tablin F. (2001) The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43:89-105
- Crowe, J. H., Hoekstra F. A. & Crowe L. M. (1989) Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc Nat Acad Sci USA*, 86: 86520-86523

- Crowe J.H., Hoekstra F.A. & Crowe L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 54:579-599
- Crowe J.H., Oliver A.E. & Tablin F. (2002) Is There a Single Biochemical Adaptation to Anhydrobiosis? *Integr Comp Biol*, 42: 497-503
- Csala M., Bánhegyi G. & Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett*, 580:2160-2165
- Culotta V.C., Yang M. & O'Halloran T.V. (2006) Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta*, 1763:747-758
- D'Angelo M.A. & Hetzer M.W. (2006) The role of the nuclear envelope in cellular organization. *Cell Mol Life Sci*, 63:316–332
- D'Angelo M.A. & Hetzer M.W. (2008) Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol*, 18: 456–466
- Daum G., Lees N.D., Bard M. & Dickson R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1471-1510
- Davies K.J. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50:279-289
- Denis V. & Cyert M.S. (2002) Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol*, 156: 29–34.
- De Nobel J.G., Klis F.M., Priem J., Munnik T. & van den Ende H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6: 491 – 499
- Doke S.K. & Dhawale S.C. (2015) Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J*, 23:223-229
- Doster W. (2010) The protein-solvent glass transition. *Biochim Biophys Acta*, 1804:3–14

Dupont S., Beney L., Ritt J.F., Lherminier J. & Gervais P. (2010) Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim Biophys Acta*, 1798: 975-985

Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mersa V. & Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem*, 281:11523-11529

Eldra Solomon E., Linda Berg L., Diana W. & Martin D.W. (2010) *Biology*, 9th edition. Cengage Learning, 1408 pp.

Eleutherio E.C.A., de Araujo P.S. & Panek, A.D. (1993) Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1156: 263-266

Encyclopaedia Britannica (2008) pieejams: <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope> (aplūkots 2017.gada 20.aprīlī)

Encyclopaedia Britannica (2008) pieejams: <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope> (aplūkots 2017.gada 20.aprīlī)

Engel S.R. & Cherry J.M. (2013) The new modern era of yeast genomics: community sequencing and the resulting annotation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* strains at the *Saccharomyces Genome Database*. *Database (Oxford)*, 2013:bat012

Erkut C., Penkov S., Fahmy K. & Kurzchalia T.V. (2012) How worms survive desiccation: Trehalose pro water. *Worm*, 1: 61-65

Espindola Ade S., Gomes D.S., Panek A.D. & Eleutherio E.C. (2003) The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology*, 47:236-241

Fan C.Y., Lee S. & Cyr D.M. (2003) Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*, 8:309-316

Feder M.E. & Hofmann G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 61:243-282

Feldmann H. (2012) *Yeast: Molecular and Cell Biology*, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 348 pp.

Fleet G.H. (1991) Cell walls. In: *The Yeasts*, 2nd edn., Vol. 4 (Rose A.H. and Harrison, J.S., Eds.), pp. 199 - 277. Academic Press, New York.

França M.B., Panek A.D. & Eleutherio E.C. (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146:621-631

Girard P.M. & Boiteux S. (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie*, 79: 559–566

Glover J.R. & Lindquist S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins. *Cell*, 94:73-82

Golovina E.A., Golovin A., Hoekstra F.A. & Faller R. (2010) Water replacement hypothesis in atomic details: effect of trehalose on the structure of single dehydrated POPC bilayers. *Langmuir*, 26:11118-26

Golovina E.A., Golovin A.V., Hoekstra F.A. & Faller R. (2009) Water replacement hypothesis in atomic detail--factors determining the structure of dehydrated bilayer stacks. *Biophys J*, 97:490-499

Gonzalez M., Goddard N., Hicks C., Ovalle R. Rauceo J.M., Jue C.K. & Lipke P.N. (2010) A screen for deficiencies in GPI-anchorage of wall lycoproteins in yeast. *Yeast*, 27: 583–596

Goodhew P. J., Humphreys J. & Beanland R. (2001) *Electron microscopy and analysis*. Taylor & Francis: London, 243 pp.

Gostimskaya I. & Chris M. Grant C.M. (2016) Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system. *Free Radic Biol Med*, 94: 55–65

- Goyal K., Walton L.J., Browne J.A., Burnell A.M. & Tunnacliffe A.(2005) Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integr Comp Biol*, 45:702-709
- Grant C.M., MacIver F.H. & Dawes I.W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 29: 511-515
- Guzhova I., Krallish I., Khroustalyova G., Margulis B. & Rapoport A. (2008) Dehydration of yeast: Changes in the intracellular content of Hsp70 family proteins. *Process Biochemistry*, 43: 1138-1141
- Hare P. D., Cress W. A. & Van Staden J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21: 535–553
- Haslbeck M., Braun N., Stromer T., Richter B., Model N., Weinkauff S. & Buchner J. (2004) Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 23: 638–649
- Heimburg T. (2007) *Thermal Biophysics of Membranes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 378 pp.
- Helm, D. & Naumann, D. (1995) Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett*, 126: 75–80
- Hoekstra F.A., Golovina E.A. & Buitink J.(2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci*, 6:431-438
- Hohmann S.(2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66:300-372
- Hohmann S., Krantz M. & Nordlander B.(2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol*, 428:29-45
- Jaeken L. (2007) A new list of functions of the cytoskeleton. *IUBMB Life*, 59:127-133.

- Jigami Y. & Odani T. (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim Biophys Acta*, 1426: 335 – 345
- Jönsson K.I. & Schill R.O. (2007) Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 146:456-460
- Kalderon B., Kogan G., Bubis E. & Pines O. (2015) Cytosolic Hsp60 can modulate proteasome activity in yeast. *J Biol Chem*, 290:3542-3551
- Kane P.M. (2006) The Where, When, and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70: 177–191
- Kapteyn J.C., Van Den Ende H. & Klis F.M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta*, 1426:373-83
- Kapteyn J.C., Van Egmond P., Sievi E., Van Den Ende H., Makarow M. & Klis F. M. (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β -1,6-glucan deficient mutants. *Mol Microbiol*, 31:1835-1844
- Kerr, R.A. (1998) The next oil crisis looms large - and perhaps close. *Science*, 281: 1128-1131
- Klionsky D.J., Herman P.K. & Emr S.D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*, 54: 266–292
- Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K. & Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:239–256
- Kohno K., Normington K., Sambrook J., Gething M.J. & Mori K.(1993) The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*, 13:877-890

- Kollar R., Reinhold B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Klis F. M. & Cabib E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. β (1-6)-Glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, 272:17762-17775
- Kong Q. & Lin C.G. (2010) Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci*, 67: 1817–1829
- Koster K.L., Lei Y.P., Anderson M., Martin S. & Bryant G. (2000) Effects of Vitrified and Nonvitrified Sugars on Phosphatidylcholine Fluid-to-Gel Phase Transitions. *Biophys J*, 78: 1932–1946
- Krainer, E., Stark R. E., Naider F., Alagramam K. & Becker J. M. (1994) Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ^{13}C -NMR. *Biopolymers*, 34:1627–1635
- Krallish I., Jeppsson H., Rapoport A. & Hahn-Hägerdal B. (1997) Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 47:447-451
- Kremer A., Lippens S., Bartunkova S., Asselbergh B., Blanpain C., Fendrych M., et.al. (2015) Developing 3D SEM in a broad biological context. *J Microsc*, 259:80-96
- Kumar A., Cheung K.H., Ross-Macdonald P., Coelho P.S., Miller P. & Michael Snyder (2000) TRIPLES: a database of gene function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 28: 81–84
- Kühlbrandt W. (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*, 13:1-11
- Lang F., Busch G.L. & Völkl H. (1998) The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem*, 8:1-45
- Lamikanra O., Imam S. & Ukuku D. (2005) Produce Degradation: Pathways and Prevention. CRC Press, Florida, 696 pp.

- Latterich M. & Watson M.D. (1993) Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 191:1111-1117
- Leber R., Landl K., Zinser E., Ahorn H., Spök A., Kohlwein S.D., Turnowsky F. & Daum G. (1998) Dual Localization of Squalene Epoxidase, Erg1p, in Yeast Reflects a Relationship between the Endoplasmic Reticulum and Lipid Particles. *Mol Biol Cell*, 9: 375–386
- Leber R., Zinser E., Hrastnik C., Paltauf F. & Daum G. (1995) Export of steryl esters from lipid particles and release of free sterols in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1234:119–126
- Leber R., Zinser E., Zellnig G., Paltauf F. & Daum G. (1994) Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10:1421–1428
- Leslie S.B., Teter S.A., Crowe L.M. & Crowe J.H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1192: 7-13
- Li S.C. & Kane P.M. (2009) The Yeast Lysosome-like Vacuole: Endpoint and Crossroads. *Biochim Biophys Acta*, 1793: 650–663
- Limayem A. & Ricke S.C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci*, 38: 449-467
- Lin H., Kumánovics A., Nelson J.M., Warner D.E., Ward D.M. & Kaplan J. (2008) A single amino acid change in the yeast vacuolar metal transporters ZRC1 and COT1 alters their substrate specificity. *J Biol Chem*, 283:33865-33873
- Ling G. N. (2001) Life at the cell and below-cell level. The hidden history of a fundamental revolution in biology. Pacific Press, New York. 400 pp.
- Lins R.D., Pereira C. S. & Hünenberger P. H. (2004) Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins*, 55:177–186

- Llopis J., McCaffery J. M., Miyawaki A., Farquhar M.G. & Tsien R.Y. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6803–6808
- Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D. & Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W.H. Freeman, 1084 pp.
- Louvion J F., Abbas-Terki T. & Picard D.(1998) Hsp90 Is Required for Pheromone Signaling in Yeast. *Mol Biol Cell*, 9: 3071–3083
- Lucero P., Peñalver E., Moreno E. & Lagunas R.(2000) Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 66:4456-4461
- Mager W. H. & Ferreira P. M. (1993) Stress response of yeast. *Biochem J*, 290: 1-13
- Malhotra R. & Singh B. (2005) Glycolipids of *Saccharomyces cerevisiae* cell. *Journal of Biological Sciences*, 5: 253-256
- Mandryk M.N., Kolomiets E.I. & Dey E.S. (2007) Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1. *Polish J Microbiol*, 56: 245-250
- 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 J*, 15:2227-2235
- Mattimore V. & Battista J.R. (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol*, 178:633-7
- McGill L.M., Shannon A.J., Pisani D., Felix M.A., Ramlov H., Dix I., Wharton D.A. & Burnell A.M. (2015) Anhydrobiosis and freezing-tolerance: adaptations that facilitate the establishment of *Panagrolaimus* nematodes in polar habitats. *PLoS One*, 10: e0116084

Miguel N., Braun N., Bepperling A., Kriehuber T., Kastenmüller A., Buchner J., Angel S.O. & Haslbeck M. (2009) Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite *Toxoplasma gondii*. *Biochim Biophys Acta*, 1793:1738-1748

Mrsa V., Seidl T., Gentsch M. & Tanner W. (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13:1145-1154

Mrsa V. & Tanner W. (1999) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, 15:813-820

Modig T., Granath K., Adler L. & Lidén G. (2007) Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75: 289-296

Morgan C.A., Herman N., White P.A. & Vesey G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying. *J Microbiol Methods*, 66:183-193

Mosammaparast N. & Pemberton L.F. (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*, 14:547–556

Motshwene P., Karreman R., Kgari G., Brandt W. & Lindsey G. (2004). LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heatshock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 377: 769–774

Moukadiri I., Jaafar L. & Zueco J. (1999) Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* *mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. *J Bacteriol*, 181: 4741–4745

Murata, Y., Homma, T., Kitagawa, E., Momose, Y., Sato, M. S., Odani, M., Shimizu, H., Hasegawa-Mizusawa, M., Matsumoto, R. & other authors (2006) Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4 degrees C. *Extremophiles*, 10: 117–128

- Mustafa M.G., Dar T.A. & Ali S. (2011) Polyols Stabilize the Denatured States of Multidomain Protein Ovomuroid. *International Journal of Biological Chemistry*, 5: 327-341
- Naumann, D. (2000) in Meyers R.A., Eds. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 102-131.
- Nelson H. & Nelson N. (1990) Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H⁺-ATPase causes conditional lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:3503-3507
- Neuhaus-Steinmetz U. & Rensing L. (1997) Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. *Toxicology*, 123:185-195
- Nevoigt E. & Stahl U. (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 21:231-241
- Nguyen T. H., Fleet G. H. & Rogers P. L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50:206-212
- Nurminen T., Konttinen K. & Suomalainen H. (1975) Neutral lipids in the cells and cell envelope fractions of aerobic baker's yeast and anaerobic brewer's yeast. *Chem Phys Lipids*, 14: 15-32
- Ohya, Y., Umemoto N., Tanida I., Ohta A., Iida H., & Anraku Y. (1991) Calcium-sensitive *cls* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* showing a Pet- phenotype are ascribable to defects of vacuolar membrane H⁺-ATPase activity. *J Biol Chem*, 266:13971-13977.
- Orij R., Postmus J., Ter Beek A., Brul S. & Smits G.J. (2009) In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology*, 155:268-278
- Osman C., Noriega T.R., Okreglak V., Fung J.C., & Walter P. (2015) Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *PNAS*, 112: 947–956

- Osumi M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 29:207-233
- Owen D.M.& Gaus K. (2013) Imaging lipid domains in cell membranes: the advent of super-resolution fluorescence microscopy. *Front Plant Sci*, 4:503
- Palmqvist E. & Hahn-Hagerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol*, 74: 25-33
- Papanikou E. & Glick B.S. (2009) The yeast Golgi apparatus: insights and mysteries. *FEBS Lett*, 583(23):3746-3751
- Peisker K., Chiabudini M.& Rospert S.(2010) The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1803:662-72
- Penninckx M.J. (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2: 295-305
- Pereira Ede J., Panek A.D.& Eleutherio E.C. (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones*, 8:120-124
- Petrova V.Y., Drescher D., Kujumdzieva A.V. & Schmitt M.J.(2004) Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J*, 380:393-400
- Poirier I., Maréchal P.A., Richard S. & Gervais P. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *J Appl Microbiol*, 86:87-92
- Postek M.T., Howard K.S., Johnson A.H. & McMichael K.L. (1980) *Scanning Electron Microscopy: A Student's Handbook*, Ladd Research Ind., Inc. Williston, VT., 305 pp.
- Potts M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev*, 58:755-805

Praekelt U. M. & Meacock P. A. (1990) HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet*, 223: 97–106

Preuss D., Mulholland J., Kaiser C.A., Orlean P., Albright C., Rose M.D., Robbins P.W. & Botstein D. (1991) Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast*, 7:891-911

Pray L. (2008) L. H. Hartwell's yeast: A model organism for studying somatic mutations and cancer. *Nature Education*, 1:183

Rapoport A.I. (1984) *Anabioze, apturēta dzīvība*. Zinatne, Riga, 115 pp.

Rapoport A.I. & Beker M.E. (1985) Changes in the surface charge of yeast cells during their dehydration and rehydration. *Microbiology*, 54: 362-365

Rapoport A.I. & Beker M.E. (1983) Effect of sucrose and lactose on resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to dehydration. *Microbiology*, 52: 556–559

Rapoport A.I., Birjusova V.I. & Meissel M.N. (1973) The structure of the yeast cell nucleus in an anabiotic state. *Reports of the Academy of Science of the USSR*, 213 : 708-710

Rapoport A.I., Biryusova V.I. & Svetlichnaya T.P. (1986) Freeze-fracture study of changes in vacuoles during dehydration of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Microbiology*, 55: 835–839

Rapoport A.I. & Kostrikina N.A. (1973) Cytological investigation of an anabiosis state of yeast organisms. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR. Biology*, 5: 770-773

Rapoport A.I., Khroustalyova G.M., Crowe L.M. & Crowe J.H. (2009) Anhydrobiosis in yeast: stabilization by exogenous lactose. *Mikrobiologija*, 78:690-694

Rapoport A.I., Khroustalyova G.M. & Kuklina E.N. (1997) Anhydrobiosis in yeast: activation effect. *Braz J Med Biol Res*, 30:9-13

- Rapoport A.I. & Meysel M.N. (1985) Survival rates of yeast organisms after dehydration as determined by fluorescence microscopy. *Microbiology*, 54: 53–55
- Rapoport A.I., Puzyrevskaya O.M. & Saubenova M.G. (1988) Polyols and resistance of yeasts to dehydration. *Microbiology*, 57:269–271
- Rebecchi L., Altiero T. & Guidetti R. (2007). Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebr Survival J*, 4: 65-81
- Reed R. (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol*, 15:326-331
- Rees D.A., Morris E.R., Thom D. & Madden, J.K. (1982) Shapes and interactions of carbohydrate chains. In: *The Polysaccharides*, Vol. I (Aspinall, G.O., Ed.), pp. 196 – 290. Academic Press, New York.
- Reimer L. (1998) *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. Springer Science & Business Media, Germany, 527 pp.
- Reynolds T.B. & Fink G.R. (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291: 878 – 881
- Rice W.J., Young H.S., Martin D.W., Sachs J.R. & Stokes D.L. (2001) Structure of Na⁺,K⁺-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca²⁺-ATPase in E1 and E2 states. *Biophys J*, 80: 2187–2197
- Russo P., Kalkkinen N., Sareneva H., Paakkola J.& Makarow M. (1992) A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 3671–3675
- Russo P., Simonen M., Uimari A., Teesalu T.& Makarow M. (1993) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast HSP150 gene encoding a secretory glycoprotein. *Mol Gen Genet*, 239: 273–280

- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. & Lindsey, G. (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta*, 1463: 267–278
- Sanchez Y., Taulien J., Borkovich K.A. & Lindquist S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J*, 11:2357-2364
- Seki K. & Toyoshima M. (1998) Preserving tardigrades under pressure. *Nature*, 395: 853–854
- Selitrennikoff C. P. (2001) Antifungal Proteins. *Appl Environ Microbiol*, 67: 2883–2894
- Shaner L., Wegele H., Buchner J. & Morano K.A. (2005) The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *J Biol Chem*, 280:41262-41269
- Sharma D. & Masison D.C. (2009) Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept Lett*, 16:571-581
- Shen B., Hohmann S., Jensen R.G. & Bohnert H. (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol*, 121:45-52
- Shimazu M., Sekito T., Akiyama K., Ohsumi Y. & Kakinuma Y. (2005) A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 280: 4851-4857
- Silberstein S., Schlenstedt G., Silver P.A. & Gilmore R. (1998) A role for the DnaJ homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 143:921-933
- Simonin H., Beney L. & Gervais P. (2007) Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1768: 1600-1610
- Simonin H., Beney L. & Gervais P. (2007) Cell death induced by mild physical perturbations could be related to transient plasma membrane modifications. *J Membrane Biol*, 216: 37-47
- Simons K. & Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387:569-572

Singer M.A. & Lindquist S.(1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol*, 16:460-468

Skory C.D. & Freer S.N. (1995) Cloning and characterization of gene encoding a cell-bound, extracellular β -glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Appl Environ Microbiol*, 61:518-525

Smirnoff N. & Cumbes Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-1060

Smith A.E., Zhang Z., Thomas C.R., Moxham K.E. & Middelberg A.P. (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 9871 -9874

Smits G.J., Kapteyn J. C., Van Den Ende H. & Klis F. M. (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol*, 2:348-352

Snoek I.S.I. & Steensma H.Y. (2007) Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24: 1-10

Sola-Penn M. & Meyer-Fernandes J.R.(1998) Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch Biochem Biophys*, 360:10–14

Stock D., Leslie A.G. & Walker J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286:1700-1705

Suda Y.& Nakano A. (2012) The yeast Golgi apparatus. *Traffic*, 13:505-510

Sumita T., Yoko-o T., Shimma Y.& Jigami, Y. (2005) Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of Pir1p. *Eukaryot Cell*, 4: 1872–1881

- Stone R. L., Matarese V., Magee B. B., Magee P. T. & Bernlohr D. A. (1990) Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene*, 96: 171–176
- Takagi H. (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:211-223
- Tapia H.& Koshland D.E. (2014) Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Curr Biol*, 24:2758-2766
- Teixeira P., H. Castro, Kirby R. (1995) Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, 78:456 – 462
- Teparić R., Stuparević I.& Mrsa V. (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology*, 150:3145-3150
- Tortorello M.L. & Gendel S.M. (1997) *Food Microbiology and Analytical Methods: New Technologies*. Marcel Dekker, New York, 376 pp.
- Tunnacliffe A. & Lapinski J. (2003) Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358: 1755–1771
- Tweddle J. C., Dickie J. B., Baskin C. C.& Baskin J. M. (2003) Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J Ecol*, 91:294-304
- Tymczynszyn E.E., del Rosario Díaz M., Gómez-Zavaglia A. & Disalvo E.A.(2007) Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J Appl Microbiol*, 103:2410-2419
- VanEck J.H., Prior B.A. & Brandt E.V. (1993) The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *Journal of General Microbiology*, 139:1047-1054

- Ventina E.J., Saulite L.A, Rapoport A.I. & Beker M.E. (1984) Electron-microscopic study of yeasts in a state of anabiosis and reactivated from this state. *Microbiology*, 53:536-541
- Vigants A., Kruce R., Bekers M. & Zikmanis, P. (1998) Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride addition. *Biotechnol Lett*, 20: 1017–1019
- Vigants A., Zikmanis P. & Bekers M. (1996) Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas* culture. *Acta Biotechnol*, 16: 321–327
- Wiedemann N., Frazier A.E. & Pfanner N. (2004) The Protein Import Machinery of Mitochondria. *J Biol Chem*, 279: 14473–14476
- Will C.L. & Lührmann R. (2011) Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(7)
- Wilson W.A., Roach P.J., Montero M., Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Eydallin G., Viale A.M. & Pozueta-Romero J. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 34:952-985
- Woolford J.L.Jr. & Baserga S.J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195: 643-681
- World population prospects – Population Division - United Nations (2017) pieejams: <https://esa.un.org/unpd/wpp/DataQuery> (aplūkots 2017.gada 20.augustā)
- Yancey P.H. (2001) Water Stress, Osmolytes and Proteins. *American Zoologist*, 41: 699-709
- Yancey P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*, 208:2819-2830
- Yang N., Yu Z., Jia D., Xie Z., Zhang K., Xia Z., Lei L. & Qiao M. (2014) The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 2897-2905
- Yun D. J., Zhao Y., Pardo J. M., Narasimhan M. L., Damsz B., Lee H., Abad L. R., D'Urzo M. P., Hasegawa P. M. & Bressan R. A. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface

determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 7082–7087

Zhang W., Xiao S. & Ahn D.U.(2013) Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53:1191-1201

Zhong T.& Arndt K.T.(1993) The yeast SIS1 protein, a DnaJ homolog, is required for the initiation of translation. *Cell*, 73:1175-1186

Zhou X.L., Batiza A.F., Loukin S.H., Palmer C.P., Kung C. & Saimi Y. (2003) The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:7105–10

Zimber A., Nguyen Q.D.& Gespach C. (2004) Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal*, 16:1085-104

Zimmer C. & Fabre E. (2011) Principles of chromosomal organization: lessons from yeast. *J Cell Biol*, 192:723-733

Zuehlke A. & Johnson J.L.(2010) Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers*, 93: 211–217

Walker G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, England, 362 pp.

Walsh P., Bursac D., Law Y.C., Cyr D.& Lithgow T.(2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep*, 5:567-571

Webb H.K., Truong V.K., Hasan J., Crawford R.J.& Ivanova E.P.(2011) Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy - Current research and methodologies. *J Microbiol Methods*, 86:131-139

Winey M., Meehl J.B., O'Toole E.T.& Giddings T.H. Jr. (2014) Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell*, 25:319-323.

Wolkers W.F., Tablin F.& Crowe J.H. (2002) From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 131:535-543

Wong-Ekkabut J., Xu Z., Triampo W., Tang I.M., Tieleman D.P.& Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*, 93:4225-4236

Власов А. И., Елсуков К.А. & Косолапов И.А. (2011) Электронная микроскопия, МГТУ им.Н .Э. Баумана, Москва, 168 pp.

Уикли Б. (1975) Электронная микроскопия для начинающих. Мир, Москва, 324 pp.

Хокс П. (1972) Электронная оптика и электронная микроскопия. Мир, Москва, 318 pp.

Цыфанский С. (2008) Кавитационные и высоковольтно – плазменные технологии. РТУ, Рига, 524 pp.