

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**ADENĪNA BIOSINTĒZES CEĻA MUTĀCIJU IETEKME UZ
MAIZES RAUGA CENTRĀLO OGLEKĻA METABOLISMU
SLĀPEKĻA UN PURĪNU BADINĀŠANAS LAIKĀ.**

BAKALaura DARBS

Autors: Ernests Tomass Auziņš

Studenta apliecības Nr.: ea18031

Darba vadītāja: Mag. biol. Zane Ozoliņa

KOPSAVILKUMS

Darbā tika apskatītas izmaiņas maizes rauga purīnu *de novo* sintēzes *knock-out* celmu oglekļa plūsmās un trehalozes koncentrācijā biomasā slāpekļa vai adenīna badinātiem celmiem šūnu straujās augšanas fāzes laikā. Auksotrofiem celmiem novēro samazinātu augšanas ātrumu un glikozes uzņemšanu, augot vidē bez slāpekļa vai bez adenīna. Celmiem novēro tendenci palielināties trehalozes sastāvam biomasā barotnē bez adenīna vai bez slāpekļa. Četriem adenīna badinātiem auksotrofiem celmiem novēro palielinātu oglekļa plūsmu ieguldījumu glicerola veidošanā un samazinātu biomasas veidošanā, jo īpaši celmam *Δade16-17*, kuram arī nenovēro izmaiņas augšanas ātrumos un glikozes patēriņā izmantotajās barotnēs.

Atslēgas vārdi: Purīnu auksotrofija, oglekļa plūsmas, centrālais oglekļa metabolisms, slāpekļa badināšana, adenīna badināšana.

SUMMARY

Observation of changes in carbon fluxes and proportion of trehalose in biomass were made using nitrogen or adenine starved *S. cerevisiae* yeast purine *de novo* synthesis *knock-out* strains during exponential cell growth. Decreased growth rates and glucose uptake was observed for nitrogen or adenine starved auxotrophic strains. A trend of increased proportion of trehalose was observed during growth in adenine or nitrogen starved conditions. An increase in glycerol carbon flux and a decrease in biomass carbon flux was observed in four auxotrophic strains during adenine starvation, especially in strain $\Delta ade16-17$. No changes in growth rate or glucose uptake were observed in strain $\Delta ade16-17$.

Key words: Purine auxotrophy, carbon flux, central carbon metabolism, nitrogen starvation, adenine starvation.

SATURS

Ievads	6
1. Literatūras apskats	7
1.1. Maizes rauga CEN.PK 113-7D raksturojums	7
1.2. Oglekļa centrālais metabolisms un slāpekļa aprite	8
1.3. Purīnu biosintēze	12
1.4. Augšana un badošanās	14
2. Materiāli un metodes	17
2.1. Izmantotā aparatūra, instrumenti un reaģenti	17
2.2. Izmantotie celmi	19
2.3. Izmantotās barotnes un kultivēšanas apstākļi	20
2.4. Kultivācija fermentatoros	21
2.5. Augšanas dinamikas un oglekļa plūsmu mērīšana	21
2.6. Oglekļa plūsmu aprēķini	22
2.6.1. Biomasa un celmu specifiskie augšanas ātrumi	22
2.6.2. Metabolītu ražošanas un patēriņa ātrumi	23
2.6.3. Makroskopiskā oglekļa bilance	23
2.7. Trehalozes noteikšana	24
2.8. Sausnas koncentrācija attiecībā uz OD vienību	25
2.9. Dehidrogenāžu aktivitātes noteikšana	25
2.10. Statistiskās metodes	26
3. Rezultāti	28
3.1. Izmaiņas šūnu augšanas parametros atkarībā no augšanas barotnes	28
3.2. Izmaiņas oglekļa centrālā metabolisma plūsmās	31
3.3. Izmaiņas rezerves ogļhidrāta trehalozes sastāvā	34
4. Diskusija	36
4.1. Šūnu reakcija uz slāpekļa vai adenīna badināšanu	36

4.2. Glicerīna un biomasas loma oglekļa plūsmu veidošanā prototrofam un auksotrofiem celmiem	37
4.3. Ar centrālo oglekļa metabolismu saistīto dehidrogenāžu aktivitāte	38
5. Secinājumi	40
Pateicības	41
Izmantotā literatūra	42
Pielikumi	45

IEVADS

Šajā darbā tiek apskatītas vairāku maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D celmu oglekļa plūsmas centrālajā oglekļa metabolismā, izmantojot glikozi kā vienīgo celmiem pieejamo oglekļa avotu. Nosakot koncentrāciju izmaiņas galvenajiem glikolītiskajiem produktiem, var sastādīt makroskopisko oglekļa bilanci un novērot, kuriem produktiem mainās no glikozes uzņemtās oglekļa plūsmas atkarībā no augšanas apstākļiem.

Adenīna badinātiem purīnu *de novo* sintēzes mutantiem var novērot izmaiņas fizioloģijā, kur tiem strauji samazinās šūnu augšanas ātrumi un novēro palielinātu izturību pret dažādiem vides stresiem (Ozolina et al. 2017). Purīnu auktrofija sastopama arī dabā atrodamiem iekššūnu patogēniem, piemēram, *Toxoplasma gondii* un *Plasmodium falciparum*, kuri uzņem nepieciešamos purīnus no apkārtējās vides. Tas norāda, ka mutācijas purīnu *de novo* sintēzē var sniegt organismiem priekšrocības, ieņemot noteiktas nišas (Kokina et al. 2019). Salīdzinot vairākus maizes rauga purīnu *de novo* sintēzes posma *knock-out* celmus, varētu spriest par sintēzes posmu delēciju ietekmi uz organisma metabolismu un tādā veidā gūt pilnīgāku priekšstatu par to pielāgošanās spējām vides apstākļiem. Tā kā purīnu *de novo* sintēze ir konservatīva starp eikarotiem, līdz ar to iegūtos rezultātus potenciāli iespējams attiecināt arī uz citiem organismiem (Agmon et al. 2020). Šūnas spēj reagēt uz slāpekļa badu, apstādinot šūnu dalīšanos un veicinot oksidatīvu metabolismu. Auktrofī celmi nemēdz izsaukt šādu atbildes reakciju uz stresu to auktrofās mutācijas komplementējošas barības vielas trūkuma gadījumā, tomēr pastāv izņēmumi, piemēram, metionīna vai glutamīna auktrofijas, kur šīs auktrofijas spēj imitēt kādas citas barības vielas trūkumu (Green et al. 2020).

Darba mērķis: Gūt ieskatu par centrālā oglekļa metabolisma izmaiņām maizes rauga CEN.PK 113-7D atsevišķu purīnu sintēzes ceļa *knock-out* celmos slāpekļa vai adenīna badināšanas apstākļos.

Darba uzdevumi:

1. Noteikt celmu turbiditāti (OD_{600nm}) atkarībā no sausā svara koncentrācijas ($gDW L^{-1}$) pilnajā barotnē adenīna vai slāpekļa badinātiem celmiem;
2. Noteikt celmu centrālā oglekļa metabolisma plūsmas un sastādīt to makroskopisko oglekļa bilanci;
3. Noteikt izmaiņas celmu uzkrātās trehalozes sastāvā adenīna vai slāpekļa badinātiem celmiem;
4. Veikt ar centrālā oglekļa metabolisma saistīto dehidrogenāžu aktivitātes mērījumus.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Maizes rauga CEN.PK 113-7D raksturojums

Raugi ir heterotrofi viensūnas sēņu valsts organismi, kuriem raksturīga alkohola fermentācija kā enerģijas ieguves ceļš. Tie spēj augt, izmantojot daudzveidīgu klāstu dabā sastopamu oglekļa avotu, piemēram, spirtus, organiskas skābes un aminoskābes. Enerģijas ieguvei raugi sniedz priekšroku cukuru (heksožu vai disaharīdu) izmantošanai, ja tie vidē ir pieejami (Rodriguez et al. 2006).

Pirms 25 gadiem pirmo reizi tika pilnībā nosekvenēts viensūnas eikariota – maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* genoms. Maizes raugs kā modeļorganisms sniedz tādas priekšrocības kā tā ērta kultivēšana, izmantojot definētas barotnes, vienkāršais dzīves cikls un mazs genoma izmērs, kas sastāv no ~6000 gēniem un 16 hromosomām. Vidēji ik pēc 2kb genoma var atrast proteīnu kodējošu gēnu, kas padara maizes rauga genomu kompaktāku nekā citiem eikariotu organismiem. Salīdzinājumam cilvēka organismā vidēji proteīnu kodējoša daļa sastopama ik pēc 30 kb (Goffeau et al. 1996).

CEN.PK 113-7D ir viens no maizes rauga celmiem, kuru pielieto laboratorijās pētījumu veikšanai. Šis celms tika iegūts 1990. gados, vācu raugu pētniekiem krustojot dažādus laboratorijas celmus. Rezultātā iegūtie CEN.PK celmi, jo īpaši *MATa* CEN.PK 113-7D, kļuviši par iecienītiem pētniecības objektiem, jo tie spēj efektīvi augt rūpnieciski nozīmīgos augšanas apstākļos un tos var manipulēt ar klasiskās vai molekulārās ģenētikas metodēm. CEN.PK celmiem nenovēro vairošanās tipa nomaiņu pat pēc ilglaicīgas kultivācijas hemostatos. Izmantojot *kanMX* kasetes, radīti prototrofi celmi, kuros ieviesti dominanti marķiergēni, un auktotrofi celmi, kuru auktotrofiju marķiergēnus iespējams komplementēt (van Dijken et al. 2000). CEN.PK 113-7D satur arī vairāku genoma reģiona atkārtojumus, kas domājams radušies genoma pilnīgas duplikācijas (angl. v. *whole-genome duplication*) rezultātā (Nijkamp et al. 2012). CEN.PK celmi tiek plaši pielietoti metabolisma un evolūcijas inženierijas pētījumos, piemēram, pētot pentozu fermentāciju, etanola un spirtu ražošanu, kā arī laktāta un piruvāta ražošanu (Nijkamp et al. 2012).

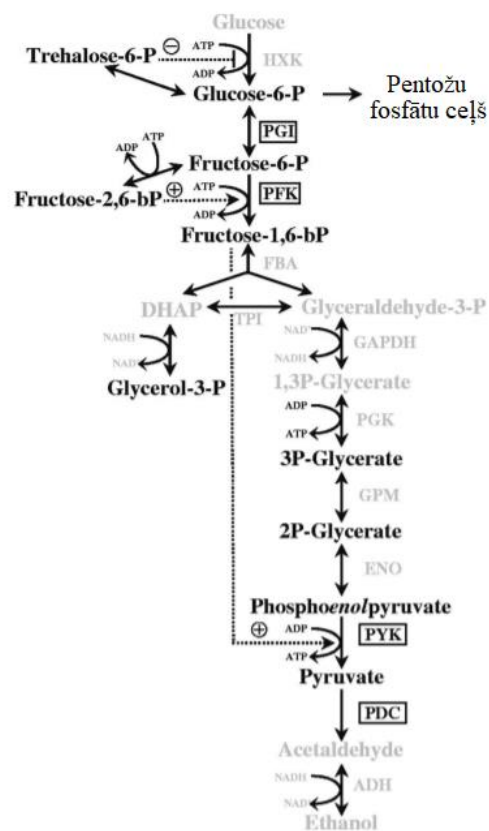
Salīdzinot CEN.PK 113-7D ar ģealoģijas pētījumiem izmantoto S288C (Mortimer & Johnston 1986), kura genomam arī ir pieejamas kvalitatīvas sekvences kopš 1996. gada (Nijkamp et al. 2012) var novērot samazinātu ORF skaitu CEN.PK 113-7D celmam. CEN.PK 113-7D genoma izmērs ir 11.6 Mbp ar 5472 ORF. S288C ir 5538 ORF. Fizioloģiski CEN.PK 113-7D atšķiras no S228C celma ar spējām pārtikt no maltozes kā vienīgā oglekļa avota un biotīna prototrofiju, kaut arī tiek uzskatīts, ka vairums maizes rauga celmu ir biotīna auktotrofi (Nijkamp et al. 2012).

1.2. Oglekļa centrālais metabolisms un slāpekļa aprīte

Glikozes klātbūtne vidē izraisa maizes rauga metabolisma remodelēšanu, ierosinot pārmaiņas iekššūnu metabolītu koncentrācijās, proteīnu un mRNS stabilitātē un daudzu gēnu transkripcijā (Gancedo 2008). Šī metabolisma remodelēšana virzīta augšanas ātruma palielināšanā (Kayikci & Nielsen 2015). Kamēr vidē ir pieejama glikoze, šūnas metabolisms tiek virzīts uz glikozes uzņemšanu un patēriņu, nepatērējot citus oglekļa avotus (Broach 2012). Šo fenomenu arī dēvē par glikozes represiju. Kad vidē esošā glikoze ir iztērēta, šūnas pāriet no fermentatīva uz respiratoro metabolismu, kurā šūnas patērē skābekli un neveido spirtu. Plazmatiskās membrānas proteīni Snf3/Rgt2 detektē ārpusšūnas glikozes daudzumus un regulē tās uzņemšanu, uzsākot arī glikozes represiju. Glikozes līmenim barotnē nokrītot līdz aptuveni 0.2%, aktivējas serīna/treonīna kināze Snf1, kas atbrīvo šūnu no glikozes represijas (Kayikci & Nielsen 2015).

Raugam uzņemot glikozi, oglekļa plūsmas veidosies caur centrālā metabolisma ceļiem. Plūsmu apjoms katrā no metaboliskajiem ceļiem ir atkarīgs no enzīmu aktivitātēm, ko var noteikt, izejot no metabolisko produktu veidošanās ātrumiem (Hagman & Piškur 2015). Anabolisko metabolisma ceļu oglekļa plūsmas rezultēsies biomasas veidošanā, savukārt katabolisko metabolisma ceļu plūsmas rezultēsies vai nu CO₂ producēšanā pilnīgas respirācijas jeb aerobās elpošanas gadījumā, vai arī CO₂ un metabolītu, piemēram, etanola, producēšanā caur anaerobo glikolīzi (Hagman & Piškur 2015).

Lai noteiktu svarīgākos metabolītus, kas sastādītu oglekļa plūsmas ar glikozi kā vienīgo oglekļa avotu, nepieciešams apskatīt glikolītisko ceļu, kuru raugs izmanto etanola ražošanai (1. attēls).



1. attēls. Glikolītiskais metaboliskais ceļš maizes raugā. Punktotās līnijas norāda uz aktivējošu (+) vai inhibējošu (-) metabolītu iedarbību uz enzīmiem (Brink et al. 2008).

Figure 1. Glycolytic pathway in *S. cerevisiae*. The dotted lines indicate activating (+) or inhibiting (-) actions of metabolites on enzymes (Brink et al. 2008).

Etanols ir glikozes fermentācijas galaprodukts. Etanola un tā blakusprodukta CO₂ veidošanā var tikt patērēts līdz pat 90% uzņemtās glikozes oglekļa daudzuma. Papildus etanolam veidojas arī citi metabolisma produkti, piemēram, glicerīns, acetāts, laktāts, piruvāts, sukcināts un acetaldehīds (Brink et al. 2005).

Anaerobos vides apstākļos novērojama glicerīna jeb glicerola veidošanās. Glicerols tiek uzskatīts par svarīgu NADH reducējošā potenciāla uzkrājējmetabolītu, veidojoties biomasai (Brink et al. 2005; Rodriguez et al. 2006). Tas veidojas dihidroksiacetona fosfāta un glicerola-3-fosfāta (DHAP-G3P) metaboliskajā ceļā (1. attēls), kur dihidroksiacetona fosfāts tiek reducēts par glicerola-3-fosfātu, kurš savukārt tiek defosforilēts, veidojot glicerolu kā produktu (Rodriguez et al. 2006). Glicerols arī veidojas, atbildot uz osmotisku stresu, piemēram, nonākot ar cukuriem bagātā vidē. Glicerols var kalpot kā osmolīts, lai šūnas nezaudētu savu tilpumu hiper-osmotiskā vidē (Hohmann 2015).

Trehaloze veidojas, trehalozes-6-fosfāta sintāzei (TPS) apvienojot glikozes-6-fosfātu (G6P) un uracil-difosfāta glikozi (UDP). Trehalozes-6-fosfāta fosfatāze (TPP) defosforilē TPS produktu un veido trehalozi. Trehaloze ir viens no rauga veidotiem rezerves ogļhidrātiem, kā arī tā ir saistīta ar šūnu dzīvotspējas atgūšanu pēc dehidrācijas vai

sasaldēšanas. Trehaloze uzkrājas šūnās, kad sāk pietrūkt oglekļa un enerģijas avotu, proti, tuvojoties stacionārajai augšanas fāzei ar barības vielām bagātā barotnē. Atkarībā no augšanas apstākļiem trehalozes daudzums var variēt no 1 līdz 20% šūnas sausnas (Eleutherio et al. 2015). Trehalozi parasti nenovēro eksponenciālās augšanas sākumā, bet dažādu stresu ietekmē, piemēram, karstuma stresa ietekmē, šūnas spēj uzkrāt lielus trehalozes daudzumus. Izzūdot stresam vai atjaunojot trūkstošās barības vielas trehaloze tiek strauji sašķelta (Eleutherio et al. 2015).

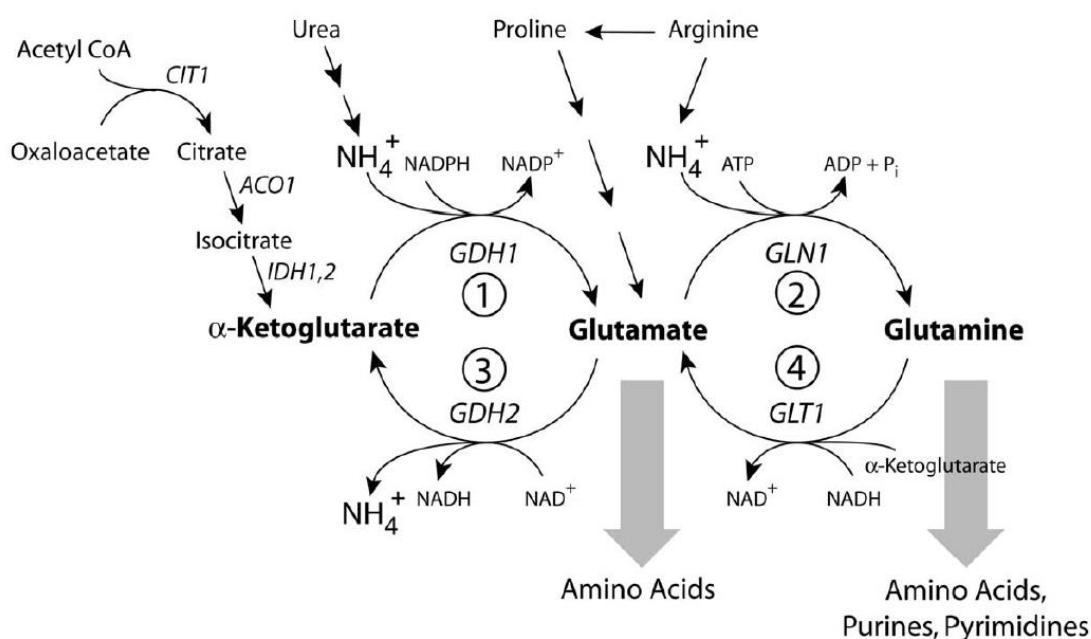
Glikolītiskā ceļa galaprodukts ir piruvāts. No piruvāta oglekļa plūsmas var tikt virzītas uz fermentatīvu metabolismu, veidojot etanolu, vai respiratīvu metabolismu, iesaistot uzņemto oglekli trikarbonskābju (TCA) ciklā. Kad piruvāts ir iekļuvis mitohondrijā, piruvāta dehidrogenāze (PDH) to pārveido par acetil-kofaktoru A (acetil-KoA). Piruvātu arī var pārveidot par acetil-KoA citosolā, neizmantojot PDH mitohondrijos. Šādā veidā piruvātu dekarboksilē par acetaldehīdu, kuru acetaldehīda dehidrogenāze pārveido par acetātu. Acetātu tālāk var izmantot acetil-KoA sintēzei citosolā. Šie divi ceļi (PDH ceļš vai tā apiešana) kalpo attiecīgi kā respiratīvais vai fermentatīvais oglekļa plūsmu ceļš (Rodriguez et al. 2006). Zemas glikolītiskas aktivitātes gadījumos oglekļa plūsmas tiek novirzītas uz respiratīvo PDH ceļu, savukārt augstas glikolītiskas aktivitātes gadījumos PDH ceļš tiek apiets, sintezējot acetil-KoA citosolā, kā arī norisinās acetaldehīda fermentācija par etanolu (Rodriguez et al. 2006).

Ogļskābē gāze ir galaprodukts, kas var rasties gan respirācijas, gan fermentācijas rezultātā (Hagman & Piškur 2015). Fermentācijā radušais CO₂ rodas, piruvāta dekarboksilāzei atšķeļot oglekli no piruvāta, veidojot acetaldehīdu un CO₂ (Rodriguez et al. 2006). Respiratīvās augšanas gadījumā CO₂ rodas trikarbonskābju (TCA) ciklā, kur tas veidojas divās reakcijās: oksidatīvā izocitrāca dekarboksilācijā par α -ketoglutarātu un oksidatīvā α -ketoglutarāta dekarboksilācijā, izmantojot sukcinil-KoA un veidojoties sukcinātam un CO₂ (Rodriguez et al. 2006). Svarīgi piebilst, ka TCA ciklā, rodoties CO₂, tiek patērēts skābeklis, bet, fermentatīvi veidojoties CO₂, skābekļa patēriņš nenotiek (Hagman & Piškur 2015).

Maizes rauga CEN.PK 113-7D empīriskā viena C-mola biomasas formula ir CH_{1.748}N_{0.148}O_{0.596}P_{0.009}S_{0.0019}M_{0.018} ar molmasu 26.4 g mol⁻¹, kur M apzīmē metālu mikroelementu K, Mg, Na, Ca, Fe, Mn, Cu un Zn sastāvu ar vidējo molmasu 37.2 g mol⁻¹ (Lange & Heijnen 2001). Biomasa ir oglekļa plūsmu anabolisko metabolisma ceļu produkts (Hagman & Piškur 2015).

Maizes raugs kā galvenos slāpekļa avotus izmanto glutamīnu un asparģīnu, ja tie vidē ir pieejami. Šūnās norisinās slāpekļa katabolītu represija, kas, ja ir aktīva, liedz alternatīvu slāpekļa avotu izmantošanu (Magasanik & Kaiser 2002). Maizes raugs spēj arī izmantot

amonija jonus kā slāpekļa avotu, ja vidē nav glutamīna. Amonija joni tiek iesaistīti TCA ciklā, izmantojot NADPH un H^+ un pievienojot NH_4^+ TCA cikla starpmetabolītam α -ketoglutarātam, veidojot glutamātu (glutamīnskābi) kā produktu. Tālākā reakcijā iespējams pievienot papildus NH_4^+ glutamātam, lai veidotu glutamīnu, patērējot ATP. Glutamāts un glutamīns ir galvenie slāpekļa donori slāpekli saturošu savienojumu biosintēzei šūnā (2. attēls) (Magasanik & Kaiser 2002).

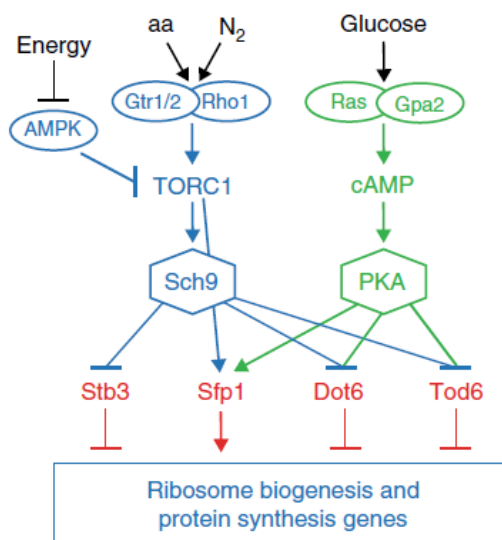


2. attēls. Centrālie slāpekļa metabolisma ceļi. Slāpekli saturoši savienojumi šūnā tiek sintezēti vai nu izmantojot glutamātu, vai arī glutamīnu. Slīprakstā parādīti maizes rauga reakciju katalizējošo enzīmu gēni (Magasanik & Kaiser 2002).

Figure 2. Central pathways for nitrogen metabolism. The nitrogenous compounds in cell are synthesized from either glutamate or glutamine. The *S. cerevisiae* gene for each of the enzymatic steps is designated in italics (Magasanik & Kaiser 2002).

Būtiskākie regulatori, kas kontrolē šūnas augšanu atkarībā no glikozes vai slāpekļa pieejamības, ir cAMP atkarīgo proteīnu kināžu signālceļš PKA un rapamicīna mērķa signālceļa (angl. *target of rapamycin*) kināžu komplekss I TORC1 (3. attēls) (Broach 2012; Kunkel et al. 2019). Gan TORC1, gan PKA regulē ribosomu un proteīnu sintēzes gēnu ekspresiju, bet šie kompleksi atbild uz atšķirīgiem stimuliem. PKA kināzes aktivē glikozes vai citu fermentējamu cukuru klātbūtne, savukārt TORC1 aktivē slāpekļa, aminoskābju pieejamība un iekššūnas enerģētisku savienojumu klātbūtne (Kunkel et al. 2019). Zemas iekššūnas AMP:ATP proporcijas gadījumā novēro palielinātu proteīnu kināzes SNF1

aktivitāti, kas pieder pie adenoīna monofosfāta-aktivētām proteīnu kināzēm AMPK maizes raugā (Hedbacker & Carlson, 2008). TORC1 signālceļu represē AMPK (Kunkel et al. 2019).



3. attēls. TORC1-PKA signālceļu shematiskais modelis. TORC1 un PKA kināzes regulē transkripcionālo aktivatoru Sfp1 un transkripcionālos represorus Stb3 un Dot6/Tod6 (Kunkel et al. 2019).

Figure 3. Working model of the TORC1-PKA signaling circuit. The TORC1 and PKA kinases regulate the transcriptional activator, Sfp1, and the transcriptional repressors, Stb3 and Dot6/Tod6 (Kunkel et al. 2019).

PKA signālceļš ierosina strauju šūnu augšanu, šūnām nokļūstot ar glikozi bagātā vidē, kā arī PKA ierosina palēlinātu šūnu augšanu, kad glikoze vairs nav pieejama. TORC1 nosaka šūnu augšanas ātrumu, nemainoties augšanas fāzei (angl. *steady-state*), atkarībā no vidē pieejamā slāpekļa avota un enerģijas resursiem (Kunkel et al. 2019).

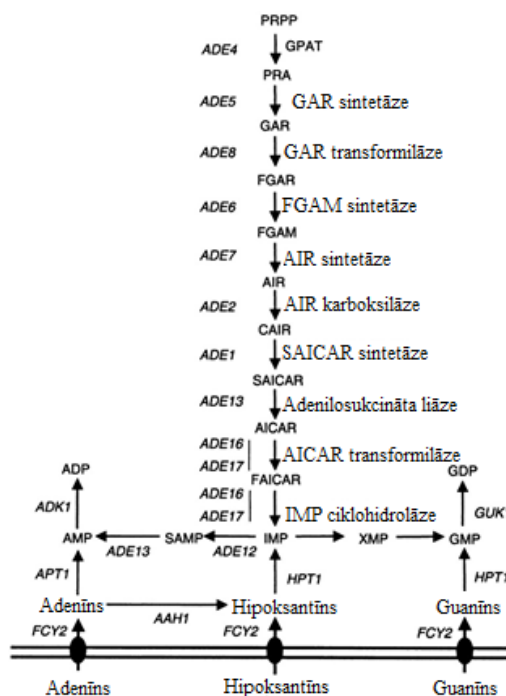
1.3. Purīnu biosintēze

Purīnu sintēzei izmantotais substrāts ir fosforibozil pirofosfāts (PRPP). Tas tiek iegūts pentožu fosfātu metaboliskajā ceļā (1. pielikums) (Vaseghi et al. 1999; Pedley & Benkovic, 2017). Purīnu biosintēzes galā veidojas produkts adenīna monofosfāts (AMP) (4. attēls) (Rébora et al. 2001), kas tālāk iesaistās dažādos šūnas procesos, piemēram, nukleotīdu sintēzē. Purīnu sintēzes ceļš, kā arī tā regulācija ir konservatīva starp dažādām filoģenētiskām grupām piederošiem eikariotiem, uz ko norāda arī spēja BY4741 celmam augt vidē bez adenīna, kaut arī visa tā purīnu *de novo* sintēze aizvietota ar cilvēka ortologiem (Agmon et al. 2020).

Purīnu sintēzei nepieciešamas aminoskābes glutamīns, glicīns, asparģīnskābe, kuras veidojas no TCA cikla starpproduktiem. Sintēzei arī nepieciešams papildus ATP, formiāts un CO₂ (Pedley & Benkovic 2017).

AMP *de novo* biosintēzes gēni tiek represēti transkripcijas līmenī, ja vidē ir pieejami purīni. *ADE* gēnu represija norisinās, ja šūnā iekļuvušais adenīns tiek metabolizēts par AMP, veidojot hipoksantīnu un IMP, un tālāk fosforilēts par ADP. Lai aktivētu *ADE* gēnus, nepieciešami divi transkripcijas faktori - Bas1p un Bas2p -, kuru darbībai vajadzīga *ADE* sintēzes gaitā radušos starpmetabolītu SAICAR un AICAR klātbūtne. SAICAR sintezē Ade1p, savukārt AICAR – Ade13p. Purīnu *de novo* sintēzes gaitu arī regulē pirmais sintēzes ceļa proteīns Ade4p, kuru inhibē ATP (Rébora et al. 2001).

Purīnu biosintēze ir resursu ietilpīga, jo viena nukleotīda un visu nepieciešamo starpmetabolītu sintēze prasa aptuveni 50 ATP molekulas (Lynch & Marinov 2015). Purīnu auksotrofija un limitācija spēj organismiem izsaukt stresa tolerances fenotipu, kas var sniegt priekšrocības organismu fitnesam atkarībā no vides apstākļiem (Kokina et al. 2019). Stresa tolerances fenotipu iespējams arī izsaukt maizes rauga purīnu auksotrofiem, kuriem uzlabojas dzīvotspēja pēc to desikācijas (žāvēšanas), kad tie kultivēti barotnē bez adenīna (Ozolina et al.



2017).

4. attēls. Shematisks purīnu biosintēzes attēlojums maizes raugā. Attēls ņemts ar izmaiņām no Rébora et al. (2001).

Figure 4. Schematic representation of purine biosynthesis in *S. cerevisiae*. Figure is taken with changes from Rébora et al. (2001).

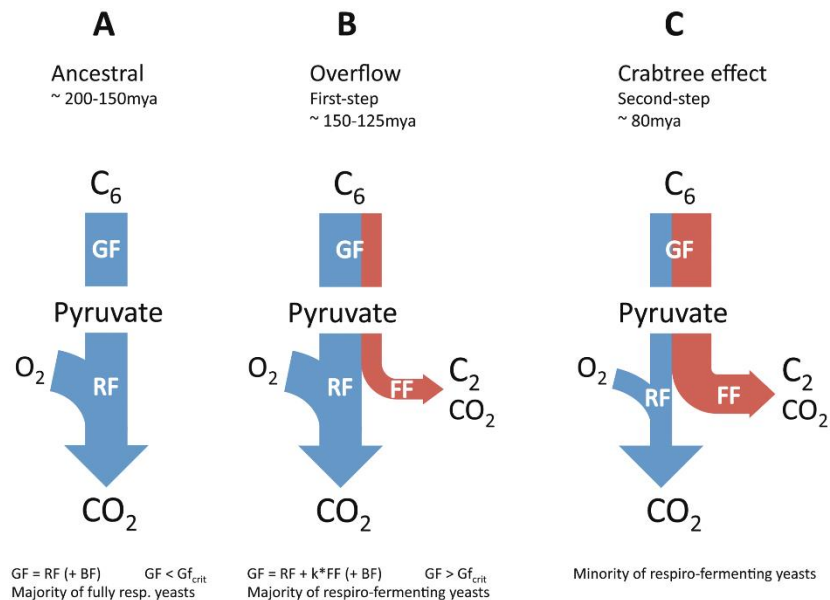
Purīnu auksotrofijas var piemist arī dabā sastopamiem organismiem. Visi parazītiskie protozoji un vairāki iekššūnu bakteriālie patogēni ir purīnu auksotrofi. Pazīstamākie piemēri ir *Toxoplasma gondii* un *Plasmodium falciparum* (Kokina et al. 2019 cit. pēc Weiss & Kim 2011, Downie et al. 2008).

Raugu ģenētikā pielieto marķieru gēnus, kas kodē kādu barības vielu nepieciešamību. Šos marķiergēnus izmanto kā alternatīvu, piemēram, antibiotiku rezistences gēniem, kas ir toksiski un kuru lietošana var palielināt izmaksas apjomīgas kultivēšanas gadījumā. Šie marķiergēni tiek izmantoti, lai ieviestu auksotrofijas raugu celmiem viena gēna izslēgšanas jeb *knock-out* mutāciju veidā (Pronk 2002).

Par purīnu auksotrofiem sauc tādus organismus, kas ir zaudējuši spēju sintezēt purīnus, turpretim organismus, kas to spēj, sauc par purīnu prototrofiem. Papildus purīnu auksotrofijām pastāv vēl aminoskābju histidīna, leicīna, triptofāna, metionīna un citu aminoskābju, kā arī pirimidīna, uracila un citas auksotrofijas (*his*, *leu*, *trp*, *met*, *ura*, u.c.), kuras bieži tiek pielietotas, jo īpaši fizioloģijas pētījumos. Auksotrofijas var piemist vairākām maizes rauga laboratorijas celmu sērijām (W303, S288C, CEN.PK un FY) (Kokina et al. 2014; Pronk 2002).

1.4. Augšana un badošanās

Augu augļi satur lielus daudzumus mono- un oligo-saharīdu, kas ir iecienīts mikroorganismu augšanas substrāts. Kad augļi nogatavojas, parasti raugi kļūst par galveno sastopamo mikroorganismu grupu, kas tiek pie šiem cukuriem. Raugiem piemīt spēja pārvērst vienkāršus cukurus etanolā pat skābekļa klātbūtnē, ko arī izmanto kā galveno enerģijas avotu augšanai. Šo dēvē par *Crabtree* efektu (Hagman et al. 2013). *Crabtree* efektu var izdalīt divās formās – īstermiņa un ilgtermiņa *Crabtree* efekts -, kur abas piemīt maizes rauga celmiem. Ilgtermiņa *Crabtree* efektu raksturo alkohola fermentācija aerobos *steady-state* augšanas apstākļos ar lielu augšanas ātrumu. Īstermiņa *Crabtree* raksturo tūlītēja alkohola fermentācija aerobos un cukura limitētos apstākļos, ko novēro respiratīvi augošām šūnām pievienojot papildus cukuru (Hagman & Piškur 2015). Domājams, ka abas šīs formas, jo īpaši īstermiņa *Crabtree* efektu, izraisa pārplūdes (angl. *overflow*) metabolisms. Īstermiņa *Crabtree* pozitīvi raugi saglabā pastiprinātu anaerobo glikolīzi pat “badinātos” augšanas apstākļos un, tiklīdz tiem tiek pievadīts glikozes pulss, tie spēj pastiprināti uzņemt glikozi un palielināt uz fermentatīvo metabolismu novadītās oglekļa plūsmas (5. attēls). Ilgtermiņa *Crabtree* pozitīviem raugiem papildus pārplūdes metabolismam izpaužas glikozes represēta respirācija. Vidēji, salīdzinot vairākas raugu sugas, pārplūdes metabolisms iestājas tad, kad glikozes uzņemšana pārsniedz $15 \text{ C-mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (angl. *DW – dry weight*) (Hagman & Piškur).



5. attēls. Evolucionārais scenārijs Crabtree efekta pirmsākumam *Saccharomycetales* raugiem, kur ietilpst arī maizes raugs (Hagman & Piškur 2015).

Figure 5. Evolutionary scenario for the origin of Crabtree effect in *Saccharomycetales* yeast. (Hagman & Piškur 2015).

Šūnas koordinē savu augšanu ar barības vielu pieejamību vidē. Slāpekļa, fosfāta vai sēra badinātām šūnām novēro šūnu arestu stacionārajā augšanas fāzē un glikozes fermentācijas nomākšanu (Broach 2012). Ja kāda no “dabiskām” jeb dabiskos augšanas apstākļos sastopamām barības vielām trūkst, šūnā tiek ierosināta atbildes reakcija uz stresu. Šūnām palielinās rezistence pret tādiem faktoriem kā karstums vai augsta osmolaritāte, arestējas šūnu dalīšanās cikls, palielinās oksidatīvā metabolisma aktivitāte, kā arī izpaužas šūnu autofāģija, kur tās degradē un reciklē savu citosolu un organoīdus. Šī atbildes reakcija uz stresu palielina šūnu dzīvotspēju (Green et al. 2020). Raugu auktrotrofiju izraisītas “nedabiskas” barības vielu limitācijas traucē no barības vielu pieejamības atkarīgu augšanas regulāciju. Šūnām ir traucēta spēja veikt atbildes reakciju uz stresu, kas samazina to dzīvotspēju (Green et al. 2020). Tomēr dažos gadījumos auktrotrofu vielu limitācija spēj imitēt dabisku barības vielu limitācijas (glutamīna trūkums var atspoguļot slāpekļa pieejamību un metionīna trūkums – sēra vai vispārīgu aminoskābju pieejamību) (Green et al. 2020).

Kaut arī, mērot mRNS daudzumu šūnās un izmantojot DNS mikrorindas (angl. *DNA microarrays*), aptuveni 27% rauga gēnu ekspresijas novērojama korelācija ar to augšanas ātrumu neatkarīgi no trūkstošās barības vielas (Brauer et al. 2008), šūnas metabolītu koncentrācijas var mainīties atkarībā no trūkstošās barības vielas. Slāpekļa avota amonija jonu un oglekļa avota glikozes trūkumu raksturo zemi iekššūnas aminoskābju un augsti nukleotīdu daudzumi (Boer et al. 2010). Šādu barības vielu trūkumus šūnas spēj sajūst ar to virsmas receptoriem. Šūnas spēj “sajūst” arī auktrotrofu barības vielu trūkumu, ja ir notikušas

mutācijas biosintēzes ceļos un pielāgot savu augšanas ātrumu atkarībā no šo vielu pieejamības. Domājams, ka šāda atbilde rodas, ja kāds no iekššūnas metabolītiem kļūst augšanas-limitējošs ārpusšūnu barības vielu trūkuma dēļ (Boer et al. 2010). Piemēram, pirimidīnu auktrotrofiem uracila limitācijas gadījumā samazinās šūnas uridīna trifosfāta (UTP) un citozīna trifosfāta (CTP) daudzumi, kas samazina RNS sintēzi un izraisa lēnāku augšanu (Boer et al. 2010).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Izmantotā aparātūra, instrumenti un reaģenti

Izmantotā aparātūra, instrumenti, iekārtas un reaģenti attēloti tabulās (1. tabula; 2. tabula).

1. tabula

Izmantotā aparātūra

Table 1

Equipment used in this research

Aparātūra Equipment	Ražotājs Producer	Valsts State
Kratītājs – inkubators Incubator Shaker Series I 26	New Brunswick Scientific	Vācija
Kratītājs – inkubators Environmental Shaker – incubator ES-20	BIOSAN	Latvija
Laminārās plūsmas skapis FlowFast V 12P	Via Vespucci	Itālija
Spektrofotometrs HALO VIS-20	Dynamica	Šveice
Autoklāvs MLS-3750	Sanyo	Japāna
Centrifūga 5810 R	Eppendorf	Vācija
Centrifūga 1-16 (13000 apgr. min ⁻¹)	SIGMA Laboratories	Vācija
pH metrs pH 211 Microprocessor pH Meter	HANNA instruments	Rumānija
Anālītiskie svāri Electronic Balance ABJ 120-4M WB0540098	KERN & Sohn GmbH	Vācija
Agilent 1100 Series HPLC sistēma	Agilent	Vācija
Fermentators/Bioreaktors BIOSTAT Qplus	Sartorius Stedim Systems GmbH	Vācija
Sausā bloka termostats Thermo Block TDB-120	BIOSAN	Latvija
Elektriskais sausā gaisa termostats KC-65	Nav zināms	Nav zināms
Plašu lasītājs Infinite M200 Pro	TECAN	Šveice
Gāzu analizators	Infors HT	Šveice

Chemical agents used in this research

Reaģents Chemical agent	Ražotājs Producent	Valsts State
HCl	Enola	Latvija
KOH	Firma Chempur	Polija
Tetraciklīns (NT)	Sigma – Aldrich	Francija
D-glikozes monohidrāts	Sigma – Aldrich	Francija
Adenīna hemisulfāta sāls	Sigma – Aldrich	Ķīna
Nātrija piruvāts	Enola	Latvija
Glicerīns	Enola	Latvija
Etiķskābe	Enola	Latvija
Sukcināts	Sigma-Aldrich	Vācija
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	Vācija
KCl	Sigma-Aldrich	Vācija
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	Реахим	Krievija
CaCl ₂ (anhidrāts)	Penta	Lietuva
MgSO ₄ *7H ₂ O	Реахим	Krievija
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	Nīderlande
H ₃ BO ₃	Реахим	Krievija
CuSO ₄ *5H ₂ O	Реахим	Krievija
KI	Реахим	Krievija
FeCl ₃	Sigma-Aldrich	Vācija
MnSO ₄	Союзреактив	Krievija
ZnSO ₄	Sigma-Aldrich	Vācija
d-biotīns	Sigma Chemical Company	ASV
Myo-inositols	Sigma Chemical Company	ASV
p-aminobenzoskābe	Sigma Chemical Company	ASV
Piridoksīna hidrohlorīds	SERVA Feinbiochemica Heidelberg	Vācija
Tiamīna hidrohlorīds	Sigma-Adrich	Vācija
Riboflavīns	AppliChem GmbH	Vācija
Niacīns	Sigma-Aldrich	Ķīna
Folijskābe	Sigma-Aldrich	Ķīna

Kalcija pantotenāts	Sigma-Aldrich	Vācija
H ₂ SO ₄	Enola	Latvija
Glikozes-6-fosfāts	Roche Diagnostics	ASV
Glicerīna-3-fosfāts	Roche Diagnostics	ASV
96% Etanols	[Jāpajautā]	[Jāpajautā]
Digitonīns	Nav zināms	Nav zināms
Fenazīna metosulfāts	Sigma-Aldrich	ASV
Jodnitrotetrazolija hlorīds	Sigma-Aldrich	Austrija
D-(+)-Trehalozes dihidrāts	Sigma-Aldrich	ASV
Trizma bāze	Sigma-Aldrich	ASV
Antrons	Sigma Chemical Co.	ASV
L-Histidīns	Sigma Chemical Co.	Japāna
NADP dinātrija sāls	Roche Diagnostics	Vācija
cOmplete™, Mini, EDTA- nesaturošs proteāžu inhibitoru kokteilis	Roche Diagnostics	Vācija

2.2. Izmantotie celmi

Pētījumam tika izmantots maizes rauga celms CEN.PK 113-7D MATa, kas ir dāvana no Peter Richard, VTT Biotechnology, Finland un LU MBI kolekcijā esošie adenīna mutanti (3. tabula), kuri veidoti uz iepriekš norādītā CEN.PK113-7D MATa bāzes. Celmi ilgstošai uzglabāšanai turēti 0.9% NaCl, 15% glicerīnā -80°C temperatūrā. Pirms ietošanas tie tiek izsēti uz YPG (angl. *yeast peptone glucose*) agara platēm un šādā veidā uzglabāti +4°C temperatūrā ne ilgāk par trim mēnešiem un netiek pārsēti vairāk kā piecas reizes.

3. tabula

Izmantotie CEN.PK113-7D MATa celmi

Table 3

Used CEN.PK113-7D MATa strains

Celmu genotipi Strain genotype	Celmu nosaukumi tekstā Strains in text
CEN.PK113-7D MATa <i>MAL2-8C SUC2</i>	prototrofs
CEN.PK113-7D MATa <i>MAL2-8C SUC2 Δade1::kanMX4</i>	<i>Δade1</i>
CEN.PK113-7D MATa <i>MAL2-8C SUC2 Δade2::kanMX4</i>	<i>Δade2</i>
CEN.PK113-7D MATa <i>MAL2-8C SUC2 Δade4::kanMX4</i>	<i>Δade4</i>
CEN.PK113-7D MATa <i>MAL2-8C SUC2 Δade5,7::kanMX4</i>	<i>Δade5,7</i>

CEN.PK113-7D MATa MAL2-8C SUC2 $\Delta ade6::kanMX4$	$\Delta ade6$
CEN.PK113-7D MATa MAL2-8C SUC2 $\Delta ade8::kanMX4$	$\Delta ade8$
CEN.PK113-7D MATa MAL2-8C SUC2 $\Delta ade16::kanMX4 \Delta ade17::kanMX4$	$\Delta ade16-17$

2.3. Izmantotās barotnes un kultivēšanas apstākļi

Celms kultivē šķidrās SD (angl. *Synthetic defined*) barotnēs, kuras arī mēdz dēvēt par YNB (angl. *Yeast nitrogen base*) barotnēm. Viens litrs barotnes sastāv no 100 mg $CaCl_2$, 100 mg NaCl, 500 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1000 mg KH_2PO_4 , 5000 mg $(NH_4)_2SO_4$. Nepieciešamie vitamīnu daudzumi, lai pagatavotu vienu litru barotnes, ir 2 μg biotīna, 400 μg kalcijs pantotenāta, 2 μg folijskābes, 2 mg inositola, 400 μg niacīna, 200 μg p-aminobenzoskābes, 400 μg piridoksīna hidrohlorīda, 200 μg riboflavīna un 400 μg tiamīna hidrohlorīda. Mikroelementu sāļu daudzumi viena litra barotnes sagatavošanai ir 500 μg H_3BO_3 , 40 μg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 μg KI, 200 μg $FeCl_3$, 400 μg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 200 μg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 400 μg $ZnSO_4$. Vienīgais oglekļa avots ir glikoze ar 2% koncentrāciju. Lai kultivētajiem celmiem nodrošinātu augšanas apstākļus bez pieejama slāpekļa, papildus pagatavo šķidrās SD barotnes bez slāpekļa avota - amonija sulfāta (Dunham & Mitchell 2010). Celms audzē trīs dažādos apstākļos: SD barotnē, kurā pievienots adenīns (SD+), SD barotnē, kurā nav pievienots adenīns (ade-) un SD barotnē bez pievienota slāpekļa avota (N-).

SD barotnei nepieciešamos neorganiskos sāļus nosver un ieliek stikla burkā. Pievieno papildus mikroelementu sāļus un vitamīnus, kā arī destilētu ūdeni un tad sterilizē autoklāvā 20 minūtes 121°C temperatūrā. Ņem vērā, ka SD sāļu maisījumam jāpievieno par desmito daļu tilpuma mazāk destilētā ūdens, jo atsevišķi pagatavo 20% sterila glikozes šķīduma, kuru pievieno klāt tieši pirms celmu inokulēšanas. Papildus glikozei pievieno arī 70% etanolā izšķīdinātu tetraciklīnu līdz gala koncentrācijai 7.5 $\mu g mL^{-1}$, lai samazinātu mikrobioloģiska piesārņojuma risku. SD barotnei, ko paredzēts izmantot kultivēšanai fermentatoros, pirms sterilizācijas papildus kalibrē barotnes pH līdz ~5.6, izmantojot 1 M KOH vai 1 M HCl šķīdumus.

No uzglabātajām celmu kultūrām izvēlas atsevišķu koloniju, kuru inokulē SD barotnē. Gadījumos, ja audzē celmu ar auktrofiju, pievieno atbilstošo auktrofijas faktoru – adenīnu vai histidīnu -, lai gala koncentrācija būtu 100 $mg L^{-1}$ (Kokina et al. 2014). Šūnu suspensiju inkubē 30°C temperatūrā ar kratīšanās ātrumu 180 apgr. min^{-1} 12-24 stundas.

Šūnu suspensijām, izmantojot kolorimetru, nosaka optisko blīvumu jeb turbiditāti (OD) pie viļņa garuma λ_{600nm} . Lai nodrošinātu pietiekamu šūnu daudzumu un to atrašanos eksponenciālā augšanas fāzē uz periodiskās kultivācijas (angl. v. – *batch growth*) uzsākšanas

brīdi, šūnas inokulē svaigās barotnēs. Pārsēšanai nepieciešamo tilpumu rēķina pēc formulas:

$$V_x = \frac{V_{gala\ šķ.} * 10^3 * OD_{gala\ šķ.}}{OD_{naktsk.} * 2^t}$$

V_x – no šūnu suspensijas ņemamais tilpums, μL

$V_{gala\ šķ.}$ – barotnes tilpums šūnu pavairošanai, mL

$OD_{gala\ šķ.}$ – sasniedzamais OD pavairošanas beigās, abs. v.

$OD_{naktsk.}$ – ar kolorimetru noteiktais OD šūnu suspensijai, abs. v.

T – kopējais inkubācijas laiks, h

t – pieņemtais maizes rauga celma dalīšanās laiks, h

2.4. Kultivācija fermentatoros

Nepieciešamais sākuma OD fermentatoros, kuros ir SD barotne ar visiem auktrotrofijas faktoriem ir ~ 1.0 abs. v., savukārt barotnēm bez auktrotrofijas faktoriem vai bez slāpekļa nodrošina sākuma OD ~ 2.0 abs. v.

Fermentatorus pirms un pēc lietošanas iztīra un izskalo ar 96% etanolu un pēc tam ar destilētu ūdeni. Tiem pievieno SD barotni, kurai kalibrēts pH un tetraciklīna šķīdumu 70% etanolā. Ar kokvilnas vati un alumīnija foliju noslēdz visas atveres, kas savieno barotni ar ārējo vidi. Ar alumīnija foliju noklāj arī elektronisko mērierīču portus. Ienākošā gaisa padevi un parauga ņemšanas atveri noslēdz ar slēdžiem. Fermentatorus sterilizē autoklāvā 20 minūtes 121°C temperatūrā. Pirms sterilizācijas uzsākšanas, jāpārliedz, lai temperatūras regulācijas nodalījums fermentatorā nebūtu noslēgts. Pretējā gadījumā spiediena paaugstināšanās to spētu sabojāt.

Eksponenciālā augšanas fāzē esošās šūnas izdala no suspensijas ar centrifūgu trīs minūtes pie $4000\text{ apgr. min}^{-1}$. Pēc tam mazgā divreiz ar sterilu destilētu ūdeni. Šūnas resuspendē svaigā SD barotnē un sadala pa fermentatoriem, lai katram celmam būtu trīs bioloģiskie atkārtojumi katrā kultivēšanas barotnē. Pirms šūnu pievienošanas fermentatoru barotnēm pievieno glikozi un, ja nepieciešams, trūkstozo auktrotrofijas faktoru. Sterilitāti, pievienojot šūnas fermentatoriem, nodrošina ar liesmu.

Fermentācijai uzstāda gaisa plūsmas ātrumu 1.0L L^{-1} , barotnes maisīšanas ātrumu $300\text{ apgr. min}^{-1}$. Kultivēšanas temperatūru uztur pie 30°C ar ūdens cirkulāciju. Fermentatoru gaisa izvadi pievieno dzesētāju ar auksta ūdens cirkulāciju, lai izvairītos no zudumiem iztvaikošanās dēļ.

2.5. Augšanas dinamikas un oglekļa plūsmu mērīšana

Uzsākot šūnu kultivāciju fermentatoros, suspensiju paraugus ievāc uzreiz, tad divas stundas kopš audzēšanas uzsākšanas un turpmāk ik pēc stundas līdz kultivācijas beigām. Šūnu suspensijas ievāc no paraugu ņemšanas atveres. Jāņem vērā, ka pirmie septiņi mL uzskatāmi

par mirušo tilpumu, jo atverē esošās šūnas ir izolētas no pārējās barotnes, tāpēc mirušo tilpumu nolej nost. Tiek ņemti divi mL suspensijas HPLC mērījumu veikšanai, viens mL OD noteikšanai kā arī astoņi mL trehalozes mērījumiem otrajā un ceturtajā paraugu ņemšanas reizē. Piefiksē izņemtos tilpumus no reaktoriem katrā paraugu ņemšanas reizē, jo tālākos aprēķinos būs nepieciešams zināt reaktoros atlikušās barotnes tilpumu.

HPLC (angl. *High-pressure liquid chromatography*) mērīšanai paredzētās šūnu suspensijas uzreiz pēc iepildīšanas mikromēģenēs ieliek centrifūgā uz četrām minūtēm pie 13000 apgr. min⁻¹ un atsūc supernatantu, izmantojot tīru šļirci un adatu. Supernatantu filtrē caur 0.22 μm miliporu filtru jaunā mikromēģenē un uzglabā -20°C temperatūrā līdz HPLC mērījumu veikšanai. Papildus sagatavo standartšķīdumus ar zināmām glikozes, etanola, glicerīna, etiķskābes un piruvāta koncentrācijām.

Mērījumiem ar HPLC izmanto SEC (angl. *Size-exclusion chromatography*) sadalīšanas metodi ar SH1011 tipa kolonnu, kas piemērota ogļhidrātu un ogļhidrātu spirtu atvasinājumu sadalīšanai. Mērījumiem uzstāda 50°C temperatūru, 0.6 mL min⁻¹ mobilās fāzes plūsmas ātrumu, 30 bar spiedienu. Mobilai fāzei pievieno sērskābi līdz gala koncentrācijai 5 mM un tās injekcijas tilpumu kolonnā ir 5 μL. Skābju (piruvāta un sukcināta) koncentrāciju noteikšanai izmanto fotometrisko detektoru (PDA) un ogļhidrātu un spirtu noteikšanai izmanto refrakcijas indeksa (RI) detektoru. Vielu koncentrācijas aprēķina pēc standartšķīdumu kalibrācijas līknes.

2.6. Oglekļa plūsmu aprēķini

2.6.1. Biomasa un celmu specifiskie augšanas ātrumi

Biomasa tiek aprēķināta pēc optiskā blīvuma, ko izmēra ar kolorimetru:

$$x = OD * x_{OD}$$

x – biomasa, g L⁻¹

OD – Optiskais blīvums (turbiditāte), abs. v.

x_{OD} – Maizes rauga sausnas koncentrācija uz OD vienību, g L⁻¹ OD⁻¹

Nosakot sausnas koncentrāciju uz OD vienību slāpekļa badinātiem celmiem, ar HALO VIS-20 spektrofotometru nomērīts, ka viena OD vienība šūnu suspensijas satur 0.15 g L⁻¹ šūnu sausnas.

Izmantojot SLOPE funkciju datorprogrammā *MS Excel*, pēc OD vērtību naturāllogaritma izmaiņām kultivēšanas gaitā nosaka šūnu augšanas ātrumu μ_{max}. Līknes slīpums tiek aprēķināts, ņemot vērā laika punktus, kuros veidojas lineārs līknes posms.

2.6.2. Metabolītu ražošanas un patēriņa ātrumi

HPLC mērītajiem metabolītiem nosaka biomasas iznākumu uz patērēto substrātu $Y_{X/S}$ un biomasas iznākumu uz saražoto produktu $Y_{X/P}$:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$Y_{X/S}$ – Biomasas iznākums uz substrātu, g mmol⁻¹

ΔX – Saražotā biomasa, g L⁻¹

ΔS – Patērētais substrāts, mmol L⁻¹

$$Y_{X/P} = \frac{\Delta X}{\Delta P}$$

$Y_{X/P}$ – Biomasas iznākums uz saražoto produktu, g mmol⁻¹

ΔP – Saražotais produkts, mmol L⁻¹

Oglekļa centrālā metabolisma metabolītu specifiskos ražošanas vai patēriņa ātrumus var iegūt, dalot augšanas ātrumu ar biomasas iznākumu attiecīgi uz produktu vai uz substrātu:

$$q = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \text{ vai } q = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/P}}$$

q – specifiskais ražošanas vai patēriņa ātrums, mmol g⁻¹ h⁻¹

Iegūtos specifiskos ražošanas vai patēriņa ātrumus izsaka oglekļa vienībās, izmantojot šo formulu:

$$q_{mCmol} = q_{mmol} * n_c$$

n_c – oglekļa atomu skaits metabolītā

q_{mCmol} – specifiskais ražošanas vai patēriņa ātrums oglekļa atomu skaitam molekulā, mCmol g⁻¹ h⁻¹

2.6.3. Makroskopiskā oglekļa bilance

Oglekļa bilanci nepieciešams rēķināt, lai pārliicinātos par metabolītu aprēķināto specifisko ražošanas vai patēriņu ātrumu savstarpējo atbilstību. Pārbauda katram celmam aprēķināto koeficientu atbilstību formulai:

$$1 = y_c + z + d$$

y_c – biomasā nonākusī oglekļa daļa no viena mCmol patērētā substrāta

z – produktu iznākums no viena mCmol patērētā substrāta

d – ogļskābās gāzes iznākums no viena mCmol patērētā substrāta

Tā kā glikoze ir vienīgais oglekļa avots fermentatoros notiekošajai kultivācijai, tad, rēķinot makroskopisko oglekļa bilanci, metabolītu ražošanas ātrumus izdala uz patērēto glikozi, izteiktus mCmolos. Biomasā nonākušo oglekļa daudzumu rēķina, izmantojot

augšanas ātruma koeficientu, kuru izdala ar biomola molmasu, tādā veidā izsakot augšanas ātrumu biomolos.

$$y_c = \frac{\mu_{max}}{M_X * q_{Glu,mCmol}}$$

M_X – Biomases molmasa uz oglekļa vienību jeb biomols, g $mCmol^{-1}$. Pieņem, ka $Cmol$ biomasas masa ir $26.4 \text{ g } Cmol^{-1}$ (Lange & Heijnen 2001).

$q_{Glu,mCmol}$ – Glikozes specifiskais patēriņa ātrums izteikts oglekļa vienībās, $mCmol \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Katram produktam atsevišķi aprēķina to sastādīto daļu makroskopiskās oglekļa bilances vienādojumā. Katra metabolīta ražošanas ātrumu izteiktu oglekļa vienībās izsaka uz patērēto glikozi. Ogļskābās gāzes sastādīto daļu (d) rēķina pēc etanola sastādītās daļas makroskopiskajā oglekļa bilancē, pārrēķinot atbilstoši $mCmolos$. Šī ogļskābās gāzes sastādītā daļa ir minimāli sagaidītā šūnu kultivācijas gaitā.

$$z = \frac{q_{P,mCmol}}{q_{Glu,mCmol}}$$

$q_{P,mCmol}$ – produkta specifiskais ražošanas ātrums izteikts oglekļa vienībās, $mCmol \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Biomases, metabolisma produktu un ogļskābās gāzes veidošanā sastādītās oglekļa daļas summa jeb oglekļa bilance norāda, cik liela daļa bioloģisko procesu ir ņemta vērā oglekļa plūsmas apskatei. Jo tuvāka šī summa ir 100%, jo pilnīgāk var spriest par šūnas izmantotajiem metaboliskajiem ceļiem un par izvēlētās metodes pamatotību to salīdzināšanai. Bilances iztrūkums norāda arī uz iespējamu papildus ogļskābās gāzes rašanos.

2.7. Trehalozes noteikšana

Trehalozes mērījumiem paredzēto šūnu suspensiju ieliek centrifūgā uz trim minūtēm pie $4000 \text{ apgr. min}^{-1}$. Atsūc supernatantu un izdalītās šūnas mazgā vienreiz ar destilētu ūdeni, un atkārtoti izdala no suspensijas, izmantojot centrifūgu. Atsūc supernatantu, izmantojot šļirci un adatu. Nomazgātajām šūnām pievieno $500 \mu\text{L } 1 \text{ M}$ trihloretiķskābes (TCA) šķīduma. Tās uzglabā -20°C temperatūrā.

Veicot mērīšanu, TCA šķīdumā esošās šūnu suspensijas uzglabā vienu stundu ledusvannā un ik pēc 15 min šūnu suspensijas resuspendē. No suspensijām izdala šūnas, izmantojot centrifūgu uz 10 min pie $12000 \text{ apgr. min}^{-1}$. Atsūc supernatantu un ielej to mikromēģenē. Izdalītajām šūnām pievieno $150 \mu\text{L}$ destilēta ūdens un resuspendē. Suspensiju ievieto centrifūgā uz 10 min pie $12000 \text{ apgr. min}^{-1}$ un supernatantu pievieno klāt iepriekš jau ievāktajam supernatantam. Trehalozes daudzuma noteikšanai izmanto 0.2% antrona šķīdumu, kas izšķīdināts koncentrētā sērskābē. Pagatavo arī standartšķīdumus ar zināmām trehalozes

koncentrācijām (8.0 g L^{-1} trehalozes sērijveida atšķaidījumi). Mikromēģenēs sapilina $70 \mu\text{L}$ atsūktā šūnu supernatanta divos atkārtojumos un tam pievieno ar reverso pipetēšanu $330 \mu\text{L}$ antrona šķīduma. Standartlīknes izmantošanai izmanto $10 \mu\text{L}$ trehalozes standartšķīduma, kurai pievieno $60 \mu\text{L}$ destilēta ūdens un $330 \mu\text{L}$ antrona. Mikromēģenes ar reakciju maisījumiem ievieto sildītājā, kur tos karsē septiņas min 100°C temperatūrā un atdzesē līdz istabas temperatūrai. 96-bedrīšu platē sapilina $175 \mu\text{L}$ izreaģējušā maisījuma divos atkārtojumos un mēra absorbciju pie $\lambda_{625\text{nm}}$. Trehalozes koncentrāciju aprēķina pēc standartlīknes.

2.8. Sausnas koncentrācija attiecībā uz OD vienību

Sausnas koncentrācijas spektrofotometra OD vienībā noteikšanai izmanto 40 mL kultivēšanas beigās ievāktās šūnu suspensijas. Vienu stundu izkarsē 105°C stikla mēģenes, kurās tiks izdalītas šūnas. Mēģenes atstāj eksikatorā 20 min līdz tās atdziest. Nomarkētās mēģenes nosver ar analītiskajiem svāriem. Šūnu suspensijas atkausē līdz istabas temperatūrai un tām nosaka OD vērtību. Pēc suspensijas OD noteikšanas 15 mL suspensijas ielej stikla mēģenē divos atkārtojumos un liek centrifūgā pie $4000 \text{ apgr. min}^{-1}$ uz trim minūtēm. Atsūc supernatantu. No šūnām noskalo barotni, pievienojot 10 mL ūdens un tās resuspendējot. Suspensiju ievieto centrifūgā pie $4000 \text{ apgr. min}^{-1}$ uz trim minūtēm. Skalošanas procesu veic pavisam divas reizes un beigās atsūc supernatantu. Mēģenes ar izdalītām šūnām žāvē 105°C $12\text{-}16$ stundas un pirms nosvēršanas ieliek eksikatorā līdz atdziest. No iegūtās sausnas masas, paņemtā suspensijas tilpuma un nomērītās OD vērtības aprēķina sausnas koncentrāciju izmantotā spektrofotometra OD vienībā.

2.9. Dehidrogenāžu aktivitātes noteikšana

Enzīmu aktivitātes mērījumiem izmantotos celmus kultivē koniskās kolbās. Kad šūnas ir sasniegušas eksponenciālo augšanas fāzi, šūnu suspensijas pārsēj koniskās kolbās, kurās ir SD+, ade- vai N- barotne un kurās barotne nepārsniedz piekto daļu koniskās kolbas tilpuma, lai saglabātos optimāla aerācija. Katrai barotnei šūnas kultivē trīs atkārtojumos. Inkubācija norisinās 30°C temperatūrā ar apļveida rotācijas ātrumu $180 \text{ apgr. min}^{-1}$. Pēc četrus stundu kultivēšanas šūnas izdala centrifūgā pie $8000 \text{ apgr. min}^{-1}$ uz trim min. Šūnas noskalo, pievienojot tām destilētu ūdeni un tās resuspendējot. Šūnas izdala no suspensijas, izmantojot centrifūgu ar tādiem pašiem iestatījumiem kā iepriekš. Šūnu skalošanu veic pavisam divas reizes un beigās atsūc supernatantu. Šūnas resuspendē destilētā ūdenī, un tām pievieno digitonīnu, līdz tā gala koncentrācija sasniedz 0.5% suspensijā. Papildus pievieno arī proteāžu (aizkuņa dziedzera, termolizīna, himotripsīna, tripsīna un papaīna) inhibitoru *cOplete*TM. Suspensiju inkubē vienu stundu istabas temperatūrā, ik pēc 15 min šūnas resuspendējot. Sagatavo reakcijas maisījumu, ar kuru noteikt šūnu enzīmu aktivitāti (5. tabula).

Reakcijas maisījums enzīmu aktivitātes novērtēšanai

Table 5

Reactive solution for evaluating enzyme activity

Pievienotā viela	Galakonzentrācija, M
Tris-HCl	0.2
Jodnitrīttetrazolijs 96% etanola šķīdumā	$1.2 \cdot 10^{-3}$
Fenazīna metosulfāts	$2.0 \cdot 10^{-3}$

Pilnot tās 96-bedrīšu platītē, šūnām veic sērijveida atšķaidījumus un pievieno reakcijas maisījumu ar jodnitrrotetrazoliju (INT) un fenazīna metosulfātu (PMS) 0.2 M Tris-HCl bufera šķīdumā. Plašu lasītājā pievieno pārbaudāmajai dehidrogenāzei atbilstošo substrātu un elektronu akceptoru (6. tabula). Nomēra izmaiņas reakcijas maisījumu absorbcijā pie viļņu garuma $\lambda_{595\text{nm}}$. Nosaka enzīmu aktivitāti pēc līkņu lineārā posma slīpuma.

Enzīmi un to izmantotie substrāti un elektronu akceptoru

Table 6

Enzymes and the utilized electron acceptors

Enzīms	Substrāts	Elektronu akceptors
Acetaldehīda dehidrogenāze	3% acetaldehīda šķīdums	NAD ⁺
Alkohola dehidrogenāze	3% etanola šķīdums	NAD ⁺
Glicerīna-3-fosfāta dehidrogenāze	30 mM glicerīna-3-fosfāta šķīdums	NAD ⁺
Glikozes-6-fosfāta dehidrogenāze	30 mM glikozes-6-fosfāta šķīdums	NADP

Enzīmu aktivitāti izsaka pēc izdalītā reakcijas produkta INT-formazāna daudzuma. To iegūst, izdalot iegūto suspensijas OD_{595nm} ar INT-formazāna ekstincijas koeficientu. Sagatavo sērijveida INT atšķaidījumus sākot ar 2 mM koncentrāciju. INT šķīdumiem pievieno Na₂S₂O₃ līdz galakonzentrācijai 20mM. Nātrija tiosulfāts reducē INT par INT-formazānu. Reakcijas maisījumu sapilina 96-bedrīšu platē un nosaka OD_{595nm}. Ekstincijas koeficientu nosaka pēc iegūtās absorbcijas līknes slīpuma robežās no 0.00 līdz 0.30 OD_{595nm}.

2.10. Statistiskās metodes

Standartnovirzes tika rēķinātas no diviem vai trim bioloģiskajiem atkārtojumiem. Daļai datu, kas iegūti no fermentatoros kultivētajiem celmiem, pieejami tikai divi bioloģiskie

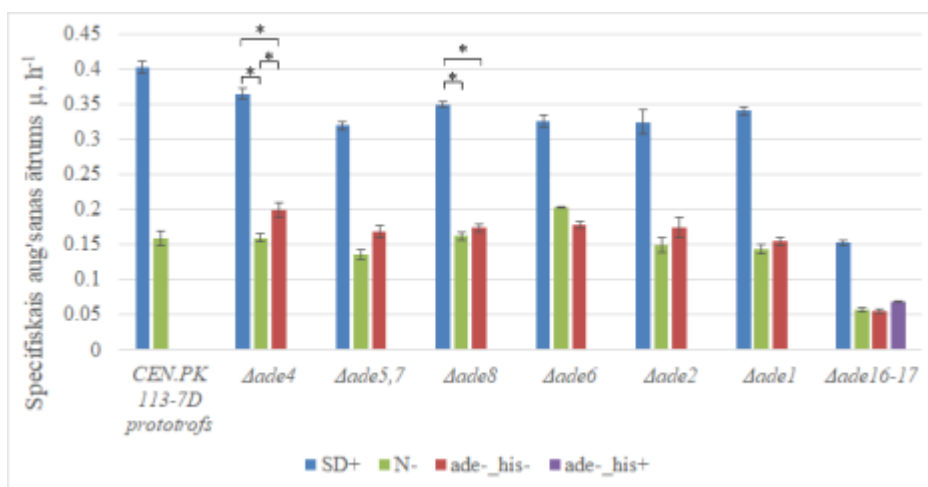
atkārtojumi fermentatoru trūkuma dēļ. Lietojot programmu “R” caur *Rstudio*, veic Vilkoksona statistisko testu, ja iegūtajiem rezultātiem pieejami tikai divi bioloģiskie atkārtojumi, vai t-testu, ja iegūtajiem rezultātiem pieejami trīs bioloģiskie atkārtojumi un ja datukopa ir parametriska jeb atbilst normālsadalījumam. Statistiski būtiskas izmaiņas pārbauda pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$. Atbilstību normālsadalījumam pārbauda, veicot Šapiro-Vilka statistisko testu ($\alpha=0.05$). Datukopu dispersiju homogenitāti pārbauda, izmantojot F-testu jeb Fišera statistisko testu divām datukopām.

3. REZULTĀTI

CEN.PK 113-7D celmus audzēja fermentatoros un periodiskās augšanas kultūrās (angl. *batch growth*), kamēr tās atradās eksponenciālā augšanas fāzē. No kultivēšanas fermentatoros ieguva tādus datus kā šūnu specifiskās augšanas ātrumus un izmaiņas glikozes un vairāku šūnu produktu koncentrācijās augšanas barotnē. No kultivēšanas periodiskās augšanas kultūrās ieguva datus tādu parametru noteikšanai kā sausnas koncentrāciju uz OD vienību izmantotajam HALO VIS-20 spektrofotometram (7. attēls), enzīmu aktivitātes novērtējumu pēc INT-formazāna veidošanās suspensijā (2. pielikums; 3. pielikums) un trehalozes koncentrāciju šūnu biomasā. Celmus audzē trīs dažādos apstākļos: SD barotnē, kurā pievienots adenīns (SD+), SD barotnē, kurā nav pievienots adenīns (ade-) un SD barotnē bez pievienota slāpekļa avota (N-).

3.1 Izmaiņas šūnu augšanas parametros atkarībā no augšanas barotnes

Apskatīja tādus šūnu augšanas parametrus kā specifisko augšanas ātrumu μ (6. attēls), sausnas masu uz HALO VIS-20 spektrofotometra OD vienību pie viļņa garuma $\lambda_{600\text{nm}}$ (7. attēls) un glikozes patēriņu q (8. attēls).



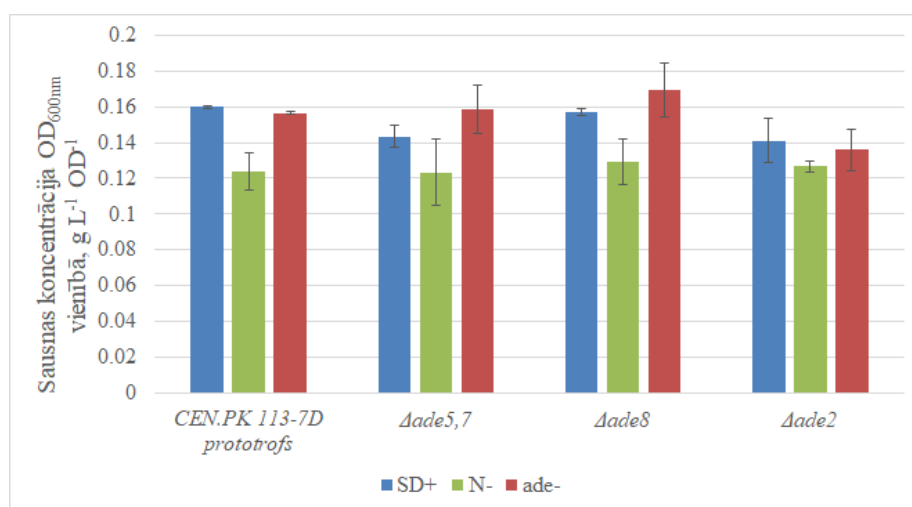
6. attēls. CEN.PK 113-7D prototrofa un tā purīnu *de novo* sintēzes auksotrofu augšanas ātrumu salīdzinājums SD+, ade- un N- barotnēs. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes. Ar simbolu “*” norādītas statistiski būtiskas atšķirības pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$.

Figure 6. Comparison of CEN.PK 113-7D prototroph and purine *de novo* synthesis auxotrophs specific growth rates in SD+, ade- and N- growth media. Error bars correspond to standard deviation. Symbol “*” corresponds to statistically significant differences with significance level $\alpha=0.05$.

Specifiskais augšanas ātrums atbilst ar spektrofotometru HALO VIS-20 noteikto OD vērtību naturāllogaritma un augšanas laika h taisnes slīpuma koeficientam. Daļa mērījumu

veikti trīs bioloģiskajos atkārtojumos, bet fermentatoru trūkuma dēļ pārējiem mērījumiem veica tikai divus bioloģiskos atkārtojumus, kas ietekmē statistisko testu veikšanu.

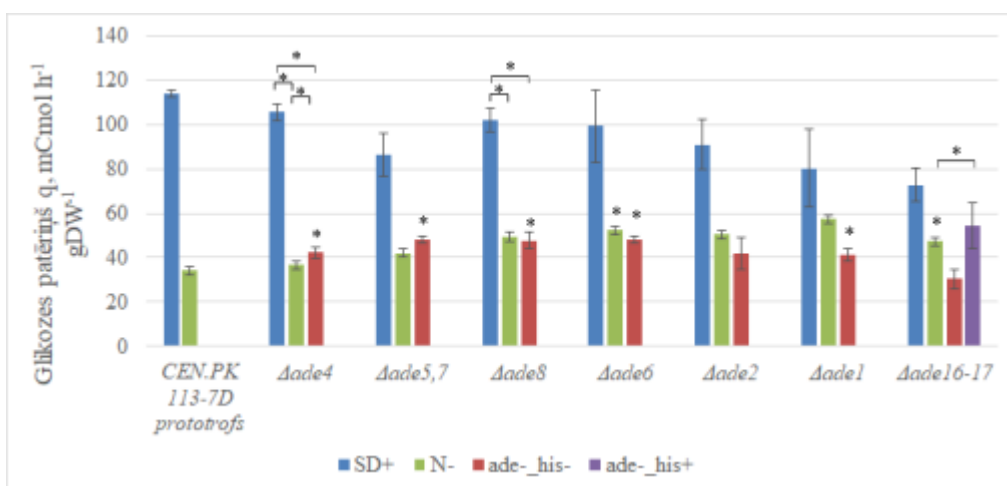
Novēro, ka $\Delta ade8$ un $\Delta ade4$ celmiem statistiski būtiski (būtiskuma līmenis $\alpha=0.05$) samazinās šūnu specifiskie augšanas ātrumi, mainoties augšanas apstākļiem no SD+ uz ade- vai N-. Celma $\Delta ade4$ gadījumā arī novēro, ka specifiskais augšanas ātrums samazinās, mainoties augšanas apstākļiem no ade- uz N-. Pārējiem celmiem sagaidāma līdzīga sakarība, kur N- vai ade- augšanas apstākļos šūnām būtiski samazinās specifiskais augšanas ātrums, salīdzinot ar SD+ augšanas apstākļiem, tomēr bioloģisko atkārtojumu trūkums ierobežo statistiski vērtīgu rezultātu iegūšanu.



7. attēls. Sausnas koncentrācija OD vienībā, izmantojot spektrofotometru HALO VIS-20 pie viļņa garuma λ_{600nm}

Figure 7. Measurements of dry weight concentration in OD unit utilising spectrophotometer HALO VIS-20 with wavelength λ_{600nm}

Sausnas koncentrāciju uz OD vienību, izmantojot HALO VIS-20 spektrofotometru, noteica trim auktrotrofiem celmiem: $\Delta ade5,7$, $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$. Katram celmam saunas koncentrācija uz OD tika noteikta divos atkārtojumos. Pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$ netika noteiktas statistiski būtiskas atšķirības starp auktrotrofiem celmiem no prototrofa vienādos augšanas apstākļos, kā arī netika noteiktas statistiski būtiskas izmaiņas saunas koncentrācijā uz OD vienību ikvienam no celmiem atkarībā no augšanas barotnes. Vidēji saunas koncentrācija uz OD vienību noteiktajiem celmiem (7. attēls) SD+ barotnē ir $0.150 \text{ mg mL}^{-1} \text{ OD}^{-1}$, ade- barotnē ir $0.155 \text{ mg mL}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ un N- barotnē ir $0.126 \text{ mg mL}^{-1} \text{ OD}^{-1}$.



8. attēls. CEN.PK 113-7D prototrofa un purīnu *de novo* sintēzes auksotrofu glikozes patēriņa salīdzinājums SD+, ade- un N- augšanas barotnēs. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes. Ar simbolu “*” norādītas statistiski būtiskas atšķirības pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$. Virs stabiņa novietots “*” norāda statistiski būtiskas izmaiņas, salīdzinot ar prototrofa augšanas apstākļiem. Adenīna badinātie celmi salīdzināti ar slāpekļa badinātu prototrofu.

Figure 8. Comparison of CEN.PK 113-7D prototroph and purine *de novo* synthesis auxotrophs glucose uptake in SD+, ade- and N- growth media. Error bars correspond to standard deviation. Symbol “*” corresponds to statistically significant differences with significance level $\alpha=0.05$. Symbol “*” located above a bar corresponds to a statistically significant difference compared to growth conditions of prototroph. Adenine starved strains were compared to nitrogen starved prototroph.

Glikozes patēriņu noteica pēc izmaiņām glikozes koncentrācijā fermentatoros šūnu eksponenciālās augšanas laikā. Glikozes koncentrāciju attīrītā barotnes šķīdumā noteica ar SEC-HPLC. Izdalot šūnu augšanas ātrumu ar biomasas iznākumu uz patērēto glikozi mCmolos ($Y_{X/S}$), iegūst glikozes patēriņu. Biomasas iznākumu uz patērēto glikozi noteica no glikozes koncentrācijas atkarībā no biomasas koncentrācijas taisnes slīpuma koeficienta. Biomasas koncentrāciju aprēķina, reizinot suspensijas OD vērtību ar tādos pašos augšanas apstākļos noteikto sausnas koncentrācijas koeficientu spektrofotometra HALO VIS-20 OD vienībā pie viļņu garuma λ_{600nm} .

Adenīna badinātiem auksotrofiem celmiem $\Delta ade4$, $\Delta ade5,7$, $\Delta ade8$, $\Delta ade6$ un $\Delta ade1$ novēro palielinātu glikozes patēriņu ($\alpha=0.05$), salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu. Par adenīna badinātu $\Delta ade16-17$ uzskata gan ade- his-, gan ade- his+ barotnēs kultivētos celmus. N- barotnē palielinās glikozes patēriņš $\Delta ade6$ un $\Delta ade16-17$ celmiem ($\alpha=0.05$), salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu.

Aplūkojot katram celmam atsevišķi izmaiņas glikozes patēriņā atkarībā no augšanas apstākļiem, visiem celmiem novēro tendenci, ka samazinās glikozes patēriņš, mainoties augšanas apstākļiem no SD+ uz ade- vai N-. Auksotrofiem celmiem $\Delta ade4$ un $\Delta ade8$ šī tendence ir statistiski būtiska. Celmam $\Delta ade4$ papildus novēro arī glikozes patēriņa

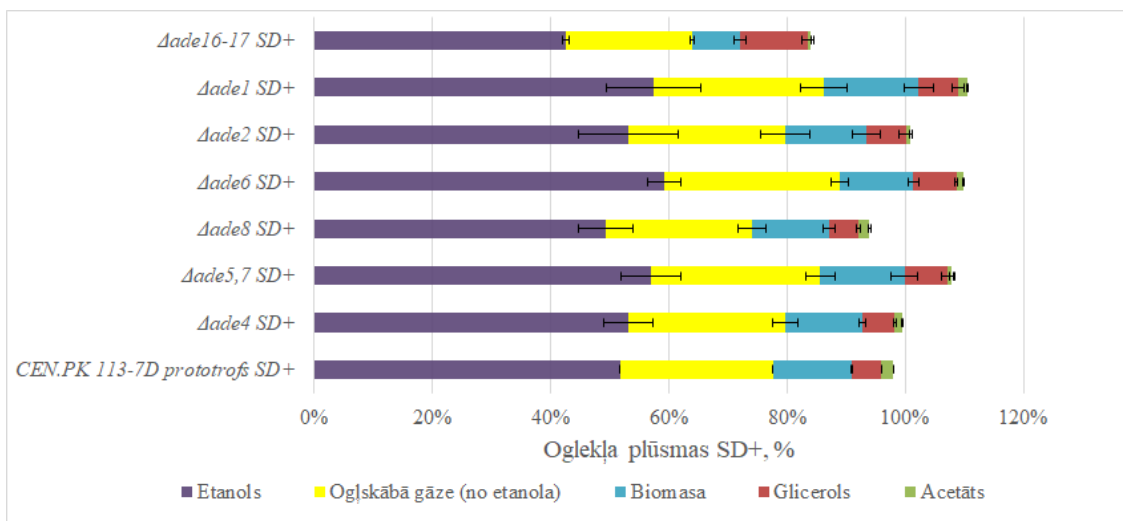
samazināšanos, mainoties barotnei no ade- uz N-. Celmam *Δade16-17* novēro glikozes patēriņa samazināšanos, mainoties barotnei no ade- his+ uz N-.

4.2. Izmaiņas oglekļa centrālā metabolisma plūsmās

Oglekļa centrālās metabolisma plūsmas apraksta, salīdzinot vairāku metabolītu un biomasas ražošanas ātrumus relatīvi glikozes patēriņam. Tā kā glikoze bija vienīgais šūnām pieejamais oglekļa avots, relatīvos glikozes produktu ražošanas ātrumus attiecībā uz iztērēto glikozi dēvē par oglekļa plūsmām. No fermentatoros kultivētām šūnām ieguva izmaiņas oglekļa plūsmu sadalījumā SD+ (9. attēls), ade- (10. attēls) un N- (11. attēls) barotnēs.

Oglekļa plūsmas rēķina, izdalot specifiskos metabolītu ražošanas ātrumus $\text{mCmolos h}^{-1} \text{gDW}^{-1}$ uz glikozes patēriņu tādās pašās mērvienībās. Specifiskos metabolītu ražošanas ātrumus nosaka, izdalot šūnu augšanas ātrumus ar biomasas iznākumu uz saražotā metabolīta daudzumu ($Y_{x/P}$). Biomasas oglekļa plūsmas nosaka, izdalot biomasas iznākumu uz patērētās glikozes daudzumu mCmol ($Y_{x/S}$) ar biomolu jeb biomasas empīrisko molmasu uz vienu oglekļa vienību. CEN.PK 113-7D biomols atbilst 26.4 g mol^{-1} (Lange & Heijnen 2001). Ogļskābās gāzes plūsmas rēķina pēc izmaiņām etanola koncentrācijās. Tā kā etanola veidošanas procesā rodas ekvivalents daudzums ogļskābās gāzes, šo ar etanolu asociēto daudzumu uzskata par minimāli producēto ogļskābo gāzi.

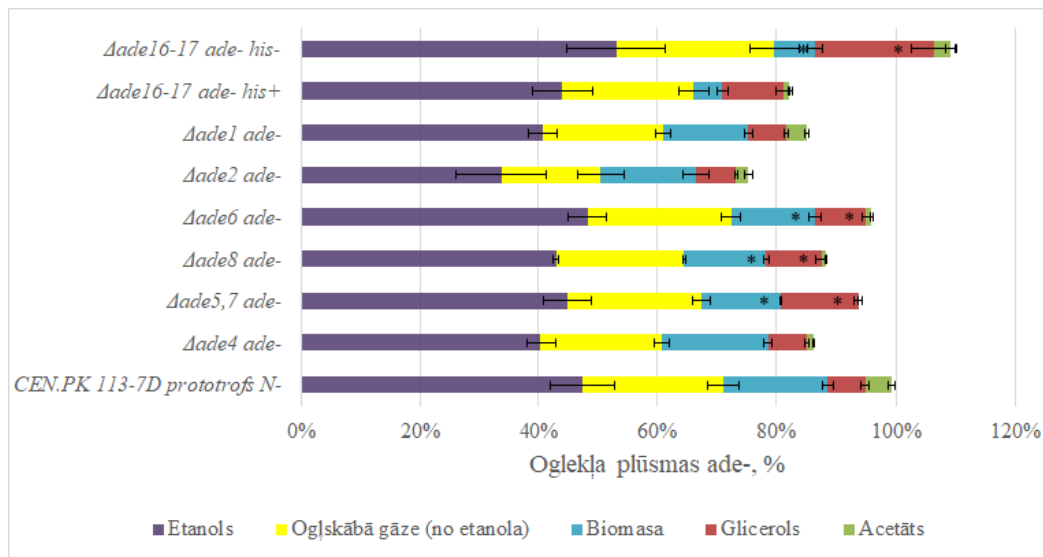
Oglekļa plūsmu mērījumu precizitāti var ietekmēt laika starpība starp paraugu suspensiju OD mērīšanu un šķīdumu sagatavošanu SEC-HPLC mērījumiem, jo abi šie mērījumi attiecas uz laika punktu, kurā tika paņemta suspensija no fermentatoriem.



9. attēls. CEN.PK 113-7D prototrofa un purīnu *de novo* sintēzes auktrotrofu oglekļa plūsmu sadalījums SD+ barotnē. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes.

Figure 9. Comparison of CEN.PK 113-7D prototroph and purine *de novo* synthesis auxotrophs carbon flux in SD+ growth media. Error bars correspond to standard deviation.

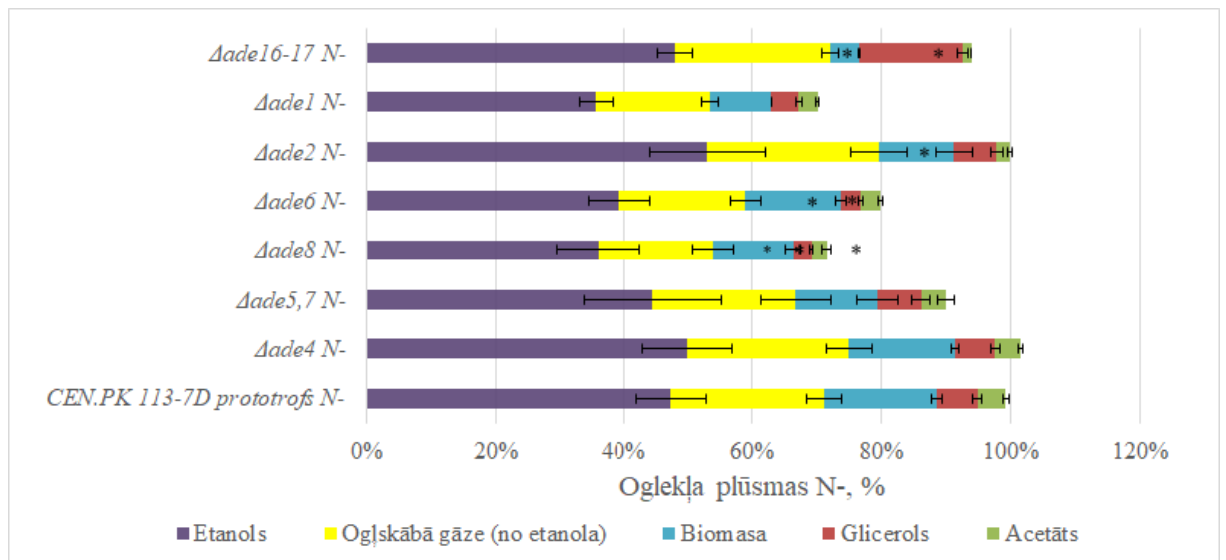
SD+ barotnē, kurā šūnām pieejamas visas nepieciešamās izejvielas augšanai, kā galveno produktu no glikozes kā substrāta ražo etanolu, kas vidēji sastāda ~53% oglekļa bilances starp visiem celmiem. Ar etanola ražošanu asociētā ogļskābā gāze sastāda ~27% no oglekļa bilances vidēji visiem celmiem. Vidēji starp visiem celmiem ~13% oglekļa bilances sastāda biomasa, ~7% glicerols un 1% sastāda acetāts.



10. attēls. CEN.PK 113-7D prototrofa un purīnu *de novo* sintēzes auktrotrofu oglekļa plūsmu sadalījums *ade-* barotnē. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes. Ar simbolu “*” norādītas statistiski būtiskas atšķirības pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$.

Figure 10. Comparison of CEN.PK 113-7D prototroph and purine *de novo* synthesis auxotrophs carbon flux in *ade-* growth media. Error bars correspond to standard deviation. Symbol “*” corresponds to statistically significant differences with significance level $\alpha=0.05$.

Adenīna badināto auktrotrofu oglekļa plūsmas tiek salīdzinātas ar slāpekļa badināto prototrofu. Vairākiem celmiem novēro statistiski būtiskas izmaiņas ($\alpha=0.05$) biomasas un glicerola oglekļa plūsmu sadalījumos (10. attēls). Novēro samazinātu biomasas un palielinātu glicerola oglekļa plūsmu daļas *ade-* barotnē kultivētajiem *Δade5,7*, *Δade8*, *Δade6*, un *his-* barotnē kultivētajam *Δade16-17* celmiem. Visievērojamākās izmaiņas novēro adenīna un histidīna badinātam *Δade16-17* celmam, kura biomasas oglekļa plūsmu daļa samazinās 2.55 reizes un glicerola oglekļa plūsmu daļa palielinās 3.17 reizes, salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu.



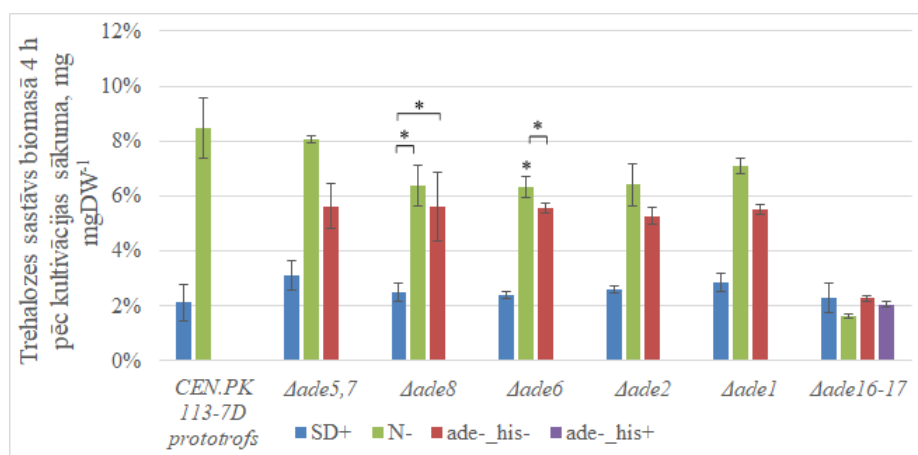
11. attēls. CEN.PK 113-7D prototrofa un purīnu *de novo* sintēzes auktrotrofu oglekļa plūsmu sadalījums N- barotnē. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes. Ar simbolu “*” norādītas statistiski būtiskas atšķirības pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$.

Figure 11. Comparison of CEN.PK 113-7D prototroph and purine *de novo* synthesis auxotrophs carbon flux in N- growth media. Error bars correspond to standard deviation. Symbol “*” corresponds to statistically significant differences with significance level $\alpha=0.05$.

Slāpekļa badinātam auktrotrofam *Δade8* novēro statistiski būtisku ($\alpha=0.05$) izmaiņu kopējā oglekļa bilancē, salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu (11. attēls). Pēc kultivācijas fermentatoros, izejot no SEC-HPLC mērījumiem, konstatēja, ka viens no *Δade8* celma bioloģiskiem atkārtojumiem saturēja augstu etanola sākuma koncentrāciju (2.97 g L^{-1}), kas visticamāk radies šūnu inokulācijas brīdī, kur ar etanolu un atklātu liesmu nodrošināja sterilitāti, inokulējot šūnas fermentatorā. Novēro būtiski samazinātu biomasas oglekļa plūsmu daļu *Δade8*, *Δade6*, *Δade2* un *Δade16-17* celmiem, salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu. Novēro būtiski palielinātu glicerīna oglekļa plūsmu daļu *Δade16-17* celmam, kur tā palielinājusies 2.56 reizes, savukārt *Δade8* un *Δade6* celmiem biomasas oglekļa plūsmu daļa ir samazinājusies 2.03 reizes abiem celmiem, salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu.

4.3. Izmaiņas rezerves ogļhidrāta trehalozes sastāvā

Trehalozes daudzumu noteica, izmantojot antrona metodi. Trehalozes vai citu ogļhidrātu klātbūtnē antrona šķīdums sērskābē iekrāsojas zilā krāsā, kuras intensitāti mēra ar spektrofotometru.



12. attēls. CEN.PK 113-7D prototrofa un purīnu *de novo* sintēzes auksotrofu trehalozes koncentrācija biomasā četras stundas pēc kultivācijas sākuma fermentatoros SD+, N- vai ade- augšanas apstākļos. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes. Ar simbolu “*” norādītas statistiski būtiskas izmaiņas pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$ starp norādītajiem celmiem vai, salīdzinot ar prototrofu līdzīgos augšanas apstākļos.

Figure 12. Comparison of CEN.PK 113-7D prototroph and purine *de novo* synthesis auxotrophs proportion of trehalose in cell biomass in SD+, ade- or N- growth media during cultivation in fermentators. Error bars correspond to standard deviation. Symbol “*” corresponds to statistically significant differences between corresponding strains or compared to prototroph in similar growth conditions with significance level $\alpha=0.05$.

Novēro, ka trehalozes koncentrācija biomasā SD+ barotnē visiem celmiem ir ~2%. Novērojama tendence N- un ade- barotnēs trehalozes koncentrācijai biomasā palielināties, kura tās sastāvs variē starp celmiem un sastāda 5-8% šūnu biomasas (12. attēls). Auksotrofam celmam $\Delta ade8$ palielinās trehalozes sastāvs biomasā ~3 reizes, mainoties augšanas apstākļiem no SD+ uz N-. Celmam $\Delta ade6$ novēro, ka trehalozes koncentrācija biomasā statistiski būtiski palielinās arī mainoties augšanas apstākļiem no ade- uz N-. Salīdzinot ar slāpekļa badinātu prototrofu, novēro samazinātu trehalozes koncentrāciju biomasā $\Delta ade6$ celmam. Auksotrofam celmam $\Delta ade16-17$ nenovēro izmaiņas trehalozes koncentrācijā biomasā, mainoties barotnei. Tā kā prototrofam SD+ augšanas apstākļos veikti tikai divi bioloģiskie atkārtojumi, nevar iegūt statistiski vērtīgus rezultātus adenīna badinātiem auksotrofiem, salīdzinot tos ar prototrofu.

4. DISKUSIJA

Pētījumā tika aplūkotas izmaiņas CEN.PK 113-7D purīnu *de novo* biosintēzes auksotrofu celmu metabolismā, salīdzinot ar prototrofu, atkarībā no to augšanas apstākļiem.

4.1. Šūnu reakcija uz slāpekļa vai adenīna badināšanu

Viens no pārbaudītajiem parametriem ir specifiskais augšanas ātrums (6. attēls). Iegūtais specifiskais augšanas ātrums SD+ barotnē kultivētajiem celmiem variē robežās no 0.3-0.4 h⁻¹. Noteikto augšanas ātrumu var salīdzināt ar J. F. Nijkamp et al. (2012) un A. Hagman et al. (2013) veiktajiem pētījumiem, kur tika izmantots šis pats CEN.PK 113-7D celms līdzīgā augšanas barotnē. J. F. Nijkamp et al. (2012), kur pārbaudīja nepieciešamību pēc biotīna raugu celmiem, šis celms tika audzēts periodiskā kultūrā koniskās kolbās ar augšanas ātrumu 0.38 h⁻¹. A. Hagman et al. (2013), kur salīdzināja vairāku raugu sugu *Crabtree* izpausmi, šis celms tika kultivēts fermentatoros aerobās periodiskās kultūrās, kur novēro vidējo augšanas ātrumu ~0.29 h⁻¹. Salīdzinājumi norāda, ka augšanas ātrumi var variēt vienam un tam pašam celmam līdzīgos augšanas apstākļos. Abos minētajos pētījumos (Nijkamp et al. 2012; Hagman et al. 2013) izmantota sintētiska minimālā barotne, kuras sastāvs veidots pēc C. Verduyn et al. (1992) apraksta. Salīdzinot SD+ ar ade- vai N- barotnēm, novērojama tendence augšanas ātrumiem samazināties 2.5 reizes. Samazinātais augšanas ātrums SD+ barotnē auksotrofam celmam *Δade16-17*, kas, salīdzinot ar prototrofu, samazinājies ~2.6 reizes, norāda, ka iespējams *ADE16* un *ADE17* gēnu mutācija pati par sevi varētu ietekmēt šūnas fizioloģiju, tomēr šī darba ietvaros pietrūkst bioloģisko atkārtojumu, lai iegūtu statistiski nozīmīgus secinājumus.

Glikozes patēriņam novēro līdzīgas tendences kā izmaiņām augšanas ātrumos (8. attēls). Vislielākais glikozes patēriņš novērots SD+ barotnē. Metabolisma oglekļa plūsmu produktiem novadītais ogleklis izteikts uz noteikto glikozes patēriņu katram celmam.

Tā kā maizes raugs oglekļa limitācijas apstākļos saglabā ~50% enzimatiskās mašinerijas, jo īpaši metaboliskos ceļos (Yu et al. 2020), sagaidāms, ka slāpekļa badinātām šūnām samazinātos masa ribosomu degradācijas dēļ. Ir novērojama šāda tendence gan prototrofam, gan auksotrofiem celmiem (7. attēls), tomēr pietrūkst bioloģisko atkārtojumu, lai iegūtu statistiski nozīmīgus secinājumus. Adenīna sausnas koncentrācijas mērījumus ietekmē novērojums, ka to optiskā turbiditāte palielinās, palielinoties šūnas izmēram (Kokina et al. 2014).

Trehaloze ir rezerves ogļhidrāts, kas akumulējas, šūnām eksponenciāli augot. Tādi vides stresi kā barības vielu trūkums spēj ierosināt trehalozes sintēzi (Eleutherio et al. 2015), ko arī novēro ade- vai N- barotnēs kultivētajiem celmiem (12. attēls). Četras stundas pēc kultivācijas sākuma periodiskās kultūrās koniskās kolbās SD+ barotnē trehalozes sastāvs biomasā noteikts

~2% visiem kultivētajiem celmiem, savukār N- un ade- barotnēs biomasas sastāvs variē un sastāda 5-8% šūnu biomasas. Tā kā trehalozes sastāvs biomasā adenīna badinātiem auksotrofiem celmiem palielinās līdzīgi kā slāpekļa badinātiem celmiem, var spriest, ka adenīna trūkums izraisa līdzīgu atbildi uz stresu kā slāpekļa trūkums.

Auksotrofam celmam $\Delta ade16-17$ novēro līdzīgu trehalozes sastāvu biomasā neatkarīgi no izmantotās barotnes. Ir zināms ka tieši pirms *ADE16* un *ADE17* kodētā purīnu *de novo* sintēzes posma rodas starpmetabolīts 5'-fosforibozil-5-amino-4-imidazola carboksamīds (AICAR). AICAR un arī sukcinil-AICAR (SAICAR) uzkrāšanās regulē purīnu sintēzi transkripcijas līmenī un šiem starpmetabolītiem arī ir zināma regulējoša funkcija šūnas fosfātu patēriņā (Pinson et al. 2009). AICAR un/vai SAICAR darbība veicina Bas1p un Pho2p transkripcijas faktoru mijiedarbību, kā rezultātā pastiprinās purīnu sintēzes gēnu transkripcija. Pho2p ir transkripcijas faktors *PHO* regulonam, kas regulē fosfātu patēriņu šūnā (Pinson et al. 2009). Tā kā auksotrofajam celmam $\Delta ade16-17$ nenovēro izmaiņas trehalozes sastāvā biomasā SD+, N- un ade- (his+ un his-) barotnēs, iespējams AICAR vai SAICAR arī ir loma šūnas atbildē uz slāpekļa trūkuma stresu.

4.2. Glicerīna un biomasas loma oglekļa plūsmu veidošanā prototrofam un auksotrofiem celmiem

Iegūto oglekļa plūsmu sadalījuma rezultātus var salīdzināt ar A. Hagman et al. (2013) veikto pētījumu, kur fermentatoros kultivēja dažādu sugu raugus, tostarp maizes rauga CEN.PK 113-7D celmu. A. Hagman et al. (2013) pētījumā ieguva vairāku metabolītu un oglekļa plūsmu produktu iznākumus uz patērētās glikozes daudzumu, kuru vidū ietilpst šajā darbā apskatītais etanols, glicerols, acetāts un biomasas. A. Hagman et al. (2013) noteica, ka eksponenciālās augšanas fāzes laikā CEN.PK 113-7D celmam rodas vidēji $0.38 Y_{EtOH/Glc}$ ($g\ g^{-1}$), $0.14 Y_{Biomass/Glc}$ ($g\ g^{-1}$), $0.03 Y_{Glycerol/Glc}$ ($g\ g^{-1}$) un $0.02 Y_{Acetate/Glc}$ ($g\ g^{-1}$), kas, pārrēķinot oglekļa plūsmās, atbilst 49% etanola, 16% biomasas, 3.1% glicerola un 1.6% acetāta plūsmu sadalījumam no glikozes uzņemtā oglekļa. SD+ barotnē kultivētie celmi uzrāda līdzīgu oglekļa plūsmu sadalījumu kā prototrofa etanolam (~52%), acetātam (~2.0%) un biomasai (~13%), tomēr glicerola oglekļa plūsmu daļa ir ~1.6 reizes lielāka nekā A. Hagman et al. (2013) novērotās. Tā kā A. Hagman et al. (2013) pētījumā tika izmantota līdzīga, bet ne identiska barotne, kā arī tika veikti tikai divi bioloģiski atkārtojumi, nevar spriest par būtiskām novirzēm plūsmu sadalījumā, salīdzinot šos prototrofu rezultātus. Jāpiebilst, šajā pētījumā iegūtais prototrofa augšanas ātrums ir $0.4\ h^{-1}$, kas ir ~1.4 reizes lielāks kā A. Hagman et al. (2013) noteiktais augšanas ātrums ($0.29\ h^{-1}$).

Kultivējot *ADE* gēnu *knock-out* mutantu celmus, novēro palielinātu no glikozes uzņemtā oglekļa plūsmu pievadi glicerola veidošanai ($\Delta ade5,7$, $\Delta ade8$, $\Delta ade6$ un $\Delta ade16-17$)

ade- barotnē, salīdzinot ar N- prototrofu. Diviem no šiem *knock-out* celmiem novēro samazinātu oglekļa plūsmu daļu glicerola veidošanā (*Δade8* un *Δade6*), salīdzinot ar N-prototrofu, kas liecina par atšķirīgu šo divu auktrotrofu celmu reakciju uz adenīna vai slāpekļa trūkumu barotnē. Jāpiebilst, ka *Δade8* celmam N- barotnē noteiktā makroskopiskā oglekļa bilance būtiski atšķiras no prototrofa celma un to iespējams savilkt tikai līdz ~70%. Novēro arī makroskopiskās oglekļa bilances iztrūkumu *Δade6* (~80%) un *Δade1* (~70%) celmiem, kas gan nav statistiski būtiski. Iztrūkums varētu liecināt par aerobās elpošanas norisi, kur varētu rasties papildus ogļskābā gāze, kas oglekļa plūsmu aprēķinos netika iekļauta. Aerobās elpošanas norise liecinātu, ka šūnas mainījušas savu metabolismu no alkohola fermentācijas uz fermentatīvi-respiratīvu metabolismu.

Auktrotrofais celms *Δade16-17* uzrāda visizteiktākās atšķirības no N- prototrofa gan ade-, gan N- barotnē, kur tas uzrāda samazinātu oglekļa plūsmu daļu biomasas veidošanai, bet palielinātu – glicerīna veidošanai. Domājams, ka šādas izmaiņas rodas AICAR uzkrāšanās dēļ, jo *ADE16* un *ADE17* gēnu kodētais posms ir pēdējais purīnu *de novo* sintēzes ceļa posms pirms inozitol monofosfāta (IMP) sazarojuma (4. attēls). Iepriekšējā posma produkts ir AICAR.

Palielināta oglekļa plūsmu daļa glicerola veidošanai iespējams rodas NAD⁺ reciklēšanas dēļ. Šūnas veido glicerolu, lai uzkrātu citoplazmas reducējošo potenciālu NADH par NAD⁺ (1. attēls). NAD⁺ biosintēze patērē ATP, kas to padara atkarīgu no purīnu *de novo* sintēzes, kad trūkst ATP (Pinson et al. 2019). Tā kā auktrotrofie celmi nespēj sintezēt *de novo* adenīnu, iespējams ierobežotais iekššūnas ATP daudzums rada nepieciešamību reciklēt citoplazmas NADH par NAD⁺, palielinot glicerola oglekļa plūsmu daļu.

4.3. Ar centrālo oglekļa metabolismu saistīto dehidrogenāžu aktivitāte

Prototrofam un trim auktrotrofiem celmiem (*Δade5,7*, *Δade8* un *Δade2*) papildus noteica četru ar centrālo oglekļa metabolismu saistītu dehidrogenāžu aktivitāti. Šos rezultātus var salīdzināt ar glikozes vai oglekļa metabolītu ražošanu (2. pielikums; 3. pielikums). Salīdzinot glikozes patēriņu ar glikozes-6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāti (2. pielikums), novēro, ka glikozes-6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte nemainās, mainoties barotnei. Tā kā adenīna badinātiem celmiem samazinās glikozes patēriņš, mainoties barotnei, var spriest, ka glikoze tiek uzņemta lēnāk samazinātā augšanas ātruma dēļ. Salīdzinot specifisko etanola ražošanas ātrumu ar alkohola dehidrogenāzes aktivitāti (2. pielikums), novēro trūkumus izmantotajā metodē. Celmam *Δade5,7* nenovēro alkohola dehidrogenāzes aktivitāti, kaut arī ar SEC-HPLC veiktie mērījumi norāda etanola koncentrācijas palielināšanos šūnu barotnē. Celmam *Δade2* nezināmu iemeslu dēļ arī novērota zema alkohola dehidrogenāzes aktivitāte SD+ barotnē. Salīdzinot specifisko glicerola ražošanas ātrumu ar glicerola-1-fosfāta

dehidrogenāzes aktivitāti (3. pielikums), novēro, ka $\Delta ade8$ un $\Delta ade6$ nemainās glicerola-1-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte ade- barotnē, salīdzinot ar N- barotni, kaut arī ar SEC-HPLC iegūtie rezultāti uzrāda tādu pašu glicerola ražošanas ātrumu kā SD+ barotnē. Celmam $\Delta ade2$ glicerola-1-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte ir līdzīga visās barotnēs. Salīdzinot specifisko acetāta ražošanas ātrumu ar acetaldehīda dehidrogenāzes aktivitāti (3. pielikums), $\Delta ade5,7$ nenovēro acetaldehīda dehidrogenāzes aktivitāti ade- barotnē, kas sakrīt ar SEC-HPLC novērojumiem, tomēr šis pats celms uzrāda arī samazinātu dehidrogenāzes aktivitāti N- barotnē, salīdzinot ar SD+. Ar SEC-HPLC veiktie novērojumi uzrāda tieši palielinātu specifisko acetāta ražošanas ātrumu N- barotnē, salīdzinot ar SD+. Celmi $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$ uzrāda līdzīgas sakarības kā HPLC veiktajos mērījumos.

Tā kā daži no veiktajiem novērojumiem nesakrīt ar sakarībām, kuras noteiktas ar SEC-HPLC oglekļa metabolītu mērījumiem, šīs metodes rezultāti ievietoti pielikumā (2. pielikums; 3. pielikums).

Novēro, ka ir tendences auktrotrofiem celmiem samazināt savu augšanas ātrumu un arī glikozes patēriņu, šūnas pakļaujot slāpekļa vai adenīna badināšanai (6. attēls; 8. attēls). Izņēmums ir $\Delta ade16-17$ celms, kura augšana un glikozes uzņemšana izpaužas atšķirīgi no pārējiem auktrotrofajiem celmiem, domājams, AICAR akumulēšanās dēļ. Šis starpmetabolīts pastiprina purīnu *de novo* biosintēzes ceļa darbību, pastiprinot *ADE* gēnu transkripciju caur Bas1p transkripcijas faktoru (Rébora et al. 2001). Vairākiem auktrotrofiem celmiem ($\Delta ade5,7$, $\Delta ade8$, $\Delta ade6$ un $\Delta ade16-17$) novēro tendenci ade- barotnē palielināties uzņemtās glikozes oglekļa plūsmu daļai glicerola veidošanā, savukārt oglekļa plūsmu daļai biomasas veidošanā – samazināties. No šiem celmiem $\Delta ade8$ un $\Delta ade6$ novēro samazinātu oglekļa plūsmu daļu glicerola veidošanā. Slāpekļa badinātiem celmiem $\Delta ade8$, $\Delta ade6$ un $\Delta ade1$ novēro makroskopiskās oglekļa bilances iztrūkumu, salīdzinot ar prototrofa celmu. Auktrotrofam celmam $\Delta ade8$ šis iztrūkums ir statistiski būtisks, salīdzinot ar prototrofa celmu. Auktrotrofam celmam $\Delta ade16-17$ novēro visizteiktāk samazinātu oglekļa plūsmu daļu biomasas veidošanā un palielinātu oglekļa plūsmu daļu glicerola veidošanā gan ade-, gan N- barotnēs.

5. SECINĀJUMI

1. Šūnu sausnas koncentrācija vienā OD vienībā samazinās slāpekļa badinātam CEN.PK 113-7D prototrofam un $\Delta ade5,7$, $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$ purīnu auktrotrofiem celmiem, savukārt barotnē bez adenīna vai pilnajā SD barotnē šūnu sausnas koncentrācijas uz OD vienību ir līdzīgas;
2. Purīnu auktrotrofie celmi uzrāda līdzīgu oglekļa plūsmu sadalījumu un makroskopisko oglekļa bilanci pilnajā SD barotnē, salīdzinot ar CEN.PK 113-7D prototrofu;
3. Adenīna vai slāpekļa badināti purīnu auktrotrofie celmi uzrāda līdzīgu makroskopisko oglekļa bilanci kā slāpekļa badināts prototrofs, izņemot auktrotrofos celmus $\Delta ade8$, $\Delta ade6$ un $\Delta ade1$, kuriem novēro oglekļa bilances iztrūkumu barotnē bez slāpekļa;
4. Purīnu *de novo* sintēzes mutācijas ietekmē glicerola metabolismu slāpekļa un purīnu badināšanas laikā;
5. CEN.PK 113-7D purīnu *de novo* sintēzes posmu *knock-out* mutantiem gan adenīna badināšana, gan arī slāpekļa badināšana izraisa trehalozes koncentrācijas pieaugumu šūnu biomasā;
6. Purīnu auktrotrofais celms $\Delta ade16-17$ atšķiras ar oglekļa plūsmu sadali barotnēs bez slāpekļa vai bez adenīna, augšanas ātrumu, glikozes patēriņu un trehalozes koncentrāciju šūnu biomasā no prototrofa un pārējiem auktrotrofiem celmiem.

PATEICĪBAS

Darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta Raugu barošanās fizioloģijas laboratorijā projekta LZP-2018/2-0213 ietvaros. Pateicos Latvijas Zinātnes Padomei par finansiālo atbalstu.

Pateicos LU Studentu zinātniskajai konferencei “Mundus et..” par piešķirto finansiālo atbalstu caur stipendiju konkursu projekta 1.1.1.3/18/A/007 “Latvijas Universitātes inovāciju granti studentiem” ietvaros.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- Agmon N., Temple J., Tang Z., Schraink T., Baron M., Chen J., Paolo M., Martin J. A., Tu B. P., Yanai I., Fenyő D., Boeke J. D. 2020. Phylogenetic debugging of a complete human biosynthetic pathway transplanted into yeast. – *Nucleic Acids Research*, 48(1):486-499.
- Boer V. M., Crutchfield C. A., Bradley P. H., Botstein D. & Rabinowitz J. D. 2010. Growth-limiting intracellular metabolites in yeast growing under diverse nutrient limitations. – *Molecular biology of the cell*, 21(1):198–211.
- Brauer M. J., Huttenhower C., Airoidi E. M., Rosenstein R., Matese J. C., Gresham D., Boer V. M., Troyanskaya O. G. & Botstein, D. 2008. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. – *Molecular biology of the cell*, 19(1):352–367.
- Brink J., Canelas A., Gulik W., Pronk J., Heijnen S., de Winde H., Daran-Lapujade P. 2008. Dynamics of Glycolytic Regulation during Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentative Metabolism. – *Applied and environmental microbiology*, 74(18):5710-5723.
- Broach J. R. 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. – *Genetics*, 192(1):73-105.
- van Dijken J. P., Bauer J., Brambilla L., Duboc P., Francois J. M., Gancedo C., Giuseppin M. L., Heijnen J. J., Hoare M., Lange H. C., Madden E. A., Niederberger P., Nielsen J., Parrou J. L., Petit T., Porro D., Reuss M., van Riel N., Rizzi M., Steensma H. Y., Pronk J. T. 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. – *Enzyme and microbial technology*, 26(9-10):706–714.
- Dunham M. & Mitchell E. 2010. Dunham Lab Chemostat Manual. <http://dunham.gs.washington.edu/chemostatv2.htm>
- Eleutherio E., Panek A., De Mesquita J.F. et al. 2015. Revisiting yeast trehalose metabolism. – *Current Genetics* 61:263–274.
- Gancedo J. M. 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. – *FEMS microbiology reviews*, 32(4):673–704.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. 1996. Life with 6000 genes. – *Science*, 274(5287): 546-567.
- Green R., Sonal, Wang L., Hart S. F. M., Lu W. et al. 2020. Metabolic excretion associated with nutrient–growth dysregulation promotes the rapid evolution of an overt metabolic defect. - *PLOS Biology* 18(8):e3000757.

- Hagman A., Säll T., Compagno C. & Piskur J. 2013. Yeast "make-accumulate-consume" life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. – PLOS ONE, 8(7):e68734.
- Hagman A., Piškur J. 2015. A Study on the Fundamental Mechanism and the Evolutionary Driving Forces behind Aerobic Fermentation in Yeast. – PLOS ONE, 10(1):e0116942.
- Hedbacker K. & Carlson M. 2008. SNF1/AMPK pathways in yeast. – Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 13:2408–2420.
- Hohmann S. 2015. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. – Current Genetics 61:373–382.
- Kayikci Ö. & Nielsen J. 2015. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. – FEMS yeast research, 15(6):fov068.
- Kokina A., Kibilds J., Liepins J. 2014. Adenine auxotrophy – be aware: some effects of adenine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* strain W303-1A. - FEMS Yeast Research, 14(5): 697–707.
- Kokina A., Ozolina Z. & Liepins J. 2019. Purine auxotrophy: possible applications beyond genetic marker. – Yeast, 36(11):649-656.
- Kunkel J., Luo X. & Capaldi A.P. 2019. Integrated TORC1 and PKA signaling control the temporal activation of glucose-induced gene expression in yeast. - Nature Communications 10:3558.
- Lange H. C. & Heijnen J. J. 2001. Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. – Biotechnology and Bioengineering, 75:334-344.
- Lynch M., Marinov G. K. 2015. The bioenergetic costs of a gene. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(51):15690-15695.
- Magasanik B., Kaiser C. A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. – Gene, 290(1-2):1-18.
- Mortimer R. K., Johnston J.R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. – Genetics.; 113(1):35-43.
- Nijkamp J.F., van den Broek M., Datema E. et al. 2012. De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. Microb Cell Fact 11, 36 (2012). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-36>
- Ozolina Z., Kokina A., Liepins J. 2017. Adenine starvation is signaled through environmental stress response system in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. – Environmental and Experimental Biology, 15:283-288

- Pedley A. M. & Benkovic S. J. 2017. A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. – *Trends in Biochemical Sciences*, 42(2):141–154.
- Pinson B., Vaur S., Sagot I., Coulpier F., Lemoine S., Daignan-Fornier B. 2009. Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. – *Genes& Development*, 23(12):1399-1407.
- Pinson B., Ceschin J., Saint-Marc C., Gaignan-Fornier B. 2019. Dual control of NAD⁺ synthesis by purine metabolites in yeast. – *eLife*, 8:e43808.
- Pronk J. T. 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. – *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5):2095-2100.
- Rébora K., Desmoucelles C., Borne F., Pinson B. & Daignan-Fornier B. 2001. Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. – *Molecular and cellular biology*, 21(23): 7901–7912.
- Rodrigues F., Ludovico P. & Leão C. 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. – In: Péter G., Rosa C. (eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*, Berlin, Heidelberg, Springer: 101-121.
- Vaseghi S., Baumeister A., Rizzi M. & Reuss M. 1999. In Vivo Dynamics of the Pentose Phosphate Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Metabolic Engineering*, 1(2):128–140.
- Verduyn C., Postma E., Scheffers W. A., van Dijken J. P. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. – *Yeast*, 8:501-517.
- Yu R., Campbell K., Pereira R. et al. 2020. Nitrogen limitation reveals large reserves in metabolic and translational capacities of yeast. *Nature Communications* 11:1881

PIELIKUMI

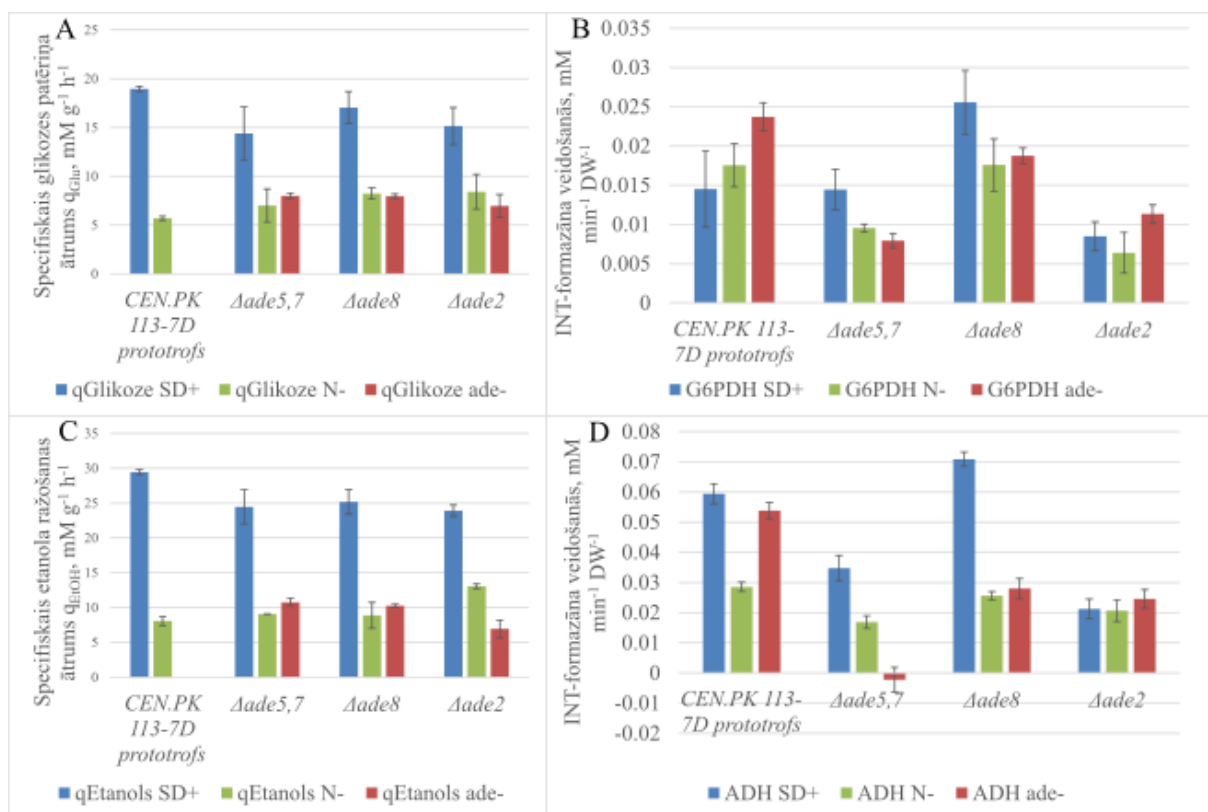
2. Pielikums

A - Specifiskais glikozes patēriņš q_{Glu} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; B – Glikozes-6-fosfāta dehidrogenāzes (G6PDH) aktivitāte izteikta pēc INT-formazāna veidošanās, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$; C - Specifiskais etanola ražošanas ātrums q_{EtOH} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; D – Alkohola dehidrogenāzes (ADH) aktivitāte izteikta pēc INT-formazāna veidošanās, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$.

Supplementary 2

A – Specific glucose uptake q_{Glu} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; B – Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) expressed by INT-formazan production, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$.

C – Specific production of ethanol q_{EtOH} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; D– Activity of alcohol dehydrogenase (ADH) expressed by INT-formazan production, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$.

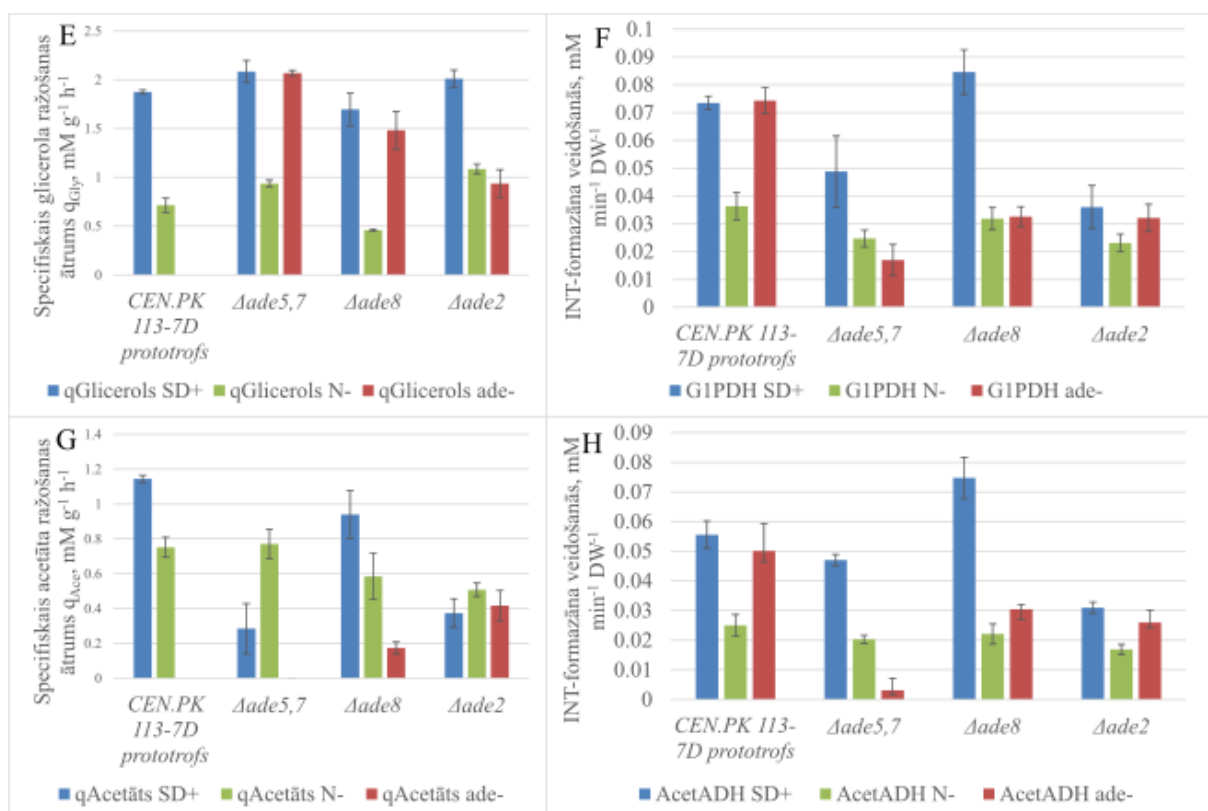


3. Pielikums

E - Specifiskais glicerola ražošanas ātrums q_{Gly} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; F – Glicerīna-1-fosfāta dehidrogenāzes (G1PDH) aktivitāte izteikta pēc INT-formazāna veidošanās, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$; G - Specifiskais acetāta ražošanas ātrums q_{Ace} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; H – Acetaldehīda dehidrogenāzes (AcetADH) aktivitāte izteikta pēc INT-formazāna veidošanās, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$.

Supplementary 3

E – Specific production of glycerol q_{Gly} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; F – Activity of glycerol-1-phosphate dehydrogenase (G1PDH) expressed by INT-formazan production, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$. G – Specific production of acetate q_{Ace} , $\text{mM g}^{-1} \text{h}^{-1}$; H– Activity of acetaldehyde dehydrogenase (AcetADH) expressed by INT-formazan production, $\text{mM min}^{-1} \text{gDW}^{-1}$.



Bakalaura darbs „Adenīna biosintēzes ceļa mutāciju ietekme uz maizes rauga centrālo oglekļa metabolismu slāpekļa un purīnu badināšanas laikā.” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Ernests Tomass Auziņš *paraksts* 28.05.2021

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag.biol. Zane Ozoliņa *paraksts* 28.05.2021.

Recenzents: *paraksts* Dr.biol. Uldis Kalnenieks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 28.05.2021.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: