

**Софийски Университет „Св. Климент Охридски“
Биологически факултет
Катедра „Биофизика и радиобиология“**



Бояна Димитрова Ангелова

**Електроиндуцирано освобождаване на биологично активни
вещества от дрожди чрез проточно третиране с импулсно
електрично поле**

АВТОРЕФЕРАТ

Професионално направление 4.3. Биологични науки (Биофизика)

Научен ръководител: *доц. Валентина Ганева*

София, 2020

Дисертационният труд съдържа 141 страници, 48 фигури, 3 таблици, 2 схеми. Използвани са 206 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Биофизика и радиобиология“ при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 10.01.2020 г.

Научно жури:

проф. дбн Яна Цонева
доц. д-р Биляна Николова
доц. д-р Валентина Ганева
доц. д-р Диляна Николова
доц. дбн Светла Данова

Защитата ще се проведе на 2020 г. от часа в на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, бул. Драган Цанков, 8.

Увод

Третирането на клетки с импулсно електрично поле води до обратимо или необратимо изменение в плазмените им мембрани, определяно като електропорация или електропермеабилзация. Днес електропорацията намира широко приложение както в молекулярната биология и медицината, така и в биотехнологиите.

Разработването на методи за ефективна и бърза екстракция на биологично активни вещества от микроорганизми е от съществен интерес. Конвенционалните техники за изолирането им включват механична дезинтеграция, химична екстракция или автолиза. Въпреки широкото си приложение, тези методи могат да повлияят стабилността, качеството и приложимостта на продукта, както и да доведат до затруднения при пречистването му. Предимствата на електроиндуцираната екстракция пред конвенционалните методи са: нетермичен метод, неувреждащ термолабилни молекули, висок и селективен добив, кратко време на обработка, възможност за третиране на големи обеми клетъчни суспензии в проточна система, ниска концентрация при използване на разтворители, липса на фрагментация на третираните клетки, улеснено пречистване на екстракта, намаляване енергийните разходи и въздействието върху околната среда. Методът се прилага и за стерилизация на течни хранителни продукти, като не се отразява върху вкуса и качеството им.

Основен недостатък на препаратите, получени на база цели инактивирани дрождеви клетки, ограничаващ използването им за хранителни нужди, е външния манопотеиново слой на клетъчната стена, който възпрепятства смилането им, и високото съдържание на нуклеинови киселини. Ето защо се търсят нови технологии и подходи, позволяващи екстракция и производство на различни биологично активни вещества от тях. Внасянето на допълнителни химични замърсители при получаване на екстракти също ограничава приложението им във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусовата индустрия.

В последно време нараства и интересът към преработката на отпадни продукти от хранително-вкусовата промишленост. Търсят се техники, които могат да намалят количеството им и в същото време да увеличат ограничените органични ресурси. Така прилагането на импулсно електрично поле може да бъде добра алтернатива за освобождаване на биологично активни вещества от тях.

Най-използваният метод за екстракция на интрацелуларни рекомбинантни белтъци е механичната дезинтеграция. Въпреки приложимостта си за обработка на големи количества клетъчна маса, освобождаването на продукта е неселективно и има значителна клетъчна фрагментация, което усложнява последващия процес на пречистване и повишава разходите по производство на рекомбинантния белтък. Проблем при пермеабилзация с химичен агент е ниската проникваемост на клетъчната им стена за освобождаване на макромолекули, в резултат от което се налага използването на литични ензими, оскъпяващи процедурата. Третирането с импулсно електрично поле е обещаваща алтернатива, тъй като е установено, че то води и до изменения в структурата на клетъчната стена, повишаващи проникваемостта ѝ.

I. Цел и задачи

Основна цел на настоящата работа бе да се изследва възможността за използване на проточно третиране с импулсно електрично поле, като алтернативен метод за екстракция на интрацелуларни биологично активни вещества (макромолекули и нискомолекулни съединения) от дрожди.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Изследване електроиндуцираното освобождаването на тотален белтък от бирени дрожди, пресовани хлебни дрожди *S. cerevisiae*, дрожди от род *Kluyveromyces*:
 - ❖ повишаване на ефикасността и скоростта на екстракция чрез оптимизиране на електричните параметри и условията на инкубация на третираните клетки;
 - ❖ изследване влиянието на клетъчната концентрация и специфичната електропроводимост върху ефикасността на електрично третиране.
2. Изследване на възможността за селективна екстракция на ензим (супероксид дисмутаза) от електропермеабилizирани дрожди *K. marxianus*.
3. Изследване освобождаването на разтворими биологично активни съединения от дрожди (аминокиселини, антиоксиданти, витамини) с цел разработване на метод за получаване на екстракти, подходящи за използване във фармацевтичната, козметична и хранително-вкусова индустрия.
4. Изследване на електроиндуцирана екстракция на разтворими рекомбинантни и нативни белтъци от дрожди *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* чрез комбинирано третиране – проточно третиране с импулсно електрично поле и последваща инкубация с литичен ензим.

II. Материали и методи

Използвани клетки: Опитите са проведени със следните щамове дрожди: Бирени дрожди, „Каменица” АД, Пловдив; *Saccharomyces uvarum* щам 180, *Kluyveromyces lactis* щам 1468, щам 199 и *Kluyveromyces marxianus* щам 1984, НБПМКК; Пресовани хлебни дрожди (Yuva, Турция, Vivo, Lesaffre Group); Рекомбинантни дрожди - *S. cerevisiae* W303-1A, Biomedal, Испания; *H. polymorpha* (pEE.5-1/RB11#2-1), ARTES Biotechnology GmbH, Германия.

Подготовка на клетките за електропорация: Преди третиране клетките се промиват и се разреждат в дестилирана вода до желаната концентрация. Специфичната електропроводимост на суспензиите се наглася с 0.2 М KCl.

Третиране с електрично поле: Третиране с електрично поле се осъществява в проточни камери с два плоски паралелни електрода от неръждаема стомана (МИХЕЛ, България) с обем от 0.3, 0.5 или 1.05 ml и съответно разстояние между електродите от 0.3, 0.4 или 0.6 cm. При всички експерименти е използван генератор на правоъгълни монополярни електрични импулси (Hydropulse mini) - максимално изходно напрежение - 2300 V, максимален пиков ток 10 A. Генераторът е прототип, произведен специално за катедра „Биофизика и радиобиология” от GBS-Elektronik GmbH, Германия). Продължителността и формата на електрични импулси се задават от двуканален генератор на форма на импулси (RIGOL DG1012, Китай). Напрежението и токът по време на прилаганите импулсите се контролират с помощта на дигитален осцилоскоп (Instek

GDS 2064, Тайван). Дебитът (обемната скорост на клетъчната суспензия), преминаваща през камерата, се поддържа чрез перисталтична помпа (Ismatec, Германия). В зависимост от зададената честота, всяка клетка получава еднакъв брой електрични импулси. След третиране клетъчните суспензии се инкубират без разреждане или след разреждане в буфер или вода, центрофугират се и супернатантите се изпозват за анализ.

Механична дезинтеграция на клетки: Процентът разрушени клетки се определя чрез преброяване на контролни и третирани клетки на камера на Тома. За 100% се приема броят клетки в контролата.

Определяне на необратима пермеабилзация: Мембранната пермеабилзация е изследвана чрез белязане на клетките с PI [Pringle и Mor, 1975].

Аналитични методи: тотален белтък [Bradford, 1976]; аминокиселини - нинхидринова реакция [Moore и Stein, 1957]; пиридоксин – микробиологичен метод (Pyridoxine Y Medium); ниацин - микробиологичен метод (Niacin Assay Medium); тотална антиоксидантна активност - TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)-метод [Re et al., 1999]; глутатион [Rahman et al., 2006]; пуринови нуклеотиди [Loring et al., 1952]; СОД - SOD Assay Kit – WST;

Статистическа обработка на данни: Представените на резултати са средни стойности и стандартно отклонение (SD), получени от данни от 3 до 7 независими повторения.

III. Резултати и дискусия

1. Електроиндуцирано освобождаване на тотален белтък от дрожди

Значително освобождаване на тотален белтък от дрожди при използване на електрично поле се наблюдава само когато мембраната на клетките е необратимо пермеабилзирана [Ganeva et al., 2003]. Необратима електропермеабилзация може да се индуцира при различни комбинации от електрични параметри: интензитет на електричното поле, брой и продължителност на електричните импулси, като се прилага или серия от кратки импулси (1 - 5 μ s) с висок интензитет (20 - 40 kV/cm), или сравнително по-дълги импулси (0.5 – 3 ms) с умерен интензитет на полето (2 - 6 kV/cm) [Ganeva et al., 2003; 2014; Goettel et al. 2013]. Установено е, че проточно третиране с импулсно електрично поле, при което се индуцира необратима мембранна пермеабилзация, води до ефикасно (над 80%) освобождаване на редица интрацелуларни ензими с молекулна маса 40 - 250 kDa от дрожди *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *K. lactis*, култивирани до късна експоненциална или стационарна растежна фаза [Ganeva et al., 2003; 2004].

1.1 Електроиндуцирана екстракция на белтък от бирени дрожди

1.1.1 Използвани бирени дрожди

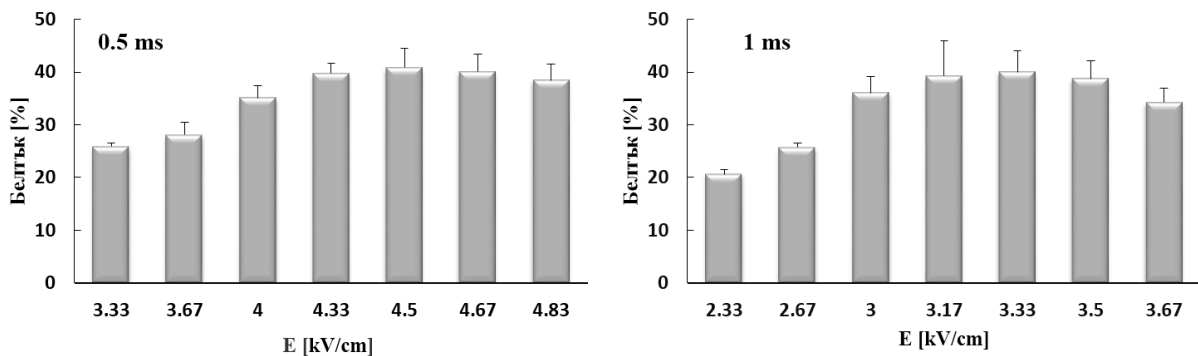
Тези експериментите са проведени с използвани бирени дрожди (трета – пета генерация), предоставени ни от пивоварна Каменица ОД, гр.Пловдив.

1.1.1.1 Оптимизиране условията на електрично третиране

Съгласно поставените в Дисертацията цели и задачи, при тези експерименти оптимизирането на електричните параметри бе направено чрез проследяване ефикасността на освобождаване на тотален белтък.

Клетките бяха третирани проточно в камера с обем 0.3 ml и разстояние между електродите 0.3 cm. Клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 50 mg DW/ml, бяха подложени на 10 електрични импулса с продължителност от 0.5 и 1 ms, честота 15 Hz при обемна скорост от 27 ml/min. Оптимизиране на електричното третиране бе осъществено чрез вариране на интензитета на полето в диапазона 2 – 5 kV/cm. Непосредствено след електрично третиране клетъчните суспензии бяха разредени двукратно в 100 mM калиево-фосфатен буфер – КФБ (50 mM крайна концентрация) с pH 8 и инкубирани за 20 h на стайна температура.

Установихме, че максимално освобождаване на тотален белтък при използване на импулси с продължителност 0.5 ms се достига при интензитет в диапазона 4.33 – 4.67 kV/cm (Фиг.1). Белязане на клетките с PI потвърди, че при тези условия 100% от клетките са с необратимо пермеабелизирана мембрана.



Фиг. 1. Освобождаване на тотален белтък от използвани бирени дрожди в зависимост от интензитета на приложеното електрично поле. Клетъчна концентрация: 50 mg DW/ml, специфична електропроводимост 100 μ S/cm. Условия на третиране: 10 импулса, продължителност **0.5 и 1 ms**, честота 15 Hz, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са разредени 1:1 в 100 mM КФБ pH 8 и са инкубирани на стайна температура за 20 часа.

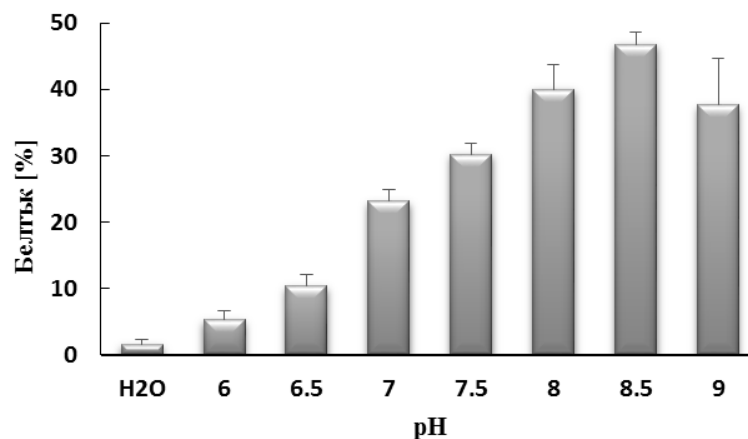
Количеството на освободения белтък е $40.8 \pm 3.37\%$ от тоталния (белтък, освободен при механична дезинтеграция на клетъчна суспензия със същата концентрация, който приемаме за 100%, коригиран спрямо процента разрушени клетки). Освобождаването на белтък от контролни нетретирани клетки, инкубирани при същите условия, не надвишава $5 \pm 1.71\%$. При прилагане на електрични импулси с продължителност 1 ms оптималният интензитет е 3.17 - 3.33 kV/cm, а максималното освободено количество белтък е $39.3 \pm 4.1\%$ от тоталния. Тоталният разтворим белтък от механично дезинтегрирани дрожди е 222 ± 15 mg/g DW клетъчна маса.

1.1.1.2. Влияние на pH на инкубационния буфер

Клетъчната стена при дрожди носи значителен отрицателен заряд [Zlotnik et al. 1984], поради което може да взаимодейства електростатично с белтъците, които преминават през нея след необратимо увреждане на плазмената мембрана. Това би могло да ограничи (или дори предотврати) тяхното освобождаване от пермеабелизираните клетки. От друга страна, както е известно, разтворимостта на

белтъците зависи силно от рН и йонната концентрация на средата. Изоелектричната точка за повечето интрацелуларни белтъци при дрожди е около 4.5 - 6 [Schwartz et al., 2001; Bretta et al., 2006], а интрацелуларното (цитозолно) рН при дрожди е около 7. При необратима електропермеабилзация изравняване на йонните концентрации, отчетено чрез измерване на специфичната проводимост на третираната суспензия, се осъществява в рамките на 15 минути след електрично третиране. рН на нетретираните клетъчни суспензии (50 mg DW/ml) във вода варира в рамките на 4.3 - 4.5. Измервания на рН на водна суспензия от необратимо пермеабилizирани клетки (с концентрация, съответстваща на 25 – 50 mg DW/ml) показаха, че рН се запазва в рамките на 5.5 – 5.8.

Ето защо, ние предположихме, че има голяма вероятност при инкубация на необратимо електропермеабилizирани клетки във вода, поради намаляване йонната концентрация и рН на цитозола, да настъпи частична агрегация на интрацелуларните белтъци. Това е друг фактор, който би възпрепятствал преминаването им през клетъчната стена.



Фиг. 2. Влияние на рН на инкубационния буфер върху освобождаване на тотален белтък от използвани бирени дрожди. Клетъчна концентрация: 50 mg DW/ml, специфична електропроводимост 100 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 3.33 kV/cm, 10 импулса, честота 15 Hz, продължителност на импулса 1 ms, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са разредени 1:1 в 100 mM КФБ или във вода (рН 5.5 – 5.8) и са инкубирани на стайна температура за 20 часа. За 100 % се приема белтъкът освободен след механична дезинтеграция в буфер с рН 8.5.

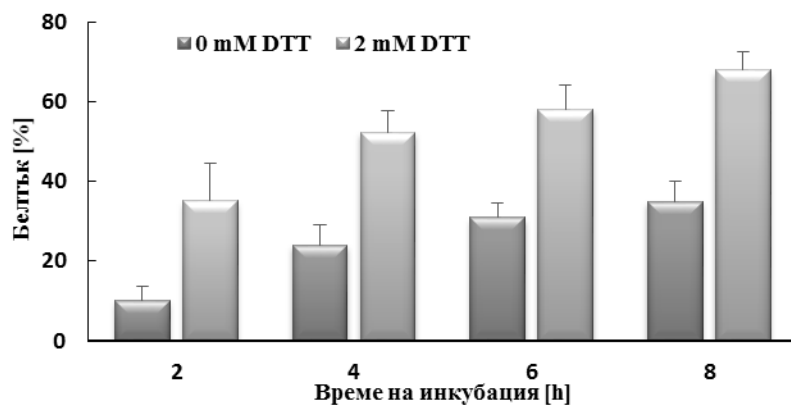
Дрождеви суспензии, третирани при оптимални електрични условия (Фиг.2), бяха ресуспендирани и инкубирани за 20 часа в 50 mM КФБ с рН в интервала от 6 до 9. Както се вижда от резултатите, представени на Фиг.8, наблюдава се силна зависимост на количеството освободен белтък от рН на инкубационния буфер, като максимален добив $47 \pm 1.81\%$ се достига при ресуспендиране в буфер с рН 8.5. Както е известно, количеството на екстрахирани разтворими белтъци от механично дезинтегрирани дрожди (*S. cerevisiae*) зависи силно от рН на средата [Sergeev et al., 1984]. Така екстракцията е най-ниска в среда с рН в диапазона 4 - 5. Максимално количество разтворим белтък се освобождава при екстракция в среда с рН в диапазона 8.5 - 12, като над рН 9 увеличаването на ефикасността по-скоро е незначително. Ето защо в нашите експерименти за 100% бе приет белтъкът освободен от клетки дезинтегрирани в буфер с рН 8.5. При инкубация на клетките във вода освобождаването на белтък е $1.6 \pm 0.7\%$.

1.1.2 Електроиндуцирано освобождаване на белтък от култивирани бирени дрожди

Тези експерименти бяха проведени с бирени дрожди *Saccharomyces uvarum* щам 180, предоставени от НБПМКК.

Дрожди бяха култивирани в YPD среда за 68 - 72 h (стационарна фаза). След промиване и ресуспендиране във вода до крайна концентрация, съответстваща на 55 mg DW/ml, и изходна проводимост 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, клетъчните суспензии бяха третирани с електрични импулси при следните условия: 10 импулса, честота 9 Hz, продължителност 0.5 ms (тотално време на третиране **5 ms**), дебит 27 ml/min в камера с обем 0.5 ml и разстояние между електродите 0.4 cm. Както и при предишните ни експерименти, оптимизиране на електричното третиране бе осъществено чрез вариране на интензитета на полето в диапазона 2.5 – 4 kV/cm. След третиране клетъчните суспензии бяха разредени 1:2 в КФБ с pH 8.5 (крайна концентрация 167 mM) и инкубирани за 16 - 18 h на стайна температура. Максималният добив на белтък при тези експериментални условия ($53.73 \pm 4.87\%$) бе получен при интензитет на полето 3.25 - 3.33 kV/cm.

Както е известно, един от факторите, определящи проницаемостта на клетъчната стена за макромолекули, са дисулфидните връзки между манобелтъците, изграждащи външния й слой [Zlotnik et al., 1984; de Nobel et al., 1989]. Третиране с дитиотреитол (ДТТ) - 1 mM крайна концентрация, повишава ефикасността на екстракция на белтъци от механично-дезинтегрирани дрожди [Shetty and Kinsella, 1978]. Предишни изследвания показаха, че наличието на ДТТ (1 – 10 mM крайна концентрация) в инкубационната среда, значително повишава ефикасността и скоростта на освобождаване на редица интрацелуларни ензими от електропермеабелизирани дрожди [Ganeva and Galutzov, 1999; Ganeva et al., 2003].



Фиг. 3. Влияние на ДТТ върху освобождаването на тотален белтък от бирени дрожди *S. uvarum* 180. Клетъчна концентрация: 55 mg DW/ml, специфична електропроводимост 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Условия на третиране: интензитет 3.25 kV/cm, 10 импулса, честота 15 Hz, продължителност на импулса 0.5 ms, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са разредени 1:2 в 250 mM КФБ pH 8.5 с или без ДТТ и са инкубирани на стайна температура 18 часа.

Установихме, че инкубацията в присъствие на ДТТ (2 mM крайна концентрация), води до повишаване ефикасността на освобождаване на тотален белтък, като на 8-ми час добивът достига $68 \pm 4.63\%$ от тоталния (Фиг.3). За сравнение след инкубация при същите условия без ДТТ освобождаването му е почти два пъти по-ниско – $35 \pm 4.9\%$. Инкубация при по-висока концентрация на тиоловото съединение (5 mM) при тези условия не повишава освобождаването на белтък.

1.2. Електроиндуцирано освобождаване на белтък от пресовани хлебни дрожди

1.2.1 Оптимизиране условията на третиране

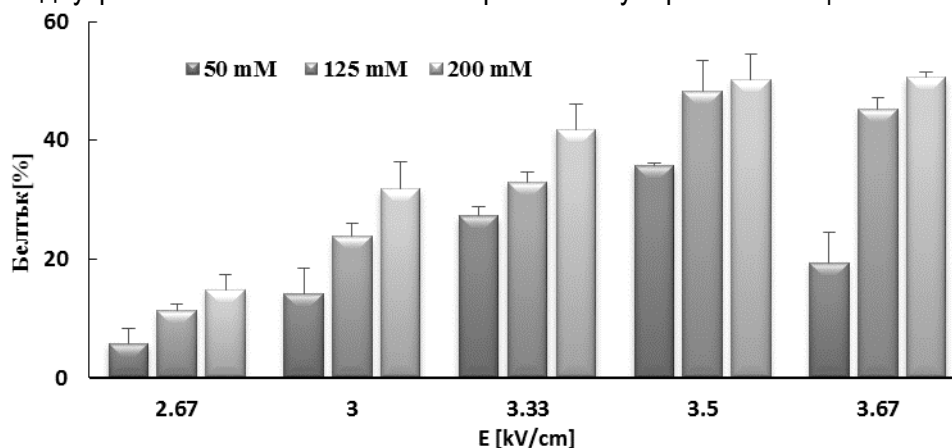
Първите експерименти по оптимизиране на електричните условия бяха сходни с тези, проведени с бирени дрожди. Клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 50 mg DW/ml, и изходна специфична проводимост 100 μ S/cm бяха третирани с 10 импулса с продължителност 1 ms (тотално време на третиране **10 ms**) при дебит 27 ml/min и интензитет на полето в диапазона 2.5 – 3.7 kV/cm. Използваната камера е с обем 0.3 ml и разстояние между електродите 0.3 cm.

Както и в експериментите с бирени дрожди, третираните клетъчни суспензии бяха разредени двукратно в 100 mM КФБ с pH 8 и инкубирани за 20 h на стайна температура.

Максимално освобождаване на белтък при прилагане на импулси с продължителност 1 ms бе получено при интензитет на полето 3.5 kV/cm (Фиг.4). При прилагане на импулси с интензитет над оптималния наблюдавахме леко понижение в количеството освободен белтък. Полученият при тези условия на инкубация добив на белтък (30 - 36% от тоталния разтворим белтък) е сравнително нисък, независимо че при прилаганите комбинации от електрични се достига до 100% необратима пермеабилзация, което бе установено след белязане на клетките с PI. Тоталният разтворим белтък от механично дезинтегрирани хлебни дрожди е 199 ± 8 mg/g DW клетъчна маса.

1.2.2 Оптимизиране на инкубационната среда

Поради ниския добив, ние изследвахме влиянието на концентрацията на буфера върху ефикасността на освобождаване, като третираните клетъчни суспензии бяха разредени двукратно в 250 и 400 mM КФБ с pH 8 и инкубирани по същия начин.



Фиг. 4. Освобождаване на тотален белтък от хлебни дрожди в зависимост от интензитета на приложеното електрично поле. Клетъчна концентрация: 50 mg DW/ml, специфична електропроводимост 100 μ S/cm. Условия на третиране: 10 импулса, честота 15 Hz, продължителност на импулса 1 ms, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани при разреждане 1:1 в 100, 250, 400 mM КФБ pH 8 на стайна температура за 20 часа.

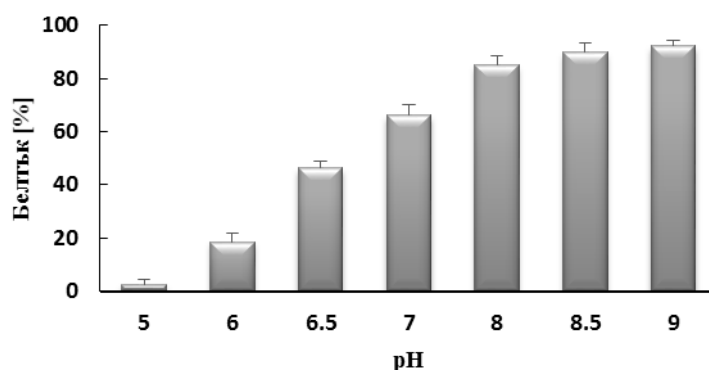
Както се вижда от Фиг. 4, с повишаване концентрацията на буфера се повишава и ефикасността на освобождаване, най-вероятно поради по-високия буферен капацитет.

При инкубация на клетките за 20 часа в 200 mM КФБ добивът достига $50 \pm 4.19\%$. Количеството освободен белтък от контролни клетки е незначително – от 1 до 3% и не се повлиява от инкубационния буфер при изследваните 3 концентрации.

1.2.3 Влияние на рН на инкубационния буфер и тиолово съединение

Както и при експериментите с бирени дрожди, проследихме освобождаването на белтък в зависимост от рН на инкубационния буфер. При тези експерименти с цел повишаване ефикасността на освобождаване на белтък клетките бяха инкубирани в буфер с по-висока концентрация и бе добавяно тиолово съединение (ДТТ).

Клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 37.5 mg DW/ml, бяха третирани с 15 импулса с продължителност 0.8 ms (тотално време на третиране **12 ms**), интензитет в диапазона 2.5 – 4 kV/cm, при скорост на потока 9 ml/min. Установихме, че 100% необратима пермеабилзация се индуцира при прилагане на интензитет 3.25 – 3.33 kV/cm. За да определим ефекта на ДТТ върху ефикасността на освобождаване на белтък, непосредствено (5 - 10 min) след прилагане на електрично третиране, клетъчната суспензия беше разрежена 1:2 в 250 mM калиево-фосфатен буфер с рН в диапазона 5 - 9, като беше добавен ДТТ до крайна концентрация 2 mM и суспензиите бяха инкубирани за 14 - 16 h на стайна температура (24 – 25 °C). За 100% бе приет белтъкът, освободен от клетки дезинтегрирани в буфер с рН 8.5, 2 mM ДТТ.



Фиг. 5. Влияние на рН на инкубационния буфер върху освобождаване на тотален белтък от хлебни дрожди. Клетъчна суспензия: 37.5 mg DW/ml, специфична електропроводимост 150 $\mu\text{S/cm}$. Условия на третиране: интензитет 3.33 kV/cm, 15 импулса, честота 7.5 Hz, продължителност на импулса 0.8 ms, дебит 9 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са разреждени до крайна концентрация 12.5 mg DW/ml в 167 mM КФБ, добавен е ДТТ до крайна концентрация 2 mM и суспензиите са инкубирани на стайна температура за 16 часа.

Установихме, че по-съществено освобождаване се наблюдава при инкубация на клетките в буфер с рН над 6, а максимално освобождаване ($92 \pm 2.19\%$) настъпва при алкални условия в диапазона рН 8 – 9 (Фиг.5). При инкубация на порираните клетки във вода освобождаването на белтък е незначително (около и под 1%) дори при наличие на тиолово съединение.

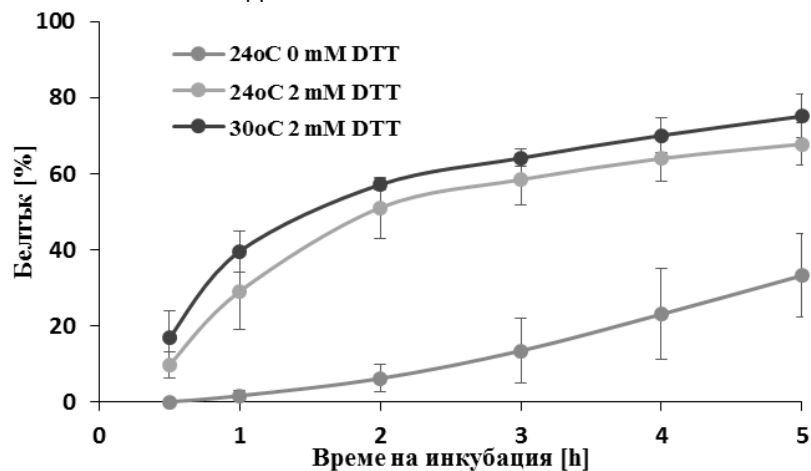
1.2.4 Влияние на температурата и наличието на тиолово съединение върху кинетиката на освобождаване на белтък от пресовани хлебни дрожди

Резултатите представени по-горе показват, че при подходяща концентрация и рН на буфера, както и при наличие на редуциращ агент, е възможно да се екстрахира

значителна част от интрацелуларния разтворим белтък от клетки в стационарна фаза при инкубация на стайна температура. Тази процедура е удобна, защото не се изисква специално темперирание на суспензиите по време на инкубацията. От друга страна процесът на освобождаване на белтък е сравнително бавен и за да се получи добив от порядъка на 90 – 95% е нужна продължителна (14 – 16 h) инкубация, при което съществува потенциална възможност за бактериално замърсяване. Ето защо, с цел оптимизиране условията на инкубация, ние проследихме и освобождаване на белтък при по-висока температура.

При тези експерименти използвахме камера с обем 0.5 ml и разстояние между електродите 0.4 cm. Клетъчната суспензия (63 mg DW/ml) беше третирана с 19 импулса с продължителност 0.5 ms, честота на импулсите 17.1 Hz (тотално време на третиране **9.5 ms**) при обемна скорост 27 ml/min. При тези условия (брой и продължителност на импулсите) оптимален интензитет на полето е 3 kV/cm. Третираната клетъчна суспензия разреждахме в КФБ, рН 8.5, съдържащ ДТТ. Крайната концентрация на клетките бе 21 mg DW/ml, крайна концентрация на буфера и ДТТ – 167 mM и 2 mM респективно.

Проследихме кинетиката на освобождаване на белтък при три различни условия (Фиг. 6). ДТТ дори при тази ниска концентрация значително ускорява процеса на освобождаване. Така белтъкът, освободен на 5-ти час от клетки инкубирани на 24°C в буфер съдържащ ДТТ, е $68 \pm 5.53\%$, а без ДТТ добивът е $33.26 \pm 11\%$. Установихме, че редуциращият агент повишава значително скоростта на освобождаване на белтък в началните часове на инкубация. Инкубацията при по-висока температура (30 °C) също повишава освобождаването на белтък, но при по-продължителна инкубация (18 h) добивът при 30 и 25 °C е почти еднакъв.



Фиг. 6. Влияние на температурата и ДТТ върху кинетиката на освобождаване на тотален белтък от хлебни дрожди. Клетъчна суспензия: 63 mg DW/ml, специфична електропроводимост 150 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 3 kV/cm, честота 17.1 Hz, 19 импулса, продължителност на импулса 0.5 ms, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани при разреждане 1:2 в 250 mM КФБ рН 8.5 с или без ДТТ.

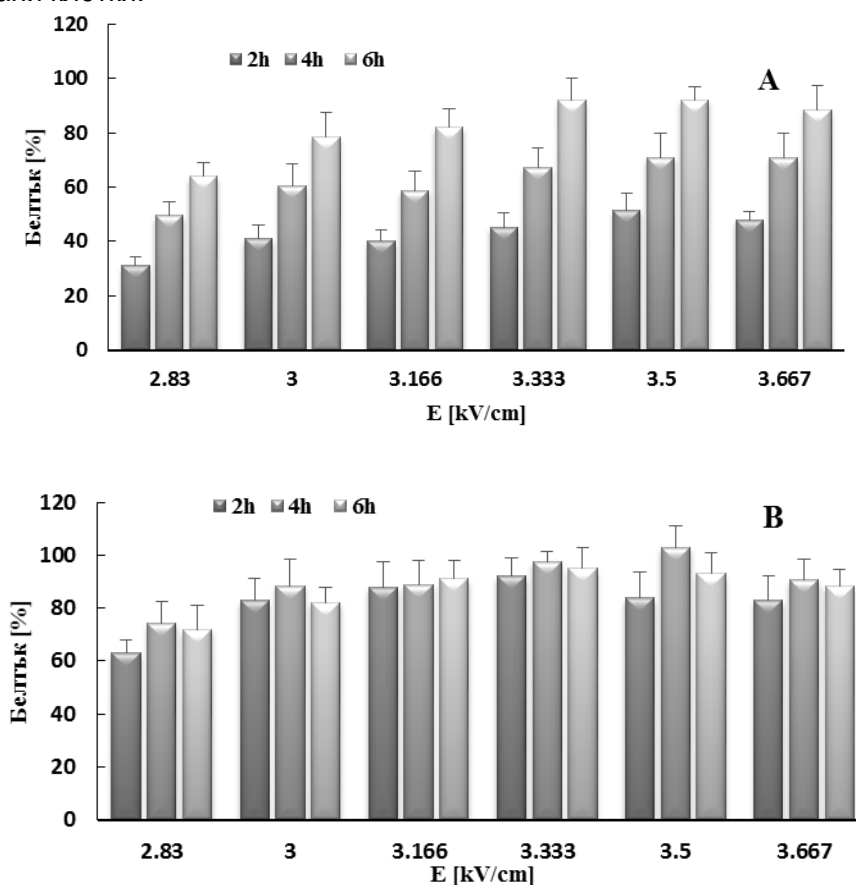
1.3 Електроиндуцирано освобождаване на белтък от дрожди *Kluyveromyces*

Наред с дрождите *Saccharomyces*, дрождите от род *Kluyveromyces* представляват значителен интерес, както в научен, така и в биотехнологичен аспект. Те имат GRAS статус. Поради наличието на ензима β -галактозидаза, могат да натрупват значителна

клетъчна маса при култивиране на евтина среда - суроватка, която е отпадъчен продукт [Grba et al., 2002; Mahmood, 2015].

1.3.1 Електроиндуцирано освобождаване на белтъци от *K. lactis* 199

Експериментите бяха проведени с клетки *K. lactis* шам 199, култивирани до късна експоненциална фаза ($OD_{660} = 16$). Електричното третиране бе осъществено при използване на камера с обем 0.3 ml (3 cm разстояние между електродите). След промиване и ресуспендиране в дестилирана вода, клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 19 mg DW/ml, бяха третирани с 10 импулса с продължителност 1.5 ms (тотално време на третиране 15 ms) при обемна скорост 27 ml/min и интензитет в диапазона 2.83 – 3.67 kV/cm. Третираните клетъчни суспензии бяха разреждени двукратно в КФБ (крайна концентрация 125 mM) и инкубирани на стайна температура. Установихме, че при тези условия на третиране оптималният интензитет на полето е в диапазона 3.33 - 3.5 kV/cm. Освобождаването на белтък бе сравнително бързо, като на шести час белтъкът в супернатантата от порирани клетки достига $92 \pm 8\%$ от този в лизата, получен чрез механична дезинтеграция (Фиг. 7 А). Както и при другите изследвания, установихме, че освобождаването на белтък зависи от концентрацията на буфера, като при 100 и 200 mM добивът, отчетен на осми час, достига 50 – 55% от този при механично дезинтегрирани клетки.

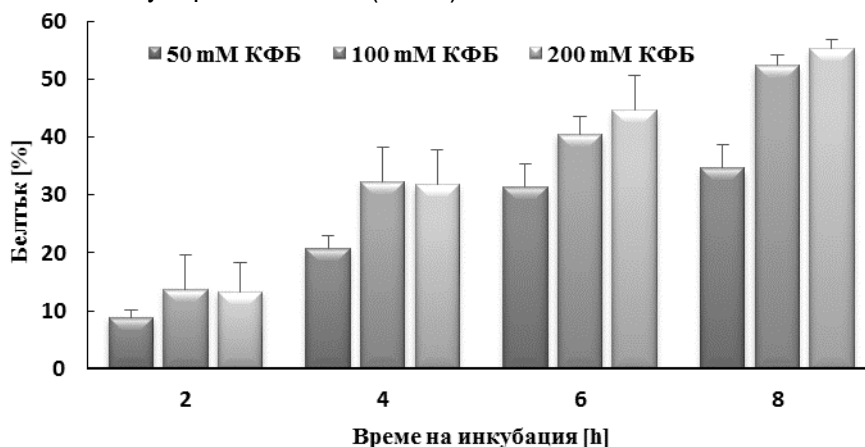


Фиг. 7. Освобождаване на тотален белтък от дрожди *Kluyveromyces lactis* 199 при инкубация без и с ДТТ в зависимост от интензитета на приложеното електрично поле. Клетъчна суспензия: 19 mg DW/ml, специфична електропроводимост 100 μ S/cm. Условия на третиране: 10 импулса, честота 15 Hz, продължителност на импулса 1.5 ms, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са разреждени 1:1 в 250 mM КФБ рН 7.5 **А**) без ДТТ или **В**) с 5 mM ДТТ и инкубирани на стайна температура 2, 4 или 6 часа.

Добавяне на ДТТ в инкубационния буфер (Фиг. 7 В) значително ускорява белтъчния ефлукс, като още на втори час се достига освобождаване на около 90% от тоталния разтворим белтък – ефективност, която не е наблюдавана с друг вид (род) дрожди.

1.3.2 Електроиндуцирано освобождаване на белтък от *K. marxianus* щам 1984

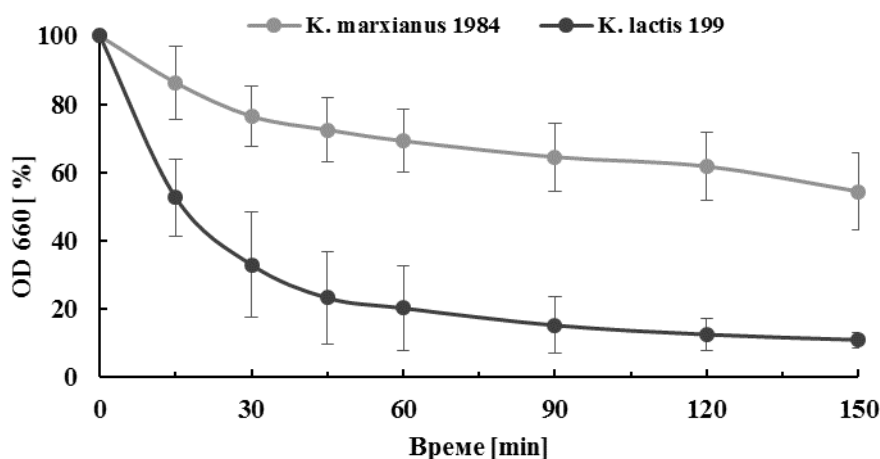
Както и в експериментите с *K. lactis*, за да индуцираме необратима електропермеабилзация, клетъчна суспензия с концентрация, съответстваща на 25 mg DW/ml, бе третирана с 10 импулса с продължителност 1.5 ms при обемна скорост на потока 27 ml/min, като оптимизирането на електричните условия бе осъществено чрез вариране на интензитета на електричното поле. Установихме, че оптимален интензитет за този щам е 4.33 kV/cm. При тези електрични условия изследвахме влиянието на концентрацията на буфера, в който се инкубират клетките (Фиг.8).



Фиг. 8. Влияние на концентрацията на буфера върху освобождаването на тотален белтък от дрожди *K. marxianus* 1984. Клетъчна концентрация: 25 mg DW/ml, специфична електропроводимост 100 μ S/cm. Електрични условия: интензитет 4,33 kV/cm, 10 импулса, продължителност на импулса 1.5 ms, честота 15 Hz, дебит 27 ml/min. След третиране суспензиите са разредени 1:1 в 100, 200 и 400 mM КФБ с pH 8 и са инкубирани на стайна температура.

1.3.3 Изследване на проницаемостта на клетъчната стена

Сравняване на данните, получени с *K. lactis* и *K. marxianus*, показват, че освобождаването на белтък при едни и същи условия на инкубация е значително по-бързо и ефикасно при *K. lactis* 199. Имайки предвид, че освобождаването на белтък е проследено при електрични условия, индуциращи необратима мембранна пермеабилзация и в двата случая, то наблюдаваните различия биха могли да бъдат отдадени на различията в порьозитета (проницаемостта) на клетъчните им стени. За да проверим това ние проведохме т.нар. литиказен тест.



Фиг. 9. Литиказен тест за определяне проницаемостта на клетъчните стени на контролни клетки *K. marxianus* 1984 и *K. lactis* 199. Клетъчна концентрация: 10 mg DW/ml в 200 mM КФБ рН 7, литиказа 50 U/ml, инкубация на 30 °C. 100 % съответства на OD преди добавяне на ензима.

Чувствителността на дрождите към литични ензими (литиказа, зимолиаза) често се използва за сравняване порьозитета на клетъчната стена между различни щамове и за разкриване на промени в структурата ѝ в зависимост от физиологичното състояние, условията на растеж, химични агенти или мутации [De Nobel et al., 2000; Simões et al., 2003].

Данните представени на Фиг.9 показват, че дрождите *K. lactis* 199 са значително по-чувствителни към действието на литиказа. Оптичната плътност на клетъчната суспензия след 150 min инкубация с литичен ензим достига $11.44 \pm 2.24\%$, което съответства на почти пълен клетъчен лизис. За сравнение OD на клетъчната суспензии на *K. marxianus* 1984 за същия период на инкубация е $54.45 \pm 19\%$ от изходната.

1.4 Влияние на клетъчната концентрация и специфичната електропроводимост на клетъчните суспензии върху оптималния интензитет

Наред с електричните условия, големината, формата и възрастта на клетките, има два важни фактора, които в голяма степен могат да модулират ефекта на импулсното електрично поле върху клетъчната мембрана - клетъчната концентрация и специфичната електропроводимост на суспензията преди и по време на електрично третиране. При работа с гъсти клетъчни суспензии тези два фактора са взаимно зависими.

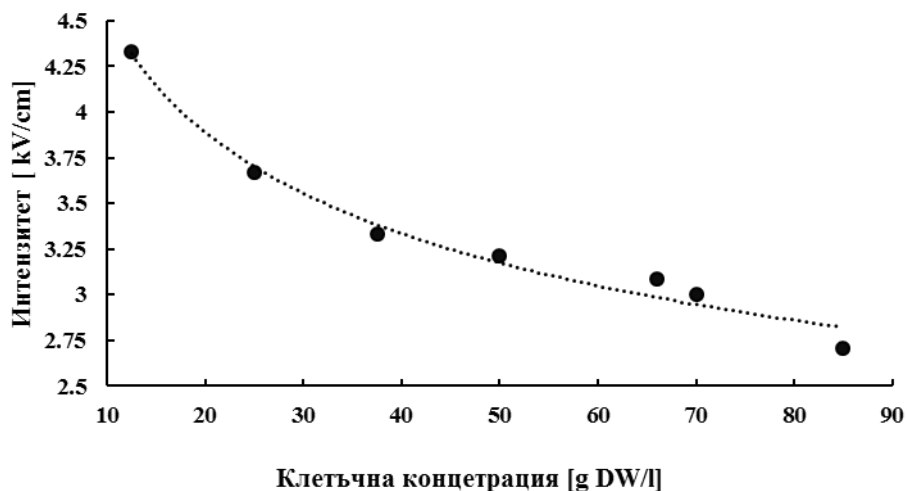
Показано е, че ефектът на електричното поле нараства при повишаване на йонната сила на средата, в която се намират клетките по време на електрично третиране [Rols and Teissie, 1990; Neumann et al., 1992]. При третиране на гъсти клетъчни суспензии, изменението в интегритета на мембраните води до бързо освобождаване на йони и значително повишаване на проводимостта още по време на прилагане на импулсите, което допълнително усилва техния ефект върху мембрания интегритет [Pavlin et al., 2005; Pavlin et al., 2007].

1.4.1 Влияние на клетъчната концентрация

За да бъде третирането с импулсно електрично поле приемлива алтернатива на конвенционалните методи, използвани за екстракция на интрацелуларни компоненти, е важно ефикасността на третиране да се запазва при високи клетъчни концентрации. Литературните данни за влиянието на клетъчната концентрация върху електроиндуцираните изменения в мембраните са противоречиви. Съгласно данните на едни автори ефектът на електрично поле намалява с повишаване на клетъчната концентрация над 10^6 кл/ml [Gaskova et al., 1996]. Zakhem et al. [2006] установяват, че при едни и същи параметри на електричното поле, мембранното увреждане нараства с повишаване на клетъчната концентрация до 3.3×10^9 кл/ml. При по-високи клетъчни концентрации е регистрирано намаление в ефекта на електрично третиране. Авторите обясняват това с възникване на нехомогенност на електричното поле, в резултат на което част от клетките попадат в зони с по-нисък интензитет на полето и не се пермеабелизират.

Тук ние изследвахме зависимостта на оптималния интензитет на полето от клетъчната концентрация, проследявайки ефикасността на освобождаването на белтък от хлебни дрожди *S. cerevisiae*.

Хлебни дрожди с клетъчна концентрация от 12.5, 25, 37.5, 50, 66, 70 и 85 mg DW/ml бяха третирани при условия, аналогични на тези, приложени при изясняване на рН зависимостта (Фиг.5). За всяка различна концентрация оптимизирахме електричното третиране. След третиране клетъчните суспензии бяха разредени в КФБ с рН 8.5 (125 mM крайна концентрация, 2 mM ДТТ) и инкубирани на стайна температура. Установихме значително намаление в оптималния интензитет на полето с повишаване на клетъчната концентрация (Фиг.10). На база оптималните електрични условия – U (напрежение), I (пиков ток), продължителност (t) и честота на електричните импулси (F), бе изчислената средна мощност на третиране (P) ($P = U.I.t.F$).

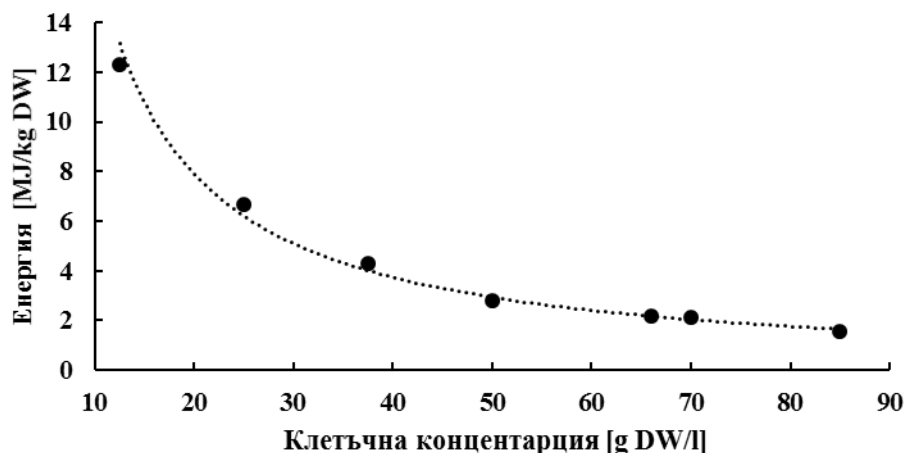


Фиг. 10. Зависимост на оптималния интензитет на полето от клетъчната концентрация на третираната суспензия от хлебни дрожди. Клетъчна концентрация: 12.5 – 85 mg DW/ml; специфична електропроводимост 150 μ S/cm. Условия на третиране: 15 импулса, продължителност 0.8 ms, честота 7.5 Hz, дебит 9 ml/min. След електрично третиране клетъчните суспензии бяха разредени в КФБ с рН 8.5 (167 mM, крайна концентрация, 2 mM ДТТ) и инкубирани за 16 часа на стайна температура.

Също така бе изчислена и специфичната енергия на електрично третиране (kJ/l третирана суспензия) за всяка изследвана концентрация - при оптимални електрични условия бе в диапазона 120 - 130 kJ/l.

При по-концентрирани суспензии след подаване на първите електрични импулси, в резултат от нарушение в целостта на мембраните, се освобождава по-голямо количество йони, в сравнение със суспензии с по-ниска концентрация. Ето защо, би могло да се очаква, че при третиране на по-концентрирани клетъчни суспензии повишаването на температурата в резултат на Джаулово загряване ще бъде по-значително. Редица литературни данни сочат наличие на адитивен или синергичен ефект на температурата на клетъчната суспензия и импулсното електрично поле за нарушаване интегритета на мембраните.

При изследване екстракцията на различни интрацелуларни компоненти от микроводорасли, Goettel et al. [2013] установяват, че няма изменение в ефикасността на третиране до концентрации, съответстващи на 167 g DW/l. Съгласно техни данни, енергията нужна за пермеабелизиране и екстракция на различни интрацелуларни компоненти от клетъчни суспензии, която те дефинират като PEF (pulsed electric field) processing energy (MJ/kg DW), намалява силно с повишаване на клетъчната концентрация. За да можем да сравним нашите резултати с полученото от тях, ние определихме по описания начин т. нар. "PEF processing energy". На Фиг. 11 е представена зависимостта на този параметър от клетъчната концентрация.



Фиг. 11. Зависимост на енергията нужна за пермеабелизация на хлебни дрожди от сухата клетъчна маса - PEF processing energy – MJ/kg DW.

1.4.2 Влияние на електропроводимостта на клетъчната суспензия преди третиране

При редица експерименти с различни дрождеви системи, работейки с изходни проводимости на суспензиите в диапазона 50 – 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, бе установено, че дори слаби изменения (около 10% от стойността) на проводимостта на клетъчната суспензия водят до изменение в оптималния интензитет и респективно в ефекта на електричното поле.

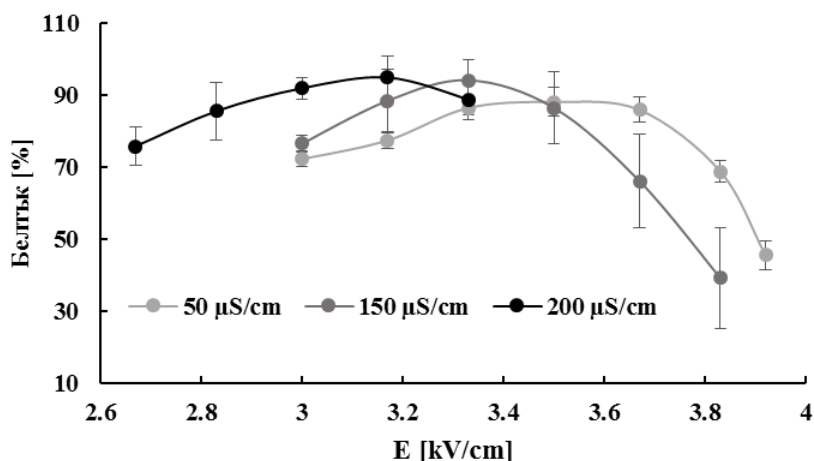
Тук ние проследихме изменението на оптималния интензитет в зависимост от изходната проводимост на клетъчните суспензии.

Изследвахме оптималния интензитет на електричното поле при работа със суспензии от хлебни дрожди с еднаква концентрация (37.5 mg DW/ml), но различна

специфична електропроводимост - 50, 150 и 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Електропроводимостта довеждаме до желаната чрез добавяне на 0.2 М КСl. При 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ оптимално освобождаване имаме при интензитет 3.5 kV/cm – $88 \pm 1.2\%$, при 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$ оптималният интензитет е 3.33 kV/cm ($94 \pm 5.67\%$), а при 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ – 3 kV/cm ($99 \pm 2.82\%$).

На база получените резултати можем да заключим, че сравнително малки изменения в изходната специфична електропроводимост водят до понижаване на оптималния интензитет на прилаганото електрично поле.

Наблюдаваното намаление на оптималния интензитет с нарастване на проводимостта би могло да бъде частично обяснено с по-значителни изменения в интегритета на мембраната, настъпващи след първия (първите няколко импулса), най-вероятно поради по-бързото повишаване на температурата.



Фиг. 12. Зависимост на оптималния интензитет на електричното поле от изходната специфичната електропроводимост на клетъчни суспензии от хлебни дрожди. Клетъчна концентрация: 37.5 mg DW/ml свежо тегло. Условия на третиране: 15 импулса, честота 7.5 Hz, продължителност на импулса 0.8 ms, дебит 9 ml/min. Третиране клетъчните суспензии са разредени 1:2 в 250 mM КФБ рН 8.5, добавен е ДТТ до крайна концентрация 2 mM, клетките са инубирани на стайна температура за 20 часа.

2. Електроиндуцирано освобождаване на супероксид дисмутаза от *K. marxianus* щам 1984

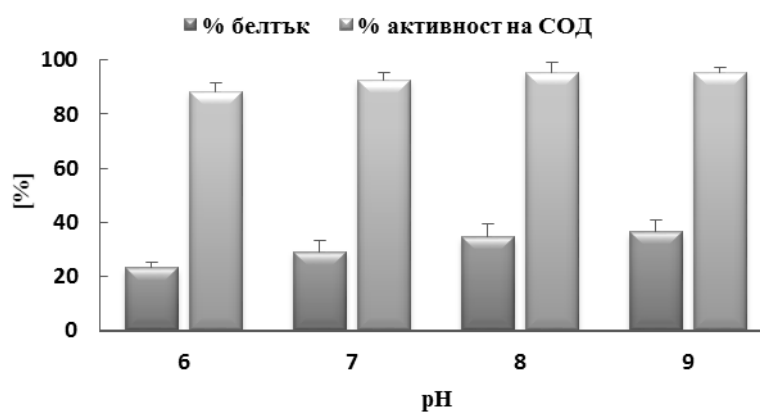
Ензимът супероксид дисмутаза (СОД) катализира дисмутирането на супероксидните радикали (O_2^-) до водороден пероксид и молекулен кислород и има основна роля в ензимната протекция на клетките от вредното въздействие на активните форми на кислорода, генерирани в хода на естествените метаболитни процеси или под действие на външен стрес. Особен интерес представлява Cu/Zn СОД, която понастоящем намира много важни приложения в медицината, фармацевтичната и хранително-вкусова индустрия [Yabe et al., 2001; Corvo et al., 2002; Emerit et al., 2006].

Cu/Zn СОД е сравнително малък белтък – хомодимер с молекулна маса 43 kDa и е локализирана в цитозола. От друга страна, както бе показано в нашите изследвания по електроиндуцирано освобождаване на белтък (Фигури 8, 9), дрождите *K. marxianus* щам 1984 имат клетъчна стена, която се характеризира с по-ниска проникваемост за макромолекули, в сравнение с тази на *K. lactis* щам 199 и 1468. Имайки предвид данни, получени с други дрождеви системи [Ganeva et al., 2003], ние решихме, че това са добри

предпоставки за ефикасно изолиране и частично пречистване на този ензим чрез използване на импулсно електрично поле.

При всички тези експерименти, за да индуцираме необратима пермеабилзация, клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 25 mg DW/ml, бяха третирани с комбинация от електрични параметри, която бе оптимална за екстракция на белтък (Фиг. 8).

Стремежът ни при това изследване бе да намерим подходящи условия на инкубация след третиране, където има максимално освобождаване на ензим и едновременно с това минимално освобождаване на тотален белтък. При тези експерименти третираните клетъчни суспензии бяха разреждени двукратно в 100 mM КФБ с рН 6 - 9 и инкубирани за 8 часа на стайна температура (Фиг.13). Получените данни показват, че няма съществена разлика в освобождаването на СОД в зависимост от рН на инкубационния буфер.

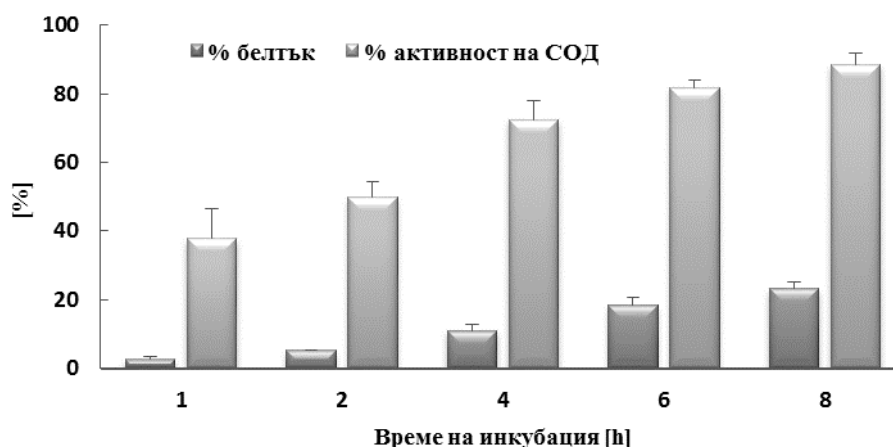


Фиг. 13. Влияние на рН на инкубационния буфер върху освобождаването на тотален белтък и СОД от дрожди *K. marxianus* 1984. Клетъчна суспензия: 25 mg DW/ml, специфична електропроводимост 100 μ S/cm. Условия на третиране: както описаните на Фиг.8. След третиране клетъчните суспензии са разреждени 1:1 в 100 mM КФБ и инкубирани на стайна температура за 8 часа. 100% - ензимна активност и белтък в разтворимата фракция на клетъчен лизат получен чрез механична дезинтеграция на клетките.

Освободената ензимна активност е в рамките на 89 – 95% от тази в лизата на 8-ми час от инкубацията. От друга страна, освободеният тотален белтък бе най-малко при инкубация в буфер с рН 6 ($23 \pm 2\%$).

Изследвахме и кинетика на освобождаване на СОД и тотален белтък след двукратно разреждане на порираната клетъчна суспензия в 100 mM КФБ с рН 6 (Фиг. 14).

Установихме, че СОД, който е сравнително малък белтък, дифундира значително по-бързо в сравнение с останалите вътреклетъчни белтъци. Освободената активност на 1-ви час от инкубацията достига $37.85 \pm 8.61\%$ от тази при механично дезинтегрирани клетки, докато освободеният белтък е само $2.59 \pm 0.96\%$, на 8-ми час освободената ензимна активност е $88.49 \pm 3.34\%$, а освободеният белтък е $23 \pm 2\%$, т.е. при тези условия на инкубация е възможно да се постигне, както ефикасна екстракция, така и частично пречистване на белтъка (Таблица 1).



Фиг. 14. Кинетика на освобождаване на тотален белтък и СОД от дрожди *K. marxianus* 1984. Клетъчна суспензия и условия на третиране: както описаните на Фиг. 8. След третиране клетъчните суспензии са разреждени 1:1 в 100 mM КФБ рН 6 и са инкубирани на стайна температура.

Инкубация след третиране с ИЕП	Обем екстракт	Активност на СОД	Тотална активност на СОД	Белтък	Специфична активност на СОД	Белтък	Активност на СОД	Фактор на пречистване
h	ml	U/ml	U	mg	U/mg	%	%	
1	9.5	28.03	268.85	0.67	401.27	2.59	37.85	14.59
2	9.5	36.83	349.89	1.33	263.08	5.29	49.74	9.40
4	9.5	53.65	509.68	2.66	191.61	10.96	72.45	6.61
6	9.5	60.63	575.96	4.47	128,85	18.28	81.88	4.48
8	9.5	65.52	622.44	5.61	110.95	23,11	88,49	3.83

Таблица 1. Освобождаване на тотален белтък и активност на СОД от дрожди *K. marxianus* 1984. Клетъчна суспензия и условия на третиране: както описаните на Фиг. 25. След третиране клетъчните суспензии са разреждени 1:1 в 100 mM КФБ рН 6 и са инкубирани на стайна температура.

Специфичната ензимна активност на СОД в екстракт, получен чрез механична дезинтеграция е 28.97 U/ml, докато на 1-ви час от инкубацията, където количеството освободен белтък е много ниско, специфичната активност в екстракта е 401.27 U/ml. На 8-ми час, когато имаме и значително освобождаване на белтък, тя е 110.95. В първия случай факторът на пречистване е 14.6, а във втория – 3.8. Най-вероятна причина за задържането на голяма част от интрацелуларните белтъци е, от една страна, ниската проницаемост на клетъчната стена, тъй като дори при рН 8 - 9 освобождаването на тотален белтък е сравнително ниско. От друга страна, изоелектричната точка (pI) на редица цитозолни белтъци при дрожди е около 5.5, което би могло да предизвика частична агрегация и допълнително да затрудни преминаването им през клетъчната стена.

3. Електроиндуцирана екстракция на нискомолекулни биологично активни вещества

Както бе показано в предходната секция, при инкубация на електропермеабилзираните клетки във вода освобождаването на белтък (макромолекули) при повечето дрождеви системи е незначително дори при продължителна (20 – 24 h) инкубация. Задържането в клетките при тези условия може да се обясни с агрегиране на интрацелуларните разтворими белтъци, поради понижаване на цитозолното рН и йонната концентрация. Тъй като електричното третиране не води до клетъчна фрагментация (клетъчен лизис), а само до пермеабилзация, белтъчни агрегати не могат да преминават през клетъчна стена, най-вероятно поради нейния ограничен порьозитет. Тези условия обаче не би трябвало да възпрепятстват освобождаването на ниско молекулни водоразтворими субстанции от пермеабилзирани дрожди.

3.1 Бирени дрожди

3.1.1 Освобождаване на аминокиселини

3.1.1.1 Оптимизиране на електричните условия

Тези експерименти бяха проведени с използвани бирени дрожди (3 – 5 генерация), предоставени ни от пивоварна Каменица ОД (гр. Пловдив).

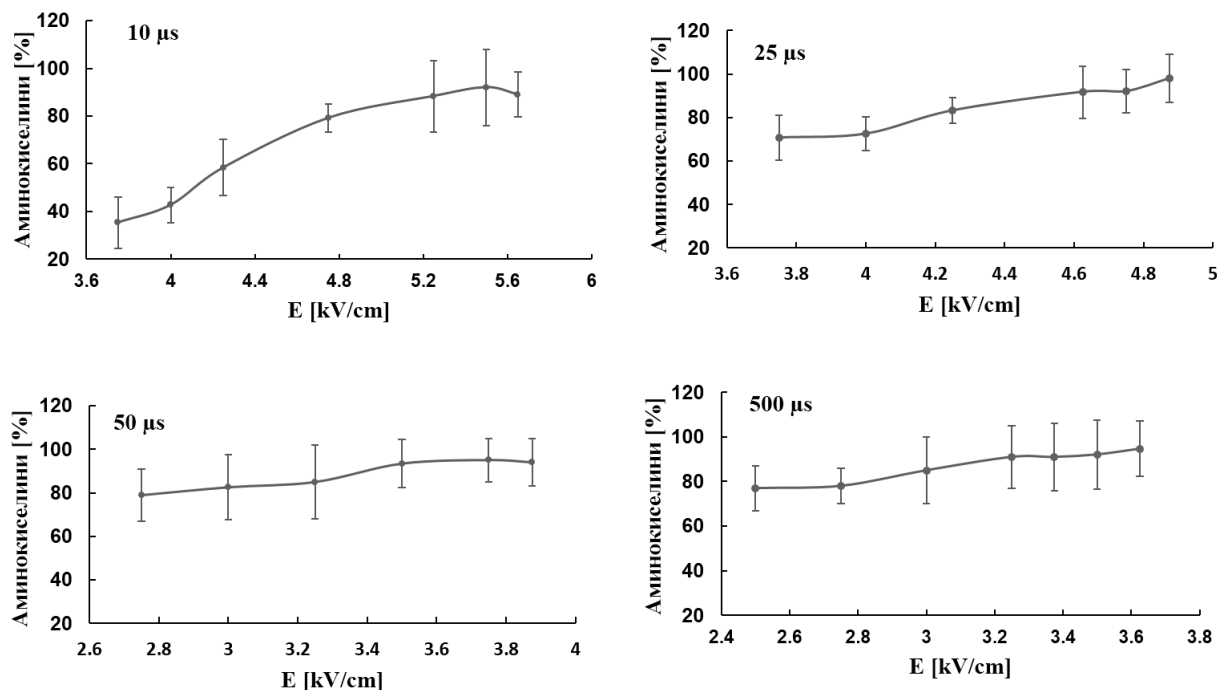
Съгласно някои литературни данни, използването на по-кратки импулси води до по-малък разход на енергия. Ето защо при тези първоначални експерименти ние сравнихме ефикасността на екстракция на аминокиселини при използване на импулси с различна продължителност: 10, 25, 50 и 500 μ s. Клетъчните суспензии бяха промити двукратно с дестилирана вода, концентрацията им бе доведена до 63 mg DW/ml, а специфичната електропроводимост до 200 μ S/cm. Приложихме 89 импулса (80 Hz) с продължителност 10, 25 или 50 μ s, както и 10 импулса (9Hz) с продължителност 500 μ s.

За всяка продължителност на импулса търсихме оптималния интензитет на полето, при който се получава максимален добив на аминокиселини. След третиране клетъчните суспензии бяха инкубирани на стайна температура без допълнително разреждане в продължение на 4 часа. Количеството на освободени аминокиселини в супернатантите на пермеабилзираните клетки бе определено чрез нинхидринов метод, като за 100% приехме количеството аминокиселини, освободени в разтворимата фракция на механично разрушени клетки със същата концентрация.

Както се вижда от данните представени на Фиг. 15, при оптимален интензитет на електричното поле за всяка една от прилаганите продължителности на импулса се достига освобождаване на над 90% от тоталното съдържание на разтворими аминокиселини в клетките. С увеличаване продължителността на импулса (респективно времето на третиране), се понижава интензитетът на полето, при който имаме максимално освобождаване. За сравнение при приложени 89 електрични импулса с продължителност от 50 μ s оптимален интензитет на полето е 3.5 kV/cm, докато при същия брой, но с продължителност 10 μ s той е 5.5 kV/cm, като в първият случай освобождаването на аминокиселини е $93.4 \pm 11\%$, а във втория $92 \pm 16\%$.

Количеството аминокиселини, изчислено за 100 g суха клетъчна маса, получено от механично разрушени клетки, използвани за производство на бира, е 3.16 ± 0.64 g, което е близко до наличните литературни данни за количество свободни аминокиселини от бирени дрожди [Jacob et al., 2019].

Получените данни от проведените експерименти показват, че нискомолекулни съединения могат да се екстрахират ефикасно и сравнително бързо при използване на комбинации от различни електрични параметри. Разходът на енергия при оптимални електрични условия бе 95 ± 8 kJ/l независимо от продължителността на използваните електричните импулси.

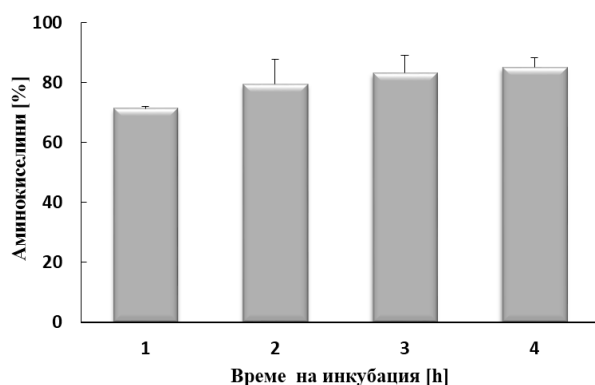


Фиг. 15. Влияние на интензитета на електричното поле върху екстракция на аминокиселини от използвани бирени дрожди. Клетъчна суспензия: 63 mg DW/ml, специфична електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране: 89 импулса, честота 80 Hz, продължителност на импулса 10, 25 и 50 μ s; 10 импулса, 9 Hz, продължителност на импулса 500 μ s, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура за 4 часа.

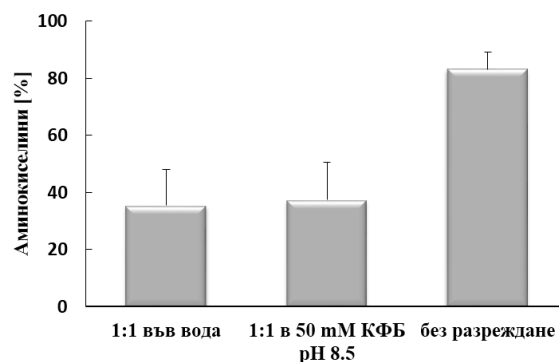
3.1.1.2 Изследване кинетиката на освобождаване. Влияние на клетъчната концентрация и средата при инкубация след третиране

За да определим времето, необходимо за максимална екстракция на аминокиселини, инкубирахме третираната суспензия в продължение на 4 часа във вода, като на всеки час вземахме проба. Както се вижда от Фиг. 16, освобождаването на аминокиселини е сравнително бърз процес и като цяло след втори час количеството освободени аминокиселини се променя незначително.

За да изследваме влиянието на инкубационната среда върху ефикасността на екстракция, след електрично третиране суспензии от бирени дрожди с концентрация 63 mg DW/ml бяха разредени двукратно във вода и в 50 mM КФБ, рН 8.5 (25 mM крайна концентрация), и инкубирани по същия начин, както неразредените третирани суспензии (Фиг.17).



Фиг. 16. Кинетика на освобождаване на аминокиселини от използвани бирени дрожди. Клетъчна концентрация: 63 mg DW/ml; специфична електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 4.25 kV/cm, 89 импулса, продължителност на импулса 25 μ s, честота 80 Hz, 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура.



Фиг. 17. Влияние на средата и клетъчната концентрация. Клетъчна концентрация: 63 mg DW/ml свежо тегло, специфична електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране: както описаните на Фиг. 16. След третиране клетъчните суспензии се разреждат двукратно във вода или КФБ (25 mM крайна концентрация) и се инкубират на стайна температура

Установихме, че по-ниската концентрация на клетъчната суспензия по-време на инкубация не води до по-високо освобождаване на аминокиселини (поне при тези крайни концентрации – 63 mg DW/ml без разреждане и 31.5 mg DW/ml при разреждане 1:1. Инкубацията в буфер (25 mM КФБ, рН 8.5; 31.5 mg DW/ml клетъчна концентрация) също не повлиява освобождаването на аминокиселини (Фиг.17). Получените от нас резултати показват, че за екстракция на аминокиселини не е необходимо използването на буфер, както и че ефикасно освобождаване може да се получи при високи клетъчни концентрации.

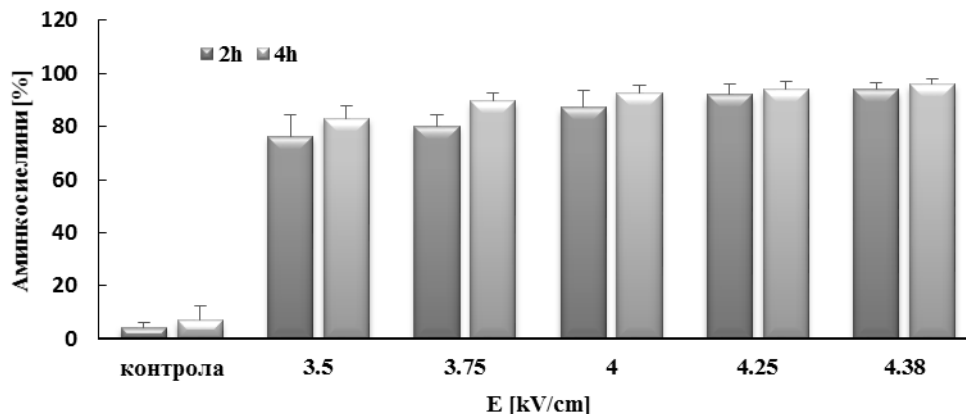
3.1.1.3 Третиране с импулсно електрично поле при високи дебети

При проточно третиране на клетъчна суспензия с импулсно електрично поле количеството обработена клетъчна маса за единица време може да бъде увеличено по няколко начина: 1) увеличаване скоростта на потока (ml/min) през камерата за третиране, което налага увеличаване честотата на електричните импулси; 2) увеличаване на клетъчната концентрация; 3) използване на камера с по-голям обем.

За да проверим дали ефикасността на екстракция се запазва при увеличаване количеството третирана клетъчна маса за единица време, следващите експерименти бяха проведени при използване на камери с обеми 0.5 ml и 1.05 ml. В тези експерименти клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 63 и 75 mg DW/ml, бяха третирани с електрични импулси при дебит между 58 – 150 ml/min. Прилагаме импулси с продължителност 50, 100 и 250 μ s и честота в диапазона 90 - 180 Hz. При тези условия тоталното време на третиране t (t = брой импулси x продължителност на импулса) беше в диапазона 4.6 – 10.5 ms. Изходната специфична проводимост на клетъчните суспензии (проводимост преди електрично третиране) бе 200 или 300 μ S/cm.

Първите експерименти бяха проведени при третиране на дрождеви суспензии при дебит 58 ml/min и използване на камера за електропорация с обем 0,5 ml.

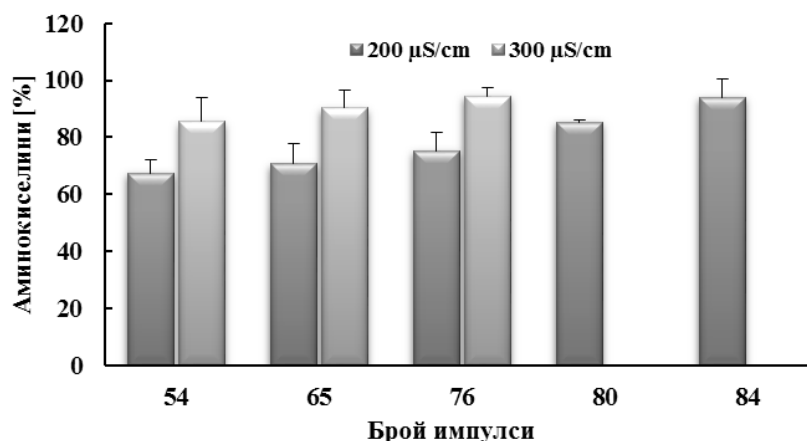
Третирахме суспензия със същата концентрация с импулси с честота 180 Hz (93 импулса) и продължителност от 50 μ s. Инкубирахме клетъчните суспензии 2 и 4 часа на стайна температура без допълнително разреждане след електропорация. Установихме, че оптимален интензитет на полето при тези условия на третиране е в диапазона 4 - 4.25 kV/cm, където добивът на аминокиселини е над 90% (Фиг. 18).



Фиг. 18. Освобождение на аминокиселини от използвани бирени дрожди в зависимост от интензитета на електричното поле. Клетъчна суспензия: 63 mg DW/ml, специфична електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране: 93 импулса, честота 180 Hz, продължителност на импулса 50 μ s, дебит 58.3 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура за 2 или 4 часа.

За опитите ни с по-концентрирани клетъчни суспензии (75 mg DW/ml) при по-висок дебит използвахме и камера за електропорация с по-голям обем – 1.05 ml. По-голямото разстояние между електродите при тази камера не позволява прилагане на импулси с много висок интензитет, поради ограничение в максималното изходно напрежение от използвания генератор. Това наложи прилагането на по-продължителни електрични импулси и опити за третиране на суспензии с по-висока специфична електропроводимост, при което, както бе показано в опитите по освобождение на белтък, се наблюдава намаление в оптималния интензитет на полето.

На Фиг. 19 са представени резултати, показващи освобожданието на аминокиселини след третиране с електрично поле при дебит 94 ml/min при различна специфична електропроводимост на клетъчната суспензия преди електропорация. С цел максимален ефект от електричното поле приложихме импулси с продължителност 100 μ s и интензитет от 2.83 kV/cm, като варирахме честотата, т.е. броя им. Работили сме при честоти от 80, 97, 113, 120 и 125 Hz, при които всяка клетка преминаваща през камерата за третиране получава съответно 54, 65, 76, 80 или 84 електрични импулса.



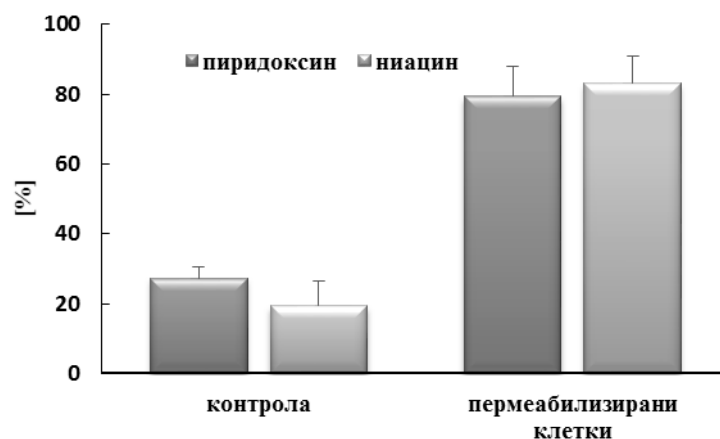
Фиг. 19. Освобождаване на аминокиселини от използвани бирени дрожди в зависимост от броя на приложените импулси. Клетъчна суспензия: 75 mg DW/ml. Условия на третиране: интензитет 2.83 kV/cm, честота 85 – 125 Hz, продължителност на импулса 100 μs, дебит 94 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура за 4 часа.

Максимален добив на аминокиселини при специфична проводимост от 300 μS/cm получаваме при 76 приложени импулса с честота от 113 Hz, докато при по-ниска проводимост за същия ефект са необходими по-голям брой – 84 (125 Hz). Както и при опитите по освобождаване на белтък, наблюдавахме понижаване на оптималния интензитет при повишаване на изходната проводимост дори в този малък диапазон от 200 до 300 μS/cm.

3.1.2 Освобождаване на витамини

Бирените дрожди се характеризират с високо съдържание на витамини от В групата, поради което те се разглеждат като ценен източник на витамини с приложение като хранителна добавка и като компонент на различни козметични продукти.

При тези експерименти приложихме електрични условия и инкубация след третиране, водещи до максимално освобождаване на аминокиселини - 89 импулса с продължителност 25 μs и интензитет на полето 5.5 kV/cm. След третиране клетъчните суспензии бяха инкубирани без допълнително разреждане за 3 часа на стайна температура. След отстраняване на клетките чрез центрофугиране, в супернатантите бяха определени витамините ниацин и пиридоксин чрез микробиологичен метод. За 100% бяха приети стойностите в разтворимата фаза на лизат, получен след механична дезинтеграция на нетретирани клетъчни суспензии със същата концентрация. Стойностите са както следва: пиридоксин - 1.53 ± 0.35 mg/100 g DW дрожди; ниацин - 40.6 ± 7 mg/100 g DW дрожди. Данните за съдържание на тези витамини в лизата са близки до данните публикувани за използвани бирени дрожди [Jacob et al., 2019]. Получените резултати показват, че при условия водещи до необратима пермеабилзация и последваща инкубация на пермеабилзираните клетки, може да се освободят над 80 - 85% от водоразтворими витамини от В групата (Фиг.20).



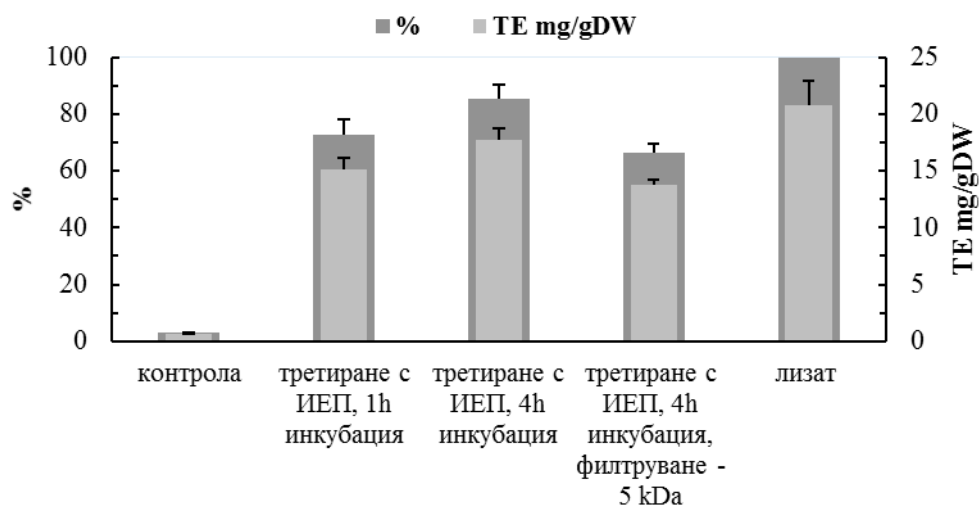
Фиг. 20. Освобождаване на витамини от използвани бирени дрожди. Клетъчна суспензия: 63 mg DW/ml, специфична електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 4.5 kV/cm, 89 импулса, честота 80 Hz, продължителност на импулса 25 μ s, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура за 3 часа.

3.1.3. Освобождаване на тотална антиоксидантна активност и глутатион

Антиоксидантният потенциал на дрожди, освен на ензимите суперпероксид дисмутаза, каталаза или глутатион редуктаза, се дължи в по-голяма степен на различни неензимни компоненти като витамини, глутатион, фенолни съставки или аминокиселини съдържащи съра [Vieira et al., 2016]. Установено е, че за хомогенат на *Saccharomyces cerevisiae*, 85 – 95% от антиоксидантната активност се обуславя от термостабилна, неензимна фракция [Santiago et al., 1993].

Тук ние изследвахме приложимостта на електропорацията за екстракция на тотална антиоксидантна активност от бирени дрожди. Тези изследвания бяха проведени с бирени дрожди *Saccharomyces uvarum* щам 180, култивирани до стационарна фаза. При тези изследвания за 100% приехме антиоксидантна активност в екстракт, получен от механично дезинтегрирани клетки със същата концентрация (55 mg DW/ml). Измерената антиоксидантна активност в лизата беше 20.75 ± 2.13 mg TE/g DW дрождева маса. Проследихме кинетика на освобождаване на антиоксиданти в продължение на 4 часа от третирани при оптимални електрични условия клетки (10 електрични импулса, 5 Hz, с продължителност 0.5 ms, интензитет от 3.38 kV/cm при дебит 27 ml/min). След електрично третиране клетъчните суспензии бяха инкубирани за 1 или 4 часа и клетките отстранени чрез центрофугиране. Тотална антиоксидантна активност бе определена с ABTS и изразена като Trolox equivalent (TE). За да проверим дали антиоксидантната активност се дължи на сравнително нискомолекулни съединения, супернатанти от клетъчни суспензии инкубирани за 4 часа бяха центрофугирани и подложени на ултрафилтрация (kDa Cut off). Антиоксидантната активност беше определена в ефлуата. Установихме, че още на първи час от пермеабилизираните клетки се освобождава $72 \pm 5.2\%$ от тоталната антиоксидантна активност, а на четвърти час се достига до $85.3 \pm 5\%$ (Фиг. 21). Значителна част от активността ($66 \pm 3\%$) в супернатанта от клетъчни суспензии инкубирани за 4 часа се дължи на сравнително нискомолекулни (под 5 kDa) съединения. Антиоксидантната активност в супернатанта на контролни нетретирани клетки, инкубирани след промиване и разреждане във вода за 4 часа, е $3 \pm 0.2\%$.

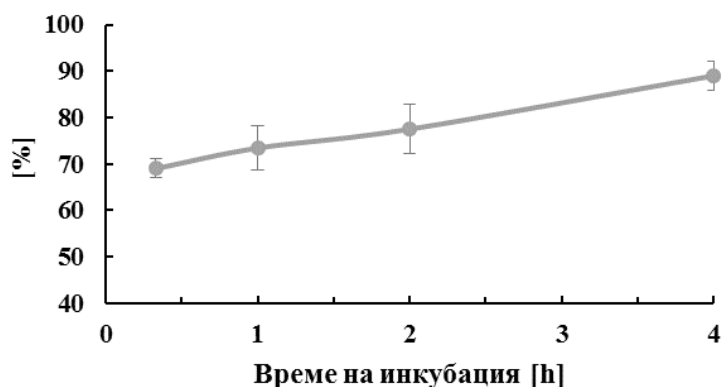
Тотална антиоксидантна активност



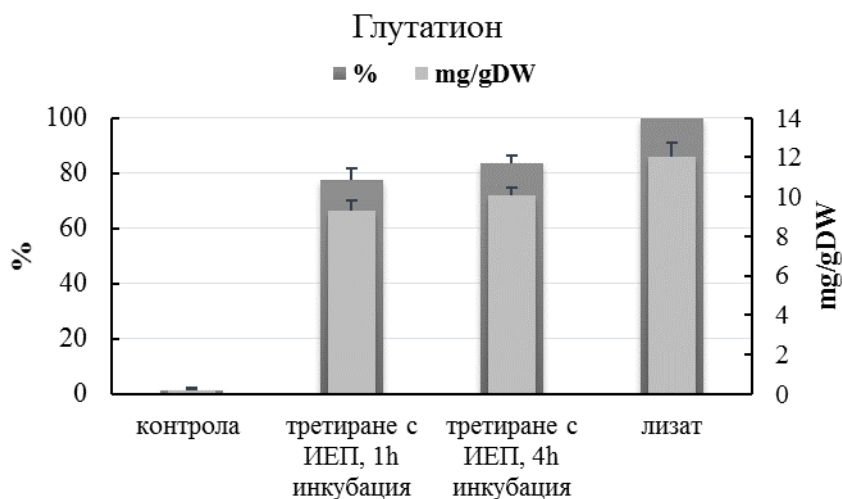
Фиг. 21. Тотална антиоксидантна активност в лизат и супернатанти на електропермеабилizирани и контролни клетки *S. uvarum* щам 180. Клетъчна концентрация: 55 mg DW/ml; специфична електропроводимост: 200 μ S/ml. Условия на третиране: интензитет 3.88 kV/cm, 10 импулса, продължителност на импулса 5 ms, дебит 27 ml/min. След третиране суспензиите се инкубират без разреждане 1 или 4 часа на стайна температура.

Проследихме и кинетика на освобождаване на антиоксидантната активност, като проби от клетъчни суспензии третиранни при същите електрични условия бяха взимани на различни интервали (0.5 – 4 часа) след електрично третиране, центрофугирани, и антиоксидантна активност бе определяна в супернатантата. Както се вижда от Фиг. 22, освобождаването на антиоксиданти е сравнително бърз процес, кинетиката на освобождаване е много сходна с тази, установена за аминокиселини (Фиг.16). На 20-та минута след третиране антиоксидантната активност в супернатантата на пермеабилizирани клетки е $69 \pm 2.1\%$, а след 4 часа инкубация се достига до $89.01 \pm 3.16\%$ от тази в лизата.

При същите условия на електрично третиране и инкубация ние изследвахме и ефикасността на екстракция на глутатион, като за 100% приехме съдържанието на глутатион в разтворимата фракция на механично дезинтегрирани клетки – 11.9 ± 0.8 mg/g DWдрождева маса (Фиг. 23).



Фиг. 22. Кинетика на освобождаване на тотална антиоксидантна активност от дрожди *S. uvarum* 180. Клетъчна концентрация: 63 mg DW/ml; специфична електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране: както описаните на Фиг. 21. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура. 100 % - тоталната антиоксидантна активност в лизат.



Фиг. 23. Електроиндуцирано освобождаване на глутатион от *S. uvarum* щам 180. Клетъчна концентрация: 63 mg DW/ml, изходна електропроводимост 200 μ S/cm. Условия на третиране и пост-импульсна инкубация: както описаните на Фиг. 21.

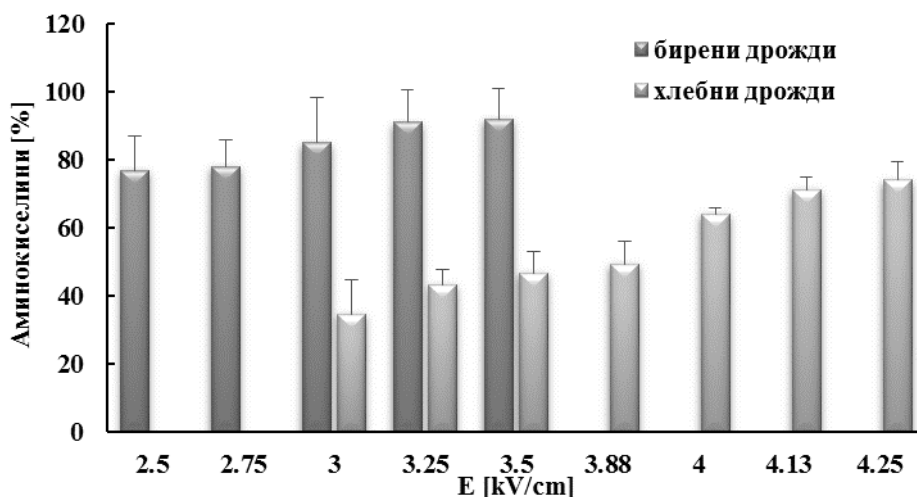
3.2 Електроиндуцирано освобождаване на нискомолекулни съединения от хлебни дрожди

3.2.1. Сравнение на оптималните електричните условия за освобождаването на аминокиселини от хлебни и бирени дрожди

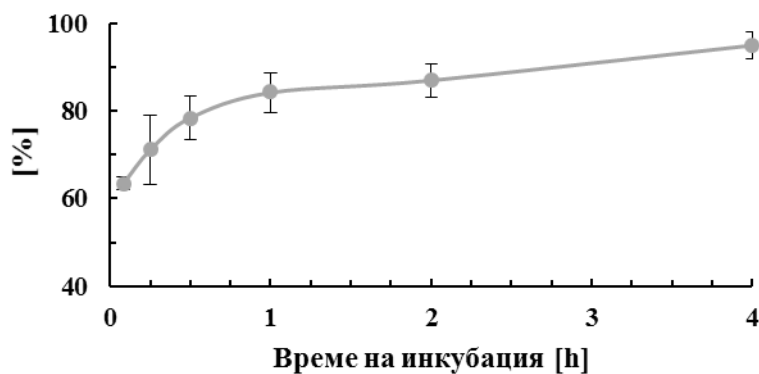
Сравнихме освобождаването на аминокиселини от хлебни и бирени дрожди (Фиг.24). Достигане на максимално освобождаване на аминокиселини от бирени дрожди наблюдавахме при прилагане на 10 импулса с продължителност от 500 μ s (5 ms тотално време на третиране) и интензитет 3.25 kV/cm – $91 \pm 14\%$. При оптималния интензитет на третиране за бирени дрожди и същия брой импулси, от хлебни дрожди бяха освободени едва $43.41 \pm 4.22\%$ от аминокиселините. При най-високия приложен от нас интензитет при това тотално време на третиране (5 ms) освобождаването достига $74.11 \pm 5.26\%$. За

сравнение аминокиселините освободени от контролни нетретирани клетки, инкубирани при същите условия от хлебни дрожди са $4.57 \pm 3.22\%$, а от бирени $7.59 \pm 3.42\%$.

Аминокиселините преминават свободно през клетъчната стена, ето защо причина за наблюдаваните различия в оптималния интензитет на полето за освобождаването им от бирени и хлебни дрожди най-вероятно се дължи на разлики в размера на клетките, от който зависи големината на електроиндуцирания трансмембранен потенциал.



Фиг. 24. Освобождаване на аминокиселини от хлебни и бирени дрожди в зависимост от интензитета на приложеното електрично поле. Условия на третиране: 10 импулса, честота 9 Hz, продължителност на импулса 500 μ s, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура за 4 часа.



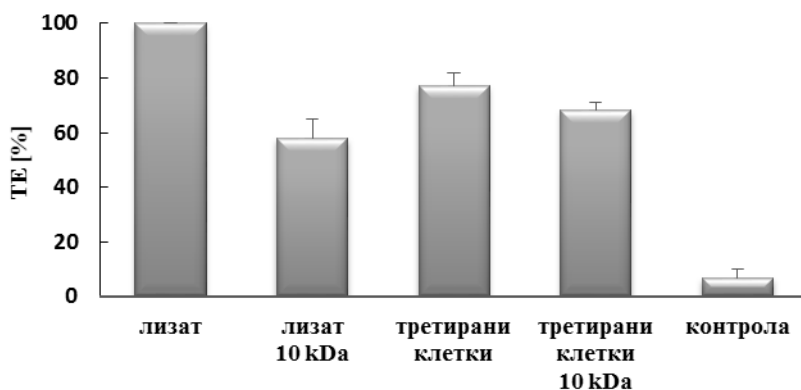
Фиг. 25. Кинетика на освобождаване на аминокиселини от хлебни дрожди. Клетъчна концентрация: 63 mg DW/ml, електропроводимост 150 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет на полето 3.31 kV/cm, 19 импулса, честота 17 Hz, продължителност на импулса 500 μ s, дебит 27 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани без разреждане на стайна температура.

Както и при експериментите с бирени дрожди, проследихме кинетиката на освобождаване на аминокиселини от пермеабелизираните клетки (Фиг. 25). Проби бяха взимани на 5-та, 15-та, 30-та минута, първи, втори и четвърти час след електрично третиране. Кинетиката като цяло е сходна с тази, установена за използвани бирени дрожди. За нас при тези експерименти по-голям интерес представляваше освобождаването до първия час от инкубацията, защото с бирени дрожди нямахме такива данни. Установихме, че за 5 минути се освобождават $62.24 \pm 4.98\%$ от аминокиселините,

а на 4-ти час се достига до освобождаване $95 \pm 3.7\%$ от аминокиселините определени в лизат, получен чрез механична дезинтеграция на клетките.

3.2.2. Освобождаване на тотална антиоксидантна активност и глутатион

Тези експерименти бяха проведени с клетъчни суспензии с концентрация съответстваща на 63 mg DW/ml . Клетките бяха третирани с 19 импулса с продължителност 0.5 ms (честота 17.1 Hz) и интензитети, оптимални за освобождаване на белтък и аминокиселини. Използвана бе камера с обем 0.5 ml . След електропермеабилзацията клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура и бяха отстранени чрез центрофугиране. Определена бе антиоксидантната активност в супернатанти на електропермеабилizирани клетки и контролни клетки, инкубирани за същия интервал от време. За 100% е приета антиоксидантната активност в лизат – $19.65 \pm 1.5 \text{ mg TE/g DW}$ клетъчна маса.



Фиг. 26. Тотална антиоксидантна активност (TE) освободена от пермеабилizирани клетки 2 часа след електрично третиране. Клетъчна суспензия и условия на третиране: както на Фиг. 25.

Както се вижда от Фиг.26, ефикасността на освобождаване на тотална антиоксидантна активност е сходна с наблюдаваната при дрожди *S. uvarum* щам 180. На 2-ри час се освобождава $77 \pm 4.6\%$ от активността в лизата. Активността в ефлуат, получен след ултрафилтрация на супернатанта от пермеабилizирани клетки, е 68.3 ± 3 (10 kDa cut off), което потвърждава, че активността се обуславя от сравнително нискомолекулни съединения.

Определихме и освободения глутатион в супернатанти от пермеабилizирани клетки инкубирани за 2 часа на стайна температура. Установихме, че ефикасността на освобождаване е близка до тази при *S. uvarum* – $78 \pm 6\%$. За 100% приехме съдържанието на глутатион в лизат получен след механична дезинтеграция на клетките – $9.17 \pm 0.7 \text{ mg/g DW}$ клетъчна маса.

3.3 Определяне на пуринови нуклеотиди в супернатанти, получени от електропермеабилзиращи бирени дрожди (*S. uvarum* щам 180) и от пресовани хлебни дрожди

При хората, пурините се метаболизират до пикочна киселина, която служи като антиоксидант и помага за предотвратяване на причинените щети от активни форми на кислорода. Съобщава се обаче, че честият и висок прием на богати на пурини храни повишава серумните нива на пикочна киселина, което води до подагра и може да бъде рисков фактор за сърдечно-съдови, бъбречни заболявания и метаболитен синдром [Kaneko et al., 2014]. Тъй като дрождите, и особено бирените дрожди, се характеризират с много високо съдържание на пуринови бази - 2995.7 mg/100 g бирени дрожди и 1206.2 mg/100 g продукти от бирени дрожди [Kaneko et al., 2014], ние решихме да изследваме съдържанието им във водни екстракти, получени чрез електропориация на бирени дрожди *Saccharomyces uvarum* 180.

При тези експерименти клетъчна суспензия с концентрация 55 mg DW/ml беше третирана с 10 електрични импулса (9 Hz), с продължителност 0.5 ms, интензитет от 3.38 kV/cm при дебит 27 ml/min. Третиранияте клетъчни суспензии бяха инкубирани за 4 часа на стайна температура, след което клетките бяха отстранени чрез центрофугиране и пуринови нуклеотиди бяха определени в супернатантите. Установихме, че количеството освободени пуринови бази е 2.6 ± 0.5 mg/g DW. Тези резултати дават основание да предположим, при тези условия на електрично третиране и пост-импулсна инкубация в голямата си част нуклеиновите киселини се задържат вътре в клетките.

Проведохме и подобни експерименти с пресовани хлебни дрожди. Условията на електрично третиране са както описаните на Фиг. 25. Както и в експериментите с бирени дрожди третиранияте клетъчни суспензии бяха инкубирани за 4 часа на стайна температура. Установихме, че съдържанието на пуринови нуклеотиди изразени на грам сухо клетъчно тегло е сходно с това при бирени дрожди – 2.13 ± 0.4 mg/g DW.

4. Ефект на електричното третиране върху проницаемостта на клетъчната стена при рекомбинантни дрожди. Освобождаване на белтъци чрез комбинирано третиране – електропермеабилзация и последваща инкубация с литичен ензим.

Най-използваният метод за екстракция на интрацелуларни рекомбинанти белтъци е механична дезинтеграция [Kim et al., 2009; Heim et al., 2007; Wetzel et al. 2019]. Въпреки че този метод е приложим за третиране на големи количества клетъчна маса, освобождаването на продукти е неселективно и има значителна клетъчна фрагментация. Това затруднява разделянето на разтворимата фаза от неразтворимите клетъчни компоненти, усложнява последващия процес на пречистване и повишава разходите за производство на рекомбинантни белтъци [Schaefer et al., 2001; Balasundaram et al., 2009].

Клетъчната пермеабилзация представлява една привлекателна перспектива, защото би осигурила по-меки, щадящи условия на екстракция и по-голяма селективност на освобождаване на интрацелуларни компоненти. Мембранна пермеабилзация може да се осъществи при използването на различни химични агенти. Основният проблем при прилагането на този подход за екстракция на интрацелуларни белтъци от дрожди е фактът, че клетъчната стена, която има ниска проницаемост за макромолекули, е силно резистентна към химично третиране, в това число и към агентите, които рутинно се използват за мембранна пермеабилзация – солвенти и детергентни. Известен факт е

също, че култивирането на клетки в присъствие на определени компоненти на хранителната среда, които се използват за дерепресия и индукция на генна експресия като глицерол, галактоза, метанол води не само до значително увеличаване на механичната стабилност, но и предизвиква силно намаление в проникваемостта на клетъчните стени и тяхната чувствителност към литични ензими. Това налага използването на високи концентрации литичен ензим за индуциране на клетъчен лизис или повишаване на клетъчната проникваемост. Тъй като литичните ензими (литиказа, зимолиаза) съдържат както глюканази, така и протеази (активни в алкалната област), използването на високи концентрации ензим, не само би оскъпило процедурата по изолиране, но и би довело до значителен риск от протеолитично разграждане (инактивиране) на рекомбинантните белтъци. Предишни изследвания показаха, че електричното третиране предизвиква не само мембранна пермеабилзация, но и изменения в структурата на клетъчната стена, в резултат на които клетките стават по-чувствителни към литичен ензим – литиказа.

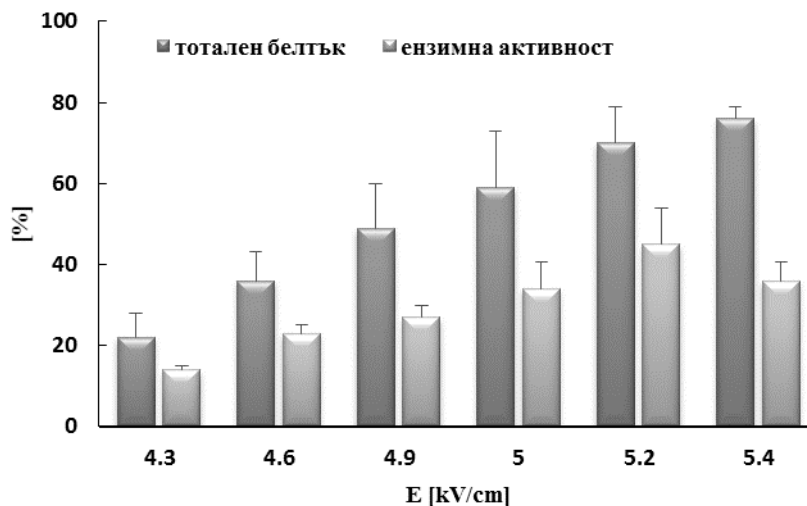
Ето защо ние решихме да изследвахме ефекта на електричното поле върху проникваемостта на клетъчната стена на рекомбинантни дрожди, както и ефикасността на освобождаване на белтъци - нативни и рекомбинантни, чрез комбинация на две третириания: електрично третиране и последваща инкубация с ниски концентрации литиказа. Тези експерименти бяха осъществени със: ***S. cerevisiae* щам W303-1A [pBIVU02-1]**, експресиращ *E coli* LYTAG- β -галактозидаза (520 kDa), и ***Hansenula polymorpha* щам pEE.5-1/RB11#2-1**, експресиращ тежката верига на човешки феритин, формираща интрацелуларни комплекси с молекулна маса 480 kDa.

4.1 *Sacharomyces cerevisiae* щам W303-1A

Клетъчни суспензии от *S. cerevisiae* щам W303-1A с концентрация, съответстваща на 10 mg DW/ml, бяха третириани проточно (2.4 ml/min) с 15 импулса с продължителност 1.25 или 1.5 ms и интензитет в диапазона 3.5 – 6 kV/cm. Използвана беше камера с обем 0.3 ml и разстояние между електродите 0.3 cm.

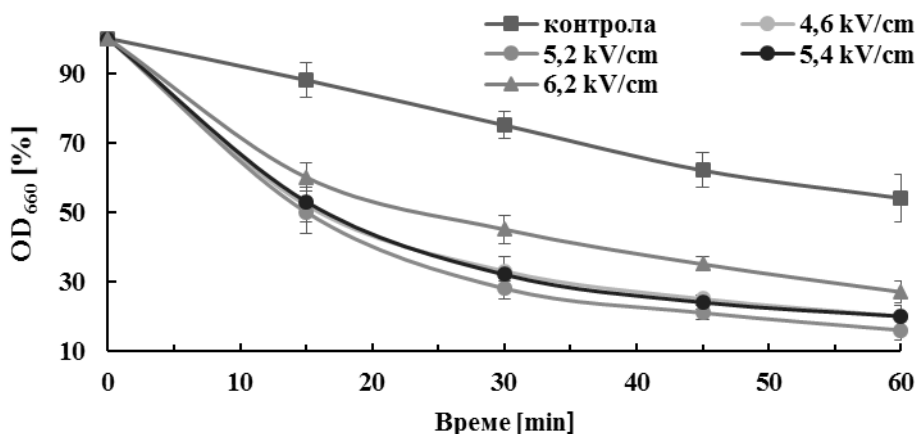
За проследяване на освобождаването на белтък и ензимна активност клетъчната суспензия бе разреждана с 200 mM КФБ, pH 7.5, 560 mM глицерол и инкубирана на стайна температура. Максимално освобождаване на β -галактозидаза, приблизително $45 \pm 7\%$ от тоталната активност, бе получено при импулси с продължителност 1.25 ms и 5.2 kV/cm (Фиг. 27). При прилагане на същия брой импулси с продължителност 1.5 ms оптималния интензитет е 4.5 kV/cm. При този интензитет 97% от клетките бяха с необратимо пермеабиллизирани плазматични мембрани, което бе установено чрез белязане с PI.

Тази ефикасност на освобождаване е два пъти по-ниска от резултатите, получени при предишни изследвания с нативни дрожди [Ganeva et al., 2003]. Предполагано бе, че това би могло да се дължи на ниска пропускливост на клетъчните стени в резултат от култивиране в среда, съдържаща галактоза и/или на значителната молекулна маса на рекомбинантния белтък (520 kDa). За да установим дали електричното поле повлиява проникваемостта на клетъчната стена, проведехме литиказен тест с клетки, третириани при различни интензитети на електричното поле, и с контролни клетки.



Фиг. 27. Влияние на интензитета на електричното поле върху освобождаването на тотален белтък и β -галактозидазна активност от *S. cerevisiae* щам W303-1A [pBIVU02-1]. Клетъчна концентрация: 10 mg DW/ml; специфична електропроводимост: 50 μ S/cm. Условия на третиране: 15 импулса, продължителност на импулса 1.25 ms, честота 2 Hz, дебит 2.4 ml/min. Клетките са инкубирани при разреждане 1:1 в 200 mM КФБ рН 7.5, съдържащ глицерол 560 mM, за 20 часа на стайна температура. 100% съответства на тоталния белтък и ензимната активност в лизата.

Установихме (Фиг.28), че електричното третиране променя значително чувствителността на клетките към литиказа, като максимален ефект беше наблюдаван при 5.2 kV/cm (продължителност на електричните импулси 1.25 ms). При по-високите прилагани интензитети се наблюдава повишаване в резистентността на клетките.

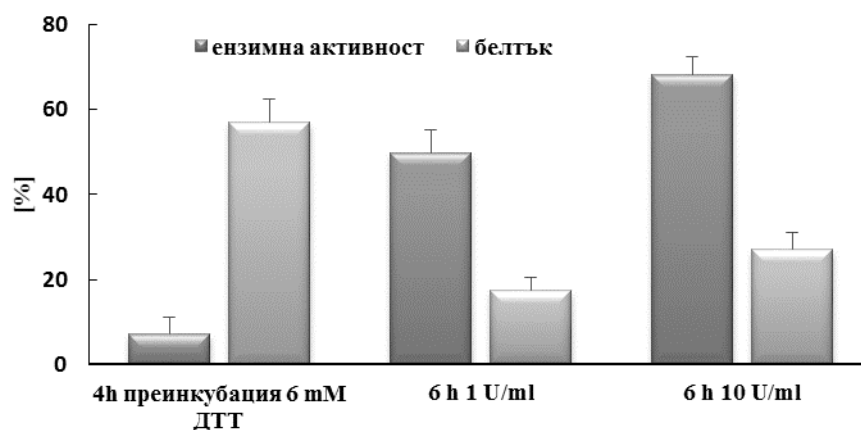


Фиг. 28. Влияние на импулсно електрично поле върху чувствителността към литиказа на клетки *S. cerevisiae* щам W303-1A [pBIVU02-1]. Клетъчна концентрация: 10 mg DW/ml; специфична електропроводимост: 50 μ S/cm. Условия на третиране: 15 импулса, честота 2 Hz, продължителност на импулса 1.25 ms, дебит 2.4 ml/min. Суспензии от третирани и контролни клетки са разредени 1:1 в 200 mM КФБ с рН 7.5, съдържащ 560 mM глицерол и литиказа с крайна концентрация 65 U/ml, инкубирани са на стайна температура. 100 % съответства на OD преди добавяне на ензима.

Тези резултати показаха, че третирането с електрично поле предизвиква увеличаване на проницаемостта на клетъчната стена на рекомбинантния щам, както е наблюдавано при други дрожди [Ganeva et al., 2014], но очевидно недостатъчно, за да се осъществи ефективно освобождаване на рекомбинантната β -галактозидаза.

По-рано бе установено, че инкубация на електропермеабилнизираните клетки с ниска концентрация (1 – 2 U/ml) литиказа повишава скоростта на освобождаване на белтъци без да предизвиква значителен клетъчен лизис [Ganeva et al., 2014]. Ето защо, ние изследвахме освобождаването на рекомбинантен белтък при комбинирано въздействие: електрично третиране и последващо инкубиране на пермеабилнизираните клетки с литичен ензим. Ефектът на литиказа върху освобождаването на β -галактозидаза бе изследван при прилагане на двуетапна инкубация. Целта на първата инкубация бе да се отстрани част от тоталния (нативен) белтък без значителни загуби на рекомбинантния белтък.

Установено бе, че след 4 часа инкубация в буфер, съдържащ 6 mM ДТТ, клетките освобождават приблизително 60% от тоталния протеин и само 7% от β -галактозидазната активност. След отстраняване на освободения белтък, беше добавена литиказа в различни крайни концентрации (1 или 10 U/ml) и клетъчните суспензии бяха инкубирани допълнително в продължение на 6 часа. Както е показано на Фиг. 29, дори при много ниска концентрация (1 U/ml), литиказата води до освобождаване на $49.8 \pm 5.5\%$ от общата активност на β -галактозидаза след инкубация в продължение на 6 часа. При повисоки концентрации на литиказа (10 U/ml) освобождаването достига $68.3 \pm 4.2\%$ от тоталната активност. Освободеният белтък респективно е $17.3 \pm 3.2\%$, и 27 ± 4.1 от тоталния. В първия случай факторът на пречистване на ензима е 2.9, а във втория – 2.5.



Фиг. 29. Влияние на литиказа върху освобождаването на β -галактозидаза и белтък от електропермеабилнизираните клетки *S. cerevisiae* щам W303-1A [pBIVU02-1]. Клетъчна концентрация: 10 mg DW/ml; специфична електропроводимост: 50 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 4.5 kV/cm, 15 импулса, честота 2 Hz, продължителност на импулса 1.5 ms, дебит 2.4 ml/min. Третираните клетъчни суспензии са инкубирани 4 часа с ДТТ (първи етап), промити и разреждени в 100 mM КФБ pH 7.5 / 280 mM глицерол с или без литиказа и инкубирани на стайна температура за 6 часа (втори етап).

Проследихме и ефекта на литиказа върху контролни клетки. 10 U/ml литиказа не води до съществено освобождаване на тотален белтък и β -галактозидаза от тях. От друга страна без ензим освобождаването им от порирани клетки не надхвърля 5 - 10%. Тази пониска ефективност не е изненадваща, като се има предвид, че индукцията с галактоза

води до силно намаляване порьозитета на клетъчната стена [Aguilar-Uscanga and Francois, 2003]. Значително повишаване в ефикасността на освобождаване при комбинирано третиране не се дължи на клетъчен лизис, както бе установено чрез броене на клетките на камера на Тома. Получените данни ни дават сериозно основание да предположим наличие на синергичен ефект между електричното третиране и действието на литичен ензим върху проницаемостта на клетъчната стена, което най-вероятно е причина за силното повишаване на ефикасността на освобождаване на белтък от пермеабилнизиранни клетки.

4. 2 Електроиндуцирано освобождаване на белтъци от *Hansenula polymorpha* (pEE.5-1/RB11#2-1)

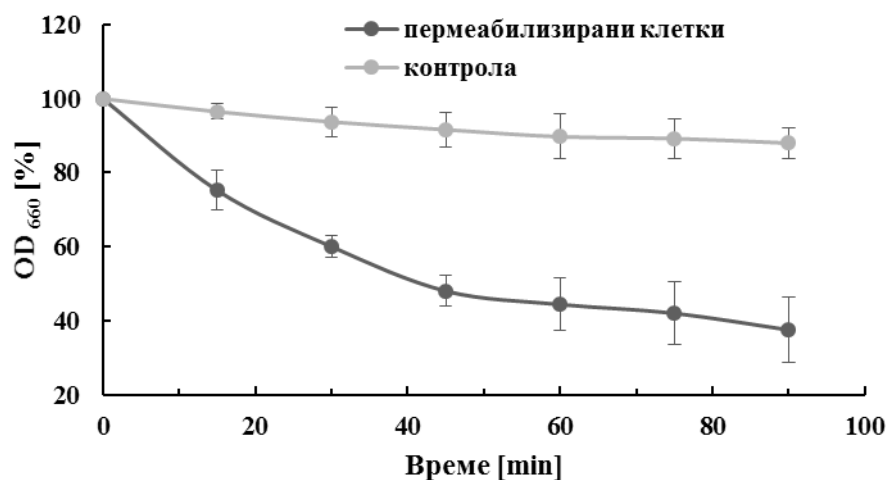
През последните години метилотрофните дрожди *Hansenula polymorpha* станаха привлекателен гостоприемник за индустриално производство на рекомбинантни белтъци. Те осигуряват висока експресионна скорост на хетероложния ген, която е свързана с използването на силните промотори на *MOX* и *FMD* гените, чиято индукция се регулира от източника на въглерод в хранителната среда, голям брой копия на експресионните касети и митотична стабилност на плазмидите.

Както бе показано в предната секция, комбинираното действие – третиране с импулсно електрично поле и последваща инкубация на клетките с ниска концентрация на литичен ензим, дава възможност за ефикасна екстракция на големи рекомбинантни белтъци от дрождите *S. cerevisiae*.

При това изследване целта беше да се провери доколко електричното поле има подобен ефект върху клетъчните стени на дрождите *H. polymorpha* и би ли могло подобно комбинирано въздействие да доведе до ефикасно освобождаване на интрацелуларни белтъци от тези дрожди без да се предизвиква клетъчен лизис. Експериментите бяха проведени с *H. polymorpha* щам (pEE.5-1/RB11#2-1), експресиращ тежката верига на човешки феритин, предоставен ни от немската фирма ARTES Biotechnology GmbH.

За да индуцираме необратима пермеабилзация тествахме различни комбинации от електрични параметри. Клетъчни суспензии с концентрация, съответстваща на 12 g DW/ml, бяха третирани проточно в камера с обем 0.3 ml при дебит 6 ml/min. Установихме, че необратима пермеабилзация при над 90% от клетките се постига при прилагане на 30 импулса с продължителност 0.75 - 0.8 ms и интензитет на полето в диапазона 6.8 - 7.5 kV/cm. Клетъчни суспензии, третирани при тези електрични условия, бяха инкубирани в КФБ рН 7.5 (крайна концентрация 125 mM КФБ) за 4 - 6 часа в присъствие на ДТТ (10 mM). Установихме, че независимо от необратимото увреждане на плазмената мембрана, тази инкубация води до освобождаване на едва 1 - 5% от тоталния белтък. Тази ниска ефикасност на белтъчно освобождаване най-вероятно е свързана със силно понижаване на проницаемостта на клетъчната стена в резултат от култивиране на среда с глицерол, но най-вече от стъпката на индукция, при която клетките се култивират за 24 часа в присъствие на 1% метанол. Известен факт е, че дрождите *H. polymorpha*, култивирани на метанол стават силно резистентни, както към механична дезинтеграция, така и към ензимно лизиране в сравнение с други видове дрожди. Това е свързано с промени в структурата на клетъчната стена по време на растеж върху среда, съдържаща глицерол / метанол [Giuseppin et al., 1987; Canales et al., 1998]. Както бе показано при предишни изследвания, електричното третиране прави клетките от различни видове дрожди почувствителни към литиказа [Ganeva et al., 2014; Ganeva et al., 2015].

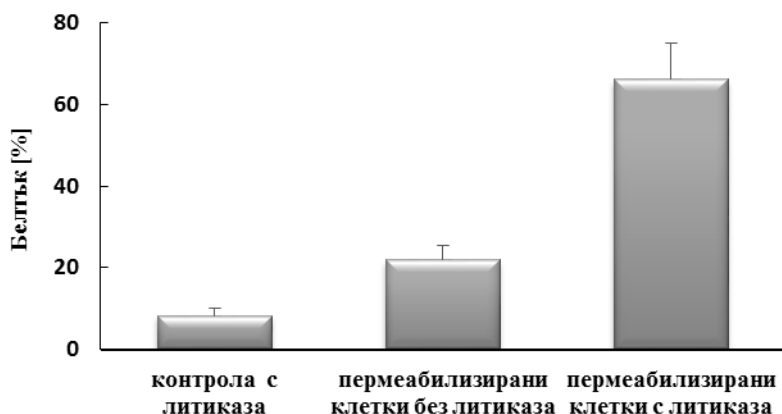
За да проверим за подобен ефект при *H. polymorpha*, сравнихме чувствителността на електропермеабилезирани и контролни клетки към литиказа. Тези експерименти бяха проведени с клетки, култивирани за 48 часа на 30 °C в среда с глицерол, последвано от 24 часа индукция с метанол на 30 °C.



Фиг. 30. Литиказен тест с пермеабилезирани и контролни клетки *H. polymorpha*. Клетъчна концентрация: 17.5 mg DW/ml; специфична електропроводимост: 50 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 7 kV/cm, 30 импулса, честота 10 Hz, продължителност на импулса 0.8 ms, дебит 6 ml/min. Контролни и пермеабилезирани клетки са разреждени двукратно в 125 mM КФБ, рН 7.5, добавена е литиказа до крайна концентрация 40 U/ml и клетките са инкубирани на 37 °C. 100% съответства на OD преди добавяне на ензима.

Данните представени на Фиг. 30 показват, че и при дрождите *H. polymorpha* третирането с импулсно електрично поле води до повишаване на чувствителността към литичен ензим. След 90 min инкубация на нетретираните контролни клетки, OD₆₆₀ достига $88 \pm 4\%$ от изходното, докато при електропермеабилезираните клетки е значително по-ниско – $38 \pm 9\%$. Тази повишена чувствителност към литичен ензим след електрично третиране би могла да се отдаде на електроиндуцирани изменения най-вероятно в манопротеиновия слой на клетъчната стена, което води до улеснен достъп на глюканазата до вътрешния глюканов слой.

На следващия етап ние изследвахме освобождаването на тотален белтък от контролни и третирани клетки в присъствие на литичен ензим. При тези експерименти клетъчната концентрация на третиранията суспензия бе 17.5 g DW/ml. След електрично третиране клетките се центрофугират, супернатантата се маха и клетките се разреждат в 125 mM КФБ, рН 7.5 до крайна концентрация 8.75 g DW/ml. Към контролни и пермеабилезирани клетки се добавя литиказа в крайна концентрация 2.5 U/ml и ДТТ до крайна концентрация 10 mM. С цел максимална активност на ензима, суспензиите инкубирахме при 37 °C (Фиг. 31).



Фиг. 31. Влияние на литиказата върху освобождаването на белтък от *H. polymorpha*. Клетъчна концентрация: 17.5 mg DW/ml; специфична електропроводимост: 50 μ S/cm. Условия на третиране: интензитет 7 kV/cm, 30 импулса, честота 10 Hz, продължителност на импулса 0.8 ms, дебит 6 ml/min. След третиране клетъчните суспензии са инкубирани при разреждане 1:1 в 250 mM КФБ с pH 7.5, съдържащ 10 mM ДТТ с или без литиказа (2.5 U/ml) на 37 °C за 4h.

Добивът на белтък от клетки, третирани с електрично поле и инкубирани в присъствието само на ДТТ, е $22 \pm 3.6\%$, докато прибавянето на литиказа към инкубационната среда го повишава три пъти – достига $66 \pm 9\%$. Освобождаването на белтък от контролни клетки, третирани само с литиказа при същите условия като пермеабилезираните, е $8.3 \pm 1.7\%$ (Фиг.31). Представените данни показват, че електричното третиране и въздействието с ниски концентрации литичен ензим имат синергичен ефект – факт установен с рекомбинантния щам *S. cerevisie*. Повишеното освобождаване на белтък не е резултат от клетъчен лизис, което бе проверено чрез преброяване на клетките на камера на Тома.

IV. Изводи

1. Проточно третиране с импулсно електрично поле и полседваща инкубация на пермеабилезираните клетки в буфер, води до ефикасна екстракция на разтворим интрацелуларен белтък от бирени и хлебни дрожди, както и от дрожди от род *Kluyveromyces*. Най-добри резултати са постигнати с *K. lactis* щам 199, като за 4 часа инкубация се освобождават над 90 % от разтворимия белтък.
2. Количеството освободен белтък зависи силно от концентрацията и pH на използвания буфер. За всички изследвани системи оптималното pH на буфера е в диапазона pH 8 - 9.
3. Инкубация на пермеабилезираните клетки с ДТТ в крайна концентрация 1 - 5 mM повлиява скоростта и ефикасността на освобождаване тотален на белтък.
4. Ефикасно електроиндуцирано освобождаване на белтък може да се осъществи при третиране на суспензии с концентрация поне до 85 g DW/ml. Повишаването на клетъчната концентрация води до понижаване на енергията, която се изразходва за индуциране на необратима електропермеабилезация.
5. Повишаването на изходната проводимост на клетъчните суспензии, води до намаление оптималния интензитет на електричното поле.

6. Проточно третиране с импулсно електрично поле и последваща инкубация в КФБ буфер с рН 6 води до ефикасна и селективна екстракция на Cu/Zn супероксид дисмутаза (СОД) от дрожди *K. marxianus* 1984. След 4 часа инкубация се освобождава 72% от тоталната активност на СОД. Специфичната активност на ензима е 7 пъти по-висока от тази в лизат получен чрез механична дезинтеграция.
7. Инкубация на необратимо пермеабилзираните клетки (бирени и хлебни дрожди) във вода води до бързо (1 – 4 h) и ефикасно освобождаване на нискомолекулни интрацелуларни компоненти – 95% от свободните аминокиселини, 85% от тоталната антиоксидантна активност и глутатион, 80% от тоталното съдържание на ниацин и пиридоксин.
8. Проточно третиране със серия от електрични импулси с продължителност 1.25 -1.5 ms предизвиква повишена чувствителност на рекомбинанти дрожди *S. cerevisiae* към литиказа. Установен е синергичен ефект на импулсното електрично поле и литиказата върху освобождаването на рекомбинанта β -галактозидаза (530 kDa). При прилагане на комбинирано третиране - електропермеабилзация и последваща инкубация на клетките с ниски концентрации (1 - 10 U/ml) литичен ензим, се освобождава 70% от рекомбинантния ензим с фактор на пречистване 2.6.
9. Импулсното електрично поле (30 импулса с продължителност 0.8 ms) води до повишена чувствителност на рекомбинантни дрожди *H. polymorpha* към литичен ензим. Електрично третиране и последваща инкубация в буфер, съдържащ литиказа (1 - 10 U/ml), имат синергичен ефект върху освобождаването на белтък от пермеабилзираните клетки. Освобождаването на белтък от контролни нетретирани клетки инкубирани при същите условия е незначително.
10. Приложеното комбинирано третиране при *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* не води до клетъчен лизис.

V. Приноси

Научни:

1. Установени са условия (електрично третиране и последваща инкубация), позволяващи ефикасна екстракция на разтворим белтък от бирени и хлебни дрожди и дрожди от род *Kluyveromyces* чрез третиране с импулсно електрично поле при използване на проточна система. Изследвана е връзката между клетъчна концентрация и вложена енергия (J/kg DW) необходима за индуциране на необратима пермеабилзация.
2. За първи път е изследвана екстракцията на аминокиселини, витамини и антиоксиданти от бирени и хлебни дрожди чрез пермеабилзация на клетките при използване на импулсно електрично поле.
3. Установена е възможността за селективна екстракция на Cu/Zn супероксид дисмутаза от дрожди *K. marxianus* 1984 чрез третиране с импулсно електрично поле.
4. Показан е синергичен ефект на импулсно електрично поле и последващо третиране с литичен ензим върху освобождаването на белтъци от рекомбинантни дрожди.

Научно-приложни:

1. Разработен е метод за селективна екстракция на нискомолекулни биологично активни вещества от дрожди, базиран на клетъчна пермеабилзация чрез проточно третиране с импулсно електрично поле.
2. Разработен е протокол за селективно осовобождаване на големи рекомбинанти белтъци от *S. Cerevisiae*, основаващ се на електроиндуцирана пермеабилзация на плазмената мембрана и повишаване проницаемостта на клетъчната стена при комбинирано въздействие с електрично поле и литичен ензим.

VI. Участия в конференции

1. Electroextraction of proteins and other biologically active compounds from brewer's and baker's yeast, September 4-6 Toulouse, France 2019- 3rd World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Field in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies – постер, B. Galutzov, V. Ganeva, **B. Angelova**, V. Goltsev, M. Zhiponova
2. Electroextraction of proteins and other biologically active compounds from baker's yeast. International Nonthermal Processing Workshop. 25-27 September, 2018 Sorrento, Италия - презентация, V. Ganeva, **B. Angelova**, V. Goltsev, M. Zhiponova, B. Galutzov
3. Release of recombinant proteins from yeast by pulsed electric field treatment, 17th European Congress of Biotechnology KRAKOW 2016- постер, V. Ganeva, B. Galutzov, **B. Angelova**, M. Arévalo-Rodríguez, M. Suckow
4. Electroinduced release of amino acids and vitamins from spent brewer's yeast, Младежка научна конференция "Климентови дни", 19 – 20 ноември 2015, София – постер, **B. Angelova**, V. Ganeva
5. Liberation of water soluble proteins from yeast by pulsed electric field treatment, International conference Bioscience – Development and new opportunities, 20-22 November 2013, Sofia - постер
V. Ganeva, B. Galutzov, **B. Angelova**, D. Stefanova, I. Velasco, M. Arevalo-Ramirez
6. Electroinduced release of proteins and vitamin B6 from brewer's yeast, International conference Bioscience – Development and new opportunities, 20-22 November 2013, Sofia – постер, **B. Angelova**, B. Galutzov, V. Ganeva

VII. Публикации по дисертацията

1. Valentina Ganeva, Bojidar Galutzov, **Boyana Angelova**, Manfred Suckow (2018) Electroinduced Extraction of Human Ferritin Heavy Chain Expressed in *Hansenula polymorpha*, Applied Biochemistry Biotechnology 184, 1286–1307; IF 2.140; Q2; 3 цитата
2. Valentina Ganeva, Debora Stefanova, **Boyana Angelova**, Bojidar Galutzov, Isabel Velasco, Miguel Arévalo-Rodríguez (2015) Electroinduced release of recombinant β -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biotechnology, 211, 12–19; IF 3.163; Q1; 4 цитата

Използвани съкращения

НБПМКК – Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури
GRAS - generally recognized as safe
ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulphonic acid diammonium salt
DTT – dithiothreitol - дитиотреитол
PI - propidium iodide – пропидиев йодид
СОД - супероксид дисмутаза
rpm - revolutions per minute – обороти в минута
DW – dry weight – сухо тегло

КФБ - калиево-фосфатен буфер
TEAC - trolox equivalent antioxidant capacity – тролокс-еквивалентен антиоксидантен капацитет
TE - trolox equivalent - тролокс-еквивалент
WST – 1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
ИЕП – импулсно електрично поле
OD – optical density – оптична плътност
SD – standard deviation – стандартно отклонение

Използвана литература

1. Aguilar-Uscanga B, Francoi JM (2003), *Letters in Applied Microbiology*, 37, 268–274
2. Balasundaram B, Harrison S, Bracewell DG (2009), *Trends Biotechnol.*, 27, 477–485
3. Bradford M (1976), *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254
4. Bretta Ch L, Donowitz M, Rao R (2006), *FEBS Letters*, 580, 717–719
5. Canales M, Buxado JA, Heynngnezz L, Enriquez A (1998), *Enzyme and Microbial Technology*, 23(1–2), 58–83
6. Corvo ML, Jorge JC, van't HR, Cruz ME, Crommelin DJ, Storm G (2002), *Biochem. Biophys. Acta*, 1564, 227 – 236
7. De Nobel JG, Dijkers C, Hooijberg E, Klis FM (1989), *J Gen. Microbiol*, 135, 2-77-2084
8. Emerit J, Samuel D, Pavio N (2006), *Biomed Oharmacother*, 60, 104
9. Ganeva V, Galutzov B (1999), *FEMS Microbiol. Letters*, 174: 379-284
10. Ganeva V, Galutzov B, Teissie J (2003), *Anal. Biochem.* 315(1), 77-84
11. Ganeva V, Galutzov B, Teissie J (2004), *Biotechnology Letters*, 26: 933–937
12. Ganeva V, Galutzov B, Teissie J (2014). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1540–1552
13. Ganeva V, Stefanova D, Angelova B, Galutzov B, Velasco I, Arévalo-Rodríguez M (2015), 21, 12-19
14. Gaskova D, Sigler K, Janderova B, Plasek J (1996), *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 39, 195-202
15. Giuseppin, M. L. F., van Eijk, H. M. J., Hellendoorn, M., & van Almerk, J. W. (1987), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 31–36
16. Goettel M, Eing Ch, Gusbeth Ch, Straessner R, Frey W (2013), *Algal Research* 2, 401-408
17. Grba S, Stehlik-Thomas V, Stanzer D, Vahcic N, Skrlin A (2002), *Chem. Biochem Eng Q* 16(1), 13-16
18. Heim A, Kaminowska U, Solecki M (2007), *J. Food Eng.*, 83, 121–128
19. Jacob FF, Striegel L, Rychlik M, Hutzler M, Methner F-J (2019), *European Food Research and Technology* 245, 1169-1182
20. Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, Inazawa K, Yamaoka N (2014), *Biol. Pharm. Bull.*, 37(5), 709–721
21. Kim E-J, Pack Y-K, Lim H-K, Park Y-Ch (2009), *J. Biotechnol.*, 141, 155–159
22. Loring HS, Fairley JL, Seagran HL (1952), *J Biol Chem.*, 197(2), 823-830
23. Mahmood KT (2015), *JZS*, 17-24 (Part-A)
24. Moore S, Stein WH (1957), *J. Biol. Chem.*, 211, 907–913
25. Neumann E, Sprafke A, Boldt E, Wolf H (1992), *In Guide to electroporation and electrofusion*, 77-90
26. Pavlin M, Kanduser M, Rebersek M, Puchinar G, Hart FX, Magjarevic R, Miklavcic D (2005), *Biophys. J.*, 88, 4378-4390
27. Pavlin M, Leben V, Miklavcic D (2007), *BBA* 1770, 12-23
28. Pringle J R, Mor J-R (1975), *Methods in Cell Biology*, 11, 131–168
29. Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006), *Nat Protoc.*, 1(6), 3159-3165
30. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999), *Free Radic Biol Med.*, 26(9-10), 1231-1237
31. Rols MP, Teissie J (1990), *Biophysical Journal*, 58, 1089–1098
32. Salazar O, Asenjo JA (2007), 29(7), 985-994
33. Santiago LA, Mori A (1993), *Arch Biochem Biophys.*, 306(1), 16-21

34. Saulis G (2010), *Food Eng Rev*, 2, 52–73
35. Schaefer S, Piontek M, Ahn SJ, Papendieck A, Janowicz ZA, Timmermans I, Gellissen G (2001) Weinheim: Wiley-VCH, 175–210
36. Schwartz R, Ting CS, King J (2001), *Genome Res.*, 11(5), 703-709
37. Sergeev VA, Solosenko VM, Bezrukov MG, Saropovskaja MB (1984) *Acta Biotechnol.*, 4(2), 105-115
38. Simões T, Teixeira MC, Fernandes AR, Sá-Correia I (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4019–4028
39. van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MM, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH (2006), *FEMS Yeast Res.*, 6(3), 381-392
40. Vieira EF, Carvalho J, Pinto E, Cunha S, Almeida AA, Ferreira IMPLVO (2016), *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 44-51
41. Wetzel D, Barbian A, Jenzelewski V, Schembecker G, Merz J, Piontek M (2019), *J. Biotechnol.* 306, 203-212
42. Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nisjikawa M, Takakura Y, Hashida M (2001), *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 298, 894-899
43. Zakhem HEI, Lanoisellé JL, Lebovka NI, Nonus M, Vorobiev E (2006), *Colloids Surf B Biointerfaces*, 47(2), 189-197
44. Zlotnik H, Fernandez M P, Bowers B, Cabib E (1984), *Journal of Bacteriology*, 159, 1018–1026