

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO
BOTANIKOS INSTITUTAS

Brigita Čapukoitienė

Saccharomyces cerevisiae K2 preprotoksino geno raiška *Nicotiana tabacum* L. augaluose bei naujų, toksinus produkuojančių mikroorganizmų paieška ir jų panaudojimo analizė

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01B)
Mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija (B230)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2005 – 2009 metais Botanikos institute

Mokslinis vadovas:

Dr. Vytautas Boleslovas Melvydas (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, biologija 01B, mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija B230).

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1. Mikroorganizmų gaminami toksinai ir jų bendra charakteristika	11
1.1.1. Antibiotikai	11
1.1.2. Bakteriocinai ir jų producentai	13
1.1.3. Mikotoksinai	15
1.2. Priešgrybeliniai toksiniai baltymai.....	19
1.3. Kileriniai toksinai.....	22
1.3.1. Mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> genomai.....	22
1.3.2. Kilerinis fenotipas	22
1.3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kilerinė sistema	24
1.3.4. Kilerinis toksinas K1	25
1.3.5. Kilerinis toksinas K2	27
1.3.6. Kilerinis toksinas K28	28
1.3.7. Mielių ląstelių imuniškumas kileriniams toksinams	31
1.4. Toksinus produkuojančių organizmų panaudojimas	33
1.4.1. Maisto pramonėje	34
1.4.2. Biotechnologijoje	36
1.4.3. Etilo alkoholio gamyboje	37
1.4.4. Medicinoje	38
1.4.5. Genų inžinerijoje	40
1.5. Biocidines medžiagas koduojančių genų perkėlimas į augalus	41
2. EKSPERIMENTO METODIKA.....	44
2.1. Mielių <i>S. cerevisiae</i> ir bakteriniai kamienai, plazmidiniai vektoriai.....	44
2.2. Terpės	44
2.3. Medžiagos.....	46
2.4. Metodai.....	47
2.4.1. Mikroorganizmų, augančių spontaniniuose rauguose, klonavimas.....	47
2.4.2. Kileriškumo nustatymas.....	47
2.4.3. Mielių imuniškumo kileriniam toksinui įvertinimas	48
2.4.4. Kilerinio toksino išskyrimas	48
2.4.5. Kilerinio toksino aktyvumo nustatymas	48
2.4.6. Plazmidžių konstravimas ir analizė	49
2.4.6.1. DNR karpymas restrikcijos nukleazėmis	49
2.4.6.2. DNR viengrandžių galų užbukinimas	49
2.4.6.3. 5' – galinių fosfatų pašalinimas	49
2.4.6.4. DNR ligavimas	50
2.4.7. Bakterijų <i>E. coli</i> transformacija.....	50
2.4.8. Mielių <i>S. cerevisiae</i> transformacija	51
2.4.9. Plazmidinės DNR išskyrimas iš bakterijų <i>E. coli</i>	52
2.4.10. Plazmidinės DNR išskyrimas iš mielių <i>S. cerevisiae</i>	53
2.4.11. Aukštos molekulinės masės DNR ekstrakcija iš augalo ląstelių.....	53
2.4.12. DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	54
2.4.13. Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	54
2.4.14. Gyvų ląstelių skaičiaus įvertinimas	55
2.4.15. Augimo kreivių sudarymas	56

2.4.16. Ląstelių tankio nustatymas spektrofotometriškai	57
2.4.17. Alkoholių, aukštesniųjų alkoholių, esterių, aldehidų koncentracijų įvertinimas fermentuojant obuolių sultis mielių <i>S. cerevisiae</i> kamienais	57
2.4.18. Mielių kamienų identifikacija	57
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	58
3.1. Mikroorganizmų, augančių spontaniniuose rauguose, pradinė analizė.....	58
3.2. Kilerinių mielių gamybinis perspektyvumas vyno bei etilo alkoholio pramonėje	68
3.2.1. Naujų kamienų kileriškumo ir imuniškumo rezultatai	68
3.2.2. Gliukozės įsisavinimo ir rauginimo efektyvumo įvertinimas	70
3.2.3. Tolerancija etilo alkoholiui	71
3.2.4. Augimo kreivių sudarymas ir augimo parametrų įvertinimas.....	73
3.3. K2 kilerinio geno ekspresijos įvertinimas augaluose.....	78
3.3.1. Plazmidžių pCGT/Kill konstravimas.....	78
3.3.2. Plazmidžių pART/Kill K2 bei pGA/Kill K2 konstravimas.	81
3.3.3. Kilerinio preprotoksino geno raiškos įvertinimas transgeniniuose augaluose.....	86
3.3.4. Plazmidžių pAD/CGT-KillK2 konstravimas ir analizė	91
3.3.5. CaMV promotoriaus stabilumo įvertinimas.....	94
IŠVADOS.....	96
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	98
Mokslinių darbų sąrašas.....	112
Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės.....	113
Priedai	114
Padėkos	118

SANTRUMPOS

a. r. – aminorūgštis

ARS – replikacijos iniciacijos lokusas

bp – bazių pora

CaMV 35S – žiedinio kopūsto mozaikinio viruso 35S rRNR promotorius

CTAB – cetiltrimetilamonio bromidas

CVPs – chimerinės virusinės dalelės

Da – daltonas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DON – dioksinivalenolis

dgDNR – dvigrandė deoksiribonukleorūgštis

dgRNR – dvigrandė ribonukleorūgštis

DTAB – dodeciltrimetildiamonio bromidas

EtBr – etidžio bromidas

K1, K2, K28 – kileriniai mielių fenotipai

kDa – kilodaltonas (1000 Da)

[kil-K1], *[kil-K2]*, *[kil-K28]* – citoplazminiai kileriniai determinantai

[kil-K0] – kilerinio viruso nebuvimas citoplazmoje

M1, M2, M28 – atitinkamai K1, K2, K28 tipų kileriniai virusai

MAT – poravimosi tipo lokusas (MAT α ir MAT β aleliai nulemia **a** ir **α** poravimosi tipus, atitinkamai)

ml – mililitras (1000 mikrolitru)

μ l – mikrolitras

μ m – mikrometras

PRB – pieno rūgšties bakterijos

RNR – ribonukleorūgštis

SDS – natrio dodecilsulfatas

VPD – į virusus panašios dalelės

wt – laukinis tipas

Aminorūgštys:

ade – adeninas

arg – argininas

asp – asparaginas

gly – glicinas

glu – glutaminas

his – histidinas

leu – leucinas

lys – lisinas

met – metioninas

phe – fenilalaninas

pro – prolinas

thr – treoninas

ura – uracilas

ĮVADAS

Kovai prieš kai kurias grybelines augalų, gyvūnų bei žmonių ligas ieškoma naujų, biologiškai aktyvių medžiagų, žudančių tam tikrus patogenus. Tokių medžiagų producentai galėtų būti bakterijos ir mielės, kurios žudo kitus mikroorganizmus. Šias medžiagas koduojančių genų perkėlimas į augalus leistų apsaugoti, pavyzdžiui, pasėlius nuo įvairių grybelinių ligų [Magliani ir kt., 1997, Donini ir kt., 2005].

Ne mažiau svarbūs ir kitų mikroorganizmų (ne tik mielių) produkuojami baltymai, galintys funkcionuoti kaip fitopatogenų priešnuodžiai [Meškauskienė, Melvydas, 2007]. Genetiniais bei ląstelių inžinerijos metodais perkeliant atsparumą lemiančius genus iš mikroorganizmų į augalus, kuriami transgeniniai augalai, atsparūs grybiniams ir virusiniams patogenams. Kilerinių mielių genų perkėlimas į augalus padeda kovoti prieš kai kurias grybelines augalų ligas, tačiau šiuo atveju labai svarbu įvertinti šeimininko – augalo ir patogeno tarpusavio santykius bei ryšį su supančia aplinka ir įtaka jai [Donini ir kt., 2005].

Naujos kartos plataus veikimo medžiagos, pasižyminčios bakteriocidinėmis ir fungicidinėmis savybėmis, gali būti aptinkamos tiek prokariotiniuose, tiek eukariotiniuose organizmuose: bakterijose, grybuose, augaluose, vabzdžiuose, taip pat gyvūnuose. Šiuo metu tokių medžiagų ir jas produkuojančių mikroorganizmų kamienų paieška pasaulyje labai plečiasi. Vos ne kasdien atrandama naujų producentų, tačiau jų populiacijos gamtoje dar mažai ištirtos. Jų ištyrimas svarbus tiek praktiniu, tiek moksliniu požiūriu. Galimybės surasti reikiamų naujų mikroorganizmų dar ilgą laiką bus neišnaudotos [Selitrennikoff, 2001; Lauer ir kt., 2008].

Beveik visi praktikoje panaudoti toksinai ir juos koduojantys genai yra patentuoti. Išlieka aktualu ieškoti naujų, natūraliai gamtoje gyvenančių mielių ir mikroorganizmų, produkuojančių naujus toksinus ir biologiškai aktyvias medžiagas. Labai svarbu, kad jos veiktų kuo daugiau patogeninių mielių ir mikromicetų rūšių, be to, jų išskiriamų toksinų veikimo pH ir temperatūrų

intervalas turėtų būti kuo platesnis. Tokie mikroorganizmai yra paplitę ant vaisių ir uogų ar kitų paviršių [Philliskirk, Young, 1975; Starmer ir kt., 1987; Sangorin ir kt., 2001; Carreiro ir kt., 2002; Gulbinienė ir kt., 2004; Baeza ir kt., 2008].

1990 metais Botanikos instituto Genetikos laboratorijoje klonuota K2 virusinio genomo M2 fragmento kopijinė DNR ir nustatyta šio fragmento nukleotidų seka [Meškauskas, Čitavičius, 1992]. Kilerinio K2 preprotoksino geno savybės (kilerinės, imuninės, nustatytas specifiskumas) plačiai ištirtos [Gulbinienė, 2002; Servienė, Melvydas, 1999; Servienė ir kt., 2002], todėl nuspręsta jį klonuoti į augalą *Nicotiana tabacum* L. ir transgeniniuose augaluose patikrinti jo ekspresiją. Taip pat vykdoma naujų plataus fungicidinio veikimo mikroorganizmų prieš patogeninius mikromicetus paieška.

Mokslinių tyrimų tikslas: Ištirti naujai rastų bakterijų ir mielių izoliatų biocidiškumo, imuniškumo ir rauginimo savybes; nustatyti poveikį prieš mikromicetus, taip pat aplinkos veiksnių (pH, temperatūros) įtaką toksinų sekrecijai; įvertinti mielių *Saccharomyces cerevisiae* K2 kilerinio preprotoksino geno raiškos galimybes augaluose.

Uždaviniai:

- ✓ Iš surinktų uogų ir vaisių paruošti spontaninius raugus, iš jų išskirti ir išgryninti mikroorganizmus; atlikti gautų izoliatų biocidiškumo ir imuniškumo savybių analizę, palyginti naujai rastų izoliatų išskiriamų medžiagų veikimą su *S. cerevisiae* K1, K2 ir K28 tipų kilerinių toksinų veikimu.
- ✓ Optimizuoti mikroorganizmų auginimo sąlygas, užtikrinančias didžiausią toksinų funkcinį pasireiškimą; nustatyti pH ir temperatūros įtaką sekretuojamų toksinų aktyvumui.

- ✓ Ištirti biocidinėmis savybėmis pasižyminčių mikroorganizmų poveikį kai kurioms fitopatogenų rūšims bei gyvūnų ir žmonių ligų sukėlėjams.
- ✓ Atrinkti ir įvertinti kilerinių mielių, išgrynintų iš spontaninių uogų ir vaisių raugų, gamybinį perspektyvumą vyno bei etilo alkoholio pramonėje.
- ✓ Sukonstruoti augalų transformacijai tinkamas DNR plazmides, koduojančias *S. cerevisiae* K2 kilerinį geną; įvertinti mielių kilerinio K2 preprotoksino geno ekspresijos galimybes augalų ląstelėse su skirtingais promotoriais.

Mokslinis naujumas:

- ✓ Šio darbo metu K2 kilerinis preprotoksino genas sėkmingai klonuotas į augalą *Nicotiana tabacum* L. ir įvertinta jo raiška.
- ✓ Rasti bakteriniai kamienai, pasižymintys plataus veikimo spektro biocidinėmis bei imuninėmis savybėmis ir veikiantys daugybę mielių ir mikromicetų rūšių.
- ✓ Rastas bakterinis izoliatas (Tx), kuris pasižymi neįprasta autolize ir biologinėmis savybėmis, atitinkančiomis biopreparatų gamybos bei panaudojimo reikalavimus.
- ✓ Rastas bakterinis izoliatas (Ux), pasižymintis padidinta toksino supersekrecija, esant žemoms pH reikšmėms, bet blogai augantis šiomis sąlygomis.
- ✓ Rastas naujas mielių *S. cerevisiae* kilerinis kamienas 1M panaudotas natūralaus pusgaminio obuolių vyno gamyboje kooperatinėje bendrovėje „Vaisių sultys“.

Ginamieji teiginiai:

- ✓ K2 kilerinio preprotoksino geno raiška augaluose *N. tabacum* L. yra galima.
- ✓ K2 kilerinio preprotoksino geno produkcija augaluose *N. tabacum* L. yra žemesnio lygio nei mielėse bei pakitęs baltymo veikimo pH optimumas.
- ✓ Bakteriniai izoliatai, išskirti iš spontaninių vaisių–uogų raugų, pasižymi neįprastomis biocidinėmis savybėmis, veikia plačiame pH ir temperatūros intervale bei yra pranašesni už mielių *S. cerevisiae* standartinius kilerinius kamienus.
- ✓ Iš spontaninių vaisių–uogų raugų išskirti bakteriniai izoliatai veikia biocidiškai kai kuriuos augalų, gyvūnų ir žmonių patogenus.
- ✓ Naujas mielių *S. cerevisiae* kamienas 1M yra ekonomiškai naudingas obuolių vyno natūralaus pusegaminio gamyboje.

Darbo aprobavimas ir publikacijos: Disertacijos medžiaga buvo pristatyta 2 tarptautinėse ir 3 konferencijose Lietuvoje. Tyrimų rezultatai paskelbti 5 moksliniuose straipsniuose bei 5 konferencijų tezėse.

Disertacijos struktūra: Disertacijos rankraštį sudaro: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiagos ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, 165 literatūros šaltinių sąrašas, mokslinių publikacijų sąrašas, 3 priedai. Disertacijos apimtis – 118 puslapiai, 13 lentelių ir 33 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų kalba.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mikroorganizmų gaminami toksinai ir jų bendra charakteristika

Kai kurie mikroorganizmai gamina nuodingąsias medžiagas – toksinus [Masteikienė, 2002]. Mikroorganizmų biocenozėje kaip ir visoje gamtoje stebimi konkurenciniai tarprūšiniai santykiai, dėl kurių vyksta pastovi bendrijų ir ekosistemų (ekologinių nišų) kaita. Viena iš konkurencijos tarp rūšių formų yra amensalizmas, kai viena rūšis, išskirdama chemines medžiagas, stelbia arba naikina kitą rūšį. Tos medžiagos vadinamos alelopatinėmis (gr. *allelon* – savitarpiškai, *pathos* – poveikis, kentėjimas), alelocheminėmis arba ektokrininėmis. Alelopatinės medžiagos, dalyvaujančios antibiozėje yra fitoncidai, antibiotikai, toksinai, koalinai, peptidai, chinonai ir kiti junginiai [Qureshi, Michaud, 2005; Tharayil, 2009].

Toksinai gali būti išskiriami į ląstelės išorę – egzotoksinai. Taip pat į aplinką gali patekti tik ląstelei suirus – endotoksinai. Egzotoksinai dažniausiai yra baltymai, turintys fermentų savybių. Endotoksinai – tai polisacharidų ir lipoproteinų kompleksai (*angl.* LPS complexes). Klinikiniai eksperimentai parodė, kad endotoksinai gali sukelti karščiavimą, leukopeniją, pagrindinių organų – smegenų, širdies, inkstų, susilpnėjimą. Įvairūs mikroorganizmai: bakterijos, aktinomicetai, grybai, taip pat aukštesnieji organizmai – augalai bei gyvūnai, – gamina savitas didelio fiziologinio aktyvumo organines medžiagas – antibiotikus (gr. *anti* – prieš, *bios* – gyvybė), kurie pasirinktinai slopina arba naikina kitus mikroorganizmus [Masteikienė, 2002; Thrasher, Crawley, 2009].

1.1.1. Antibiotikai

Toksinams, plačiąja prasme, priskirtini ir mikroorganizmų išskiriami antibiotikai, siauresniąja – mikroorganizmų gyvybinės veiklos produktai, nuodingi kitiems organizmams. Antibiotikų, plačiai vartojamų medicinoje ir

veterinarinėje praktikoje, atradimas siejamas su anglų mikrobiologu A. Flemingu, 1929 m. nustačiusiu, kad grybo *Penicillium notatum* kultūros filtratas slopina stafilokokų ir kai kurių kitų gramteigiamų bakterijų veiklą. Penicilino sintezės kelias yra pilnai charakterizuotas genetiškai ir biochemiškai [Masteikienė, 2002; Billiau, 2009; Schneider, Sahl, 2010].

Antibiotikai – tai medžiagos, kurios susidaro kaip antriniai medžiagų apykaitos produktai – antriniai metabolitai. Tai antibiotikai, pigmentai, aromatinės medžiagos, toksinai. Antibiotikai – kai kurių mikroorganizmų gaminamos savitos didelio fiziologinio aktyvumo organinės medžiagos. Vieni jų trikdo medžiagų apykaitą ląstelėje, kiti slopina baltymų ar nukleorūgščių sintezę, ląstelės sienelės sintezę, inhibuoja kvėpavimo procesus, inaktyvina fermentus. Jie paprastai vadinami pagal mikroorganizmo, iš kurio išskirti, rūšies ar genties pavadinimą arba pagal veikimo pobūdį. Pavyzdžiui: penicilinas pavadintas pagal jo producentą – grybo *Penicillium chrysogenum* (*P. notatum*) gentį, streptomocinas – pagal aktinomicetų *Streptomyces griseus* pavadinimą, gramicidinas – pagal gramteigiamų bakterijų poveikio savitumą. Skirtingai nuo kitų mikroorganizmų metabolitų, slopinančių tam tikrų rūšių mikroorganizmus (alkoholiai, organinės rūgštys, vandenilio peroksidas ir kiti), antibiotikai biologiškai labai aktyvūs. Yra riboto veikimo antibiotikų (penicilinas G, novobiocinas ir kiti), kurie veikia kai kurių rūšių mikrobus, pavyzdžiui, gramteigiamus kokus, ir plataus veikimo antibiotikų (tetraciklinai, chloramfenikolas ir kiti), kurie veikia daugelio rūšių mikroorganizmus. Mikroorganizmai skirstomi į jautrius atitinkamiems antibiotikams ir atsparius (rezistentiškus) jiems. Bakterinius antibiotikus gamina įvairios bakterijos – *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Micromonospora* sp. [Masteikienė, 2002]. Šiuo metu ypatingai domimasi įvairiomis mikroorganizmų išskiriamomis medžiagomis, kurios yra toksiškos kitiems mikroorganizmams, bet nekenkia aukštesniesiems organizmams. Tokie mikroorganizmai ar jų toksinai gali būti sėkmingai panaudoti patogenų sukeltoms ligoms gydyti tiek augalams, tiek gyvūnams ar žmonėms. Apie tai rašoma pastarųjų metų mokslinėse publikacijose. Pavyzdžiui, *Lactobacillus* sp. bakterijos, atrastos ant šviežių

vaisių – daržovių, pasižymi antigrybelinėmis savybėmis prieš *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia minor* [Sathe ir kt., 2007]. *Bacillus subtilis* gali produkuoti keletą rūšių mažos molekulinės masės antibiotikų (mažiau nei 200 Da). Vieni iš jų – bacilisinas ir kapsofunginas, kurie pasižymi antigrybeliniu aktyvumu. Taip pat aprašyti – surfaktinas, fengimicinas, inurinas, bacilomicinas, mikosubtilinas, mikobacilinas. Bacilisinas gali būti panaudotas kaip efektyvi priemonė prieš *Staphilococcus aureus* patogeną. Kapsofunginas veikia ląstelės sienelę. *B. subtilis* kamienai taip pat sekretuoja didelį kiekį įvairių kitų proteinų. Tačiau apie tuos baltymus yra mažai žinoma. Nustatyta, kad kai kurie *B. subtilis* kamienai pasižymi antigrybelinėmis savybėmis prieš *Fusarium*, *Pythium* ir *Rhizoctonia* augalų patogenus. Aprašyti *B. subtilis* priešgrybeliniai baltymai: B29I, bacisubinas, YxjF, endo-1,4-β-glukanazė, YnfF, BamD, bacilomicinas D [Li ir kt., 2009]. *Bacillus* spp. pasižymi plačiu spektru priešmikrobinų bei priešgrybelinių savybių. *Bacillus* spp. produkuoja 167 biologiškai aktyvius baltymus prieš grybus, bakterijas bei virusus. *Bacillus pumilus* inhibuoja *Aspergillus*, *Penicillium* ir *Fusarium* grybų micelio augimą [El-Mechalawy ir kt., 2008].

Mokslininkai aprašė tris rastus bakterijų izoliatus – *Tsukamurella inchonensis*, *Corynebacterium nitrilophilus* ir *Cellulosimicrobium cellulans*, kurie buvo išskirti iš dirvožemio Egipto teritorijoje. Izoliatai pasižymėjo priešgrybeliniu aktyvumu prieš *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria solani* patogenus [El-Mehalawy ir kt., 2008].

1.1.2. Bakteriocinai ir jų producentai

Yra žinoma, kad daugelis bakterijų sintetina baltyminės prigimties antibiotines medžiagas, žudančias giminingas bakterijų rūšis arba slopinančias jų populiaciją (dauginimąsi). Šios medžiagos su gana specifišku veikimu buvo

pavadintos *bakteriocinai*. Pirmą kartą bakteriocinai buvo identifikuoti beveik prieš šimtą metų, *E. coli* kultūroje ir buvo pavadinti kolicinai. Taip buvo nuspręsta vadinti bakteriocinus pagal produkuojamą rūšį. Jų biosintezę koduoja plazmidėse lokalizuoti genai. Bakteriocinai – tai aukštamolekuliniai antibiotikai. Pavyzdžiui, kolicinų molekulinė masė yra 50 – 90 kDa. Bakteriocinogeninių bakterijų biologinis fenomenas plačiai paplitęs gamtoje ir susijęs su bakterijų antagonizmu. Šių toksinių medžiagų ypatybė yra ta, jog pagal cheminę sudėtį jos priklauso polipeptidams (cikliniams ar linijiniams) ir didelės molekulinės masės baltymams. Iš šių antibiotikų ir buvo išskirta bakteriocinų, slopinančių panašių ar giminingų bakterijų veiklą, grupė. [Егоров, Баранова, 1999; Hammami ir kt., 2010].

Bakteriocinų sintezę kontroliuoja tam tikros plazmidės (Col faktorius; kolicinogeniško faktorius). Bakterijos, kurios turi Col faktorių, vadinamos bakteriocinogeniškomis, o pats reiškinys – bakteriocinogenija. Vėliau išsiaiškinta, kad bakteriocidines medžiagas gamina ir virionai, ir kitos bakterijos, todėl jas pradėta vadinti bakteriocinai [Daw, Falkiner, 1996; de Souza ir kt., 2005].

Priešingai negu antibiotikai, bakteriocinai turi siaurą veikimo spektrą, nes yra aktyvūs tik prieš tos pačios rūšies arba filogenetiškai artimas rūšis. Tai ypač būdinga iš gramneigiamų bakterijų išskirtiems toksinams [Егоров, Баранова, 1999]. Gramneigiami mikroorganizmai gamina endotoksinus (1 lentelė).

1 lentelė. Gramneigiamų bakterijų sintetiniai bakteriocinai [Егоров, Баранова, 1999]

Pavadinimas	Producentas
Galocinas H-6	<i>Haloferax gibbonsii</i> 239
Klebocinas	<i>Klebsiella</i> sp.
Kolicinai	<i>Escherichia coli</i>
Piocinai	<i>Pseudomonas</i> sp.
Bakteriocinas 28b	<i>Serratia marcescens</i>
Bakteriocinas	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Pesticinas	<i>Yersinia pestis</i>
Vibriocinas	<i>Vibrio cholerae</i>
Bakteriocinas	<i>Neisseria</i> sp.

Egzotoksinus paprastai išskiria gramteigiamos bakterijos. Šių mikroorganizmų bakteriocinams (2 lentelė) būdingas platesnis veikimo spektras [Thrasher, Crawley, 2009]

2 lentelė. Gramteigiamų, bakterijų sintetinami bakteriocinai [Егоров, Баранова, 1999; Thrasher, Crawley, 2009]

Pavadinimas	Producentas
Amilovorinas 471	<i>Lactobacillus amylovorus</i> 471119
Acidocinas B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Bavaricinas MN	<i>Lactobacillus bavaricus</i> MN
Nizinas Z	<i>Lactococcus lactis</i> 10-1
Bakteriocinas N5	<i>Bifidobacterium</i> sp.
Variacinas	<i>Lactococcus lactis</i>
Diacetinas B-1	<i>Lactococcus lactis</i>
Kazeicinas	<i>Lactobacillus casei</i>
Lakticinas 3147	<i>Lactococcus lactis</i> 3147
Valinomicinas	<i>Streptomyces griseus</i>
Leptomycinas B	<i>Streptomyces</i> sp.
Toksiškas peptidas	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Mitochondrijų toksinas	<i>Bacillus pumilus</i>
Mitochondrijų toksinas	<i>Nocardiopsis</i> sp.
Citostatiniai komponentai	<i>Streptomyces californicus</i>

Lantibiotikus gamina gramteigiamų pavienių genčių bakterijos, pavyzdžiui, *Lactococcus* (liziną, lakticiną), *Lactobacillus* (laktociną), *Staphylococcus* (epiderminą, gakerminą), *Streptococcus* (streptokokciną, salivariciną), *Bacillus* (subtiliną, merkacidiną), *Carnobacterium* (karnociną), *Streptomyces* (duramiciną) ir *Actinoplanes* (aktagardiną) [Егоров, Баранова, 1999; Daly ir kt., 2009; Ross ir kt., 2010].

1.1.3. Mikotoksinai

Mikotoksinai – tai mikroorganizmų gyvybinės veiklos metabolitai, kuriuos produkuoja įvairūs grybai. Jie biologiškai labai aktyvūs, aptinkami

maisto produktuose, pašaruose, sukelia žmonių ir gyvulių mikotoksikozę [Thrasher, Crawley, 2009].

Kai kurių mielių kamienai yra ypač agresyvūs, naikinantys kitų mikroorganizmų rūšis. Tai žudikai arba kileriai. Mielių gebėjimas išskirti toksinius metabolitus priklauso nuo tam tikrų genų, kurie koduoja toksinį poveikį turinčius peptidus. Jų veikimą reguliuoja chromosominiai genai. Grybai išskiria medžiagas, stabdančias bakterijų dauginimąsi, taip pašalindami mitybos konkurentus [Comitini ir kt., 2004; Comitini ir kt., 2009].

Mikroskopiniai grybai gamina virš 1200 antibiotinių medžiagų. Svarbesni iš jų – penicilinai, cefalosporinai, trichotecinas, fumagilinas ir kai kurie kiti grybų apykaitos produktai, vartojami medicinos ir žemės ūkio praktikoje. Penicilinus gamina *Aspergillus* ir *Penicillium* rūšys: *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. nidulans* *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans* ir kitos. Pagrindinis mikromicetas penicilinui gauti pramoniniu būdu yra *Penicillium chrysogenum*, kuris gamina įvairių formų penicilinus: heptilpeniciliną, benzilpeniciliną, oksibenzilpeniciliną, besiskiriančius molekulės šoninių grandinių struktūra, biologiniu aktyvumu ir antibakterinio veikimo spektru. Penicilinas baktericidiškai veikia daugelį gramteigiamų bakterijų – stafilokokus, streptokokus, pneumokokus. Jis chemiškai ir fiziologiškai nepatvarus. Kai kurios bakterijos turi fermento penicilazės, kuris suardo peniciliną [Masteikienė, 1999].

Mikromicetas *Trichothecium roseum* ir kai kurie kiti mikrosporiniai grybai sintetina mikotoksiną – antibiotiką trichoteciną (trichothecin, T-cin), priklausančią 12,13-epoksitrichotecinų mikotoksinų šeimai, kuri pasižymi stipria baltymų sintezės inhibicija eukariotinėse ir žinduolių ląstelėse [McLaughlin ir kt., 2009]. Trichoteciną sintetinantis *Trichothecium roseum* pats turi imunitetą šiam transliacijos inhibitoriui. *Fusarium oxysporum*, nors nėra žinomas kaip toksiną sintetinantis grybas, bet augdamas terpėje su trichotecinu, įgyja atsparumą (imunitetą) jam. Abiem atvejais atsparumas šiam toksinui aiškinamas ribosomų lygyje. Rezistentinių organizmų imunitetas trichotecinui susijęs su 60S ribosomų subvienetu. Rezistentinės ribosomos gali būti

paruoštos *in vitro*: jautrias ribosomas iš *F. oxysporum* arba *S. cerevisiae*, inkubuojant kartu su atsparumą turinčių ląstelių ekstraktais, kuriuose yra S-adenosilmetionino. Tokiu būdu specifinis metilinimas aptinkamas tik jautrių ląstelių ribosomose, o rezistentinių ląstelių ribosomos turi tik radioaktyvų S-adenosilmetioniną. Trichotecinus taip pat sintetina *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium* ir *Verticimonosporium*. Tokį toksiną taip pat sintetina Brazilijos augalas *Baccharis ciridifolia*. Šie trichotecinai pasižymi dideliu toksiškumu prokariotams, mielėms, vabzdžiams, augalams, gyvūnams ir kai kurioms žinduolių ląstelių linijoms [Iglesias, Ballesta, 1994]. Jie stipriai veikia antigrybiškai, ypač prieš kai kurias *Penicillium* genties rūšis ir vartojami veterinarijoje, gydant žemės ūkio gyvulių patogeninių grybų sukeltas ligas, augalininkystėje – prieš fitopatogeninius grybus iš *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* genčių. Ši antibiotiką aktyvuoja fermentas trihotecinazė, kuri gamina *Penicillium chrysogenum* ir *Aspergillus niger* grybai [Napoli ir kt., 2009]. Trichotecenai, yra suskirstyti į keturias klases: T-1, T-2, T-3 ir T-4. T-1 toksinas yra retas ir mažai ištirtas. Kitos trys klasės sutinkamos dažnai. T-2 trichotecenas pirmą kartą aprašytas 1912 metais Rusijoje. Toksinas sukelia audinių nekrozę bei ląstelių mirtį, taip pat pasižymi rezistentiškumu UV spinduliuotei. Trichotecenas T-3 – dioksinivalenolis (DON) yra mažiau toksiškas [Zhang ir kt., 2010].

Labai pavojingi mikotoksinai yra aflatoksinai – kumarino dariniai. Jie pažeidžia lizosomų membranas, veikia ląstelių genetinį aparatą (slopina DNR ir RNR sintezę), sukelia ūmius apsinuodijimus, slopina ląstelių fermentinį aktyvumą, pasižymi kancerogeniškumu. Pirmas aflatoksinas buvo išskirtas 1950 metais iš *Aspergillus flavus*. Taip pat aflatoksinus gamina kai kurie *Aspergillus parasiticus* patogeniniai kamienai bei kitų genčių grybai. Aflatoksinų taikinytis yra kepenys [Tchana ir kt., 2010].

Sterigmatocistiniai yra produkuojami *Aspergillus vericolor* bei kai kurių *A. flavus* ir *A. parasiticus* grybų. Sterigmatocistinas yra panašus į aflatoksiną ir, manoma, kad tai yra aflatoksino pirmtakas [Versilovskis ir kt., 2010].

Ochratoksinas A (OA) yra produkuojamas *Aspergillus* spp. ir *Penicillium* spp. grybų. Grūdai yra pagrindinis ochratoksino A šaltinis. Nustatyta, kad ochratoksinai pasižymi nefrotoksiniu, kancerogeniniu ir imunosupresiniu veikimu [Almeida ir kt., 2010]. Daug jų susikaupia inkstuose ir kepenyse. Jie pažeidžia ląstelių lizosomas ir atsipalaidavę jų fermentai suardo DNR. Kartu su aflatoksinu ochratoksino poveikis tik didėja. Ochratoksinas B (OB) nėra toksiškas [Baliukonienė, Bakutis, 2002; Leung ir kt., 2006; Ueta ir kt., 2010, Kabak, 2009a; Kabak ir kt., 2009b; Sutkevičius, Černauskas, 2003].

Kitas mikotoksinas, pažeidžiantis žmogaus odos paviršių, – alternariolas, produkuojamas *Alternaria* spp., sutinkamas ant cemento, tapetų, čerpių bei įvairaus maisto. Alternariolo struktūra labai artima tabako dūmų benzopireno struktūrai [Pastor, Guarro, 2008].

Mikotoksiną zeralenoną gamina *Fusarium* genties mikroskopiniai grybai. Šio mikotoksino didžiausios koncentracijos dažniausiai nustatomos Vidurio Europos šalyse (Austrijoje, Vokietijoje, Prancūzijoje). Grūduose, išaugintuose šiuose kraštuose, zeralenonas nustatytas apie 90 % tirtų mėginių. Zeralenonas ūmiai toksiškai neveikia. Jis trikdo organizmo reprodukcinę sistemą, sukelia gimdos ir kiaušidžių pažeidimus, skatina pieno liaukos auglius. Dėl savo estrogeninių savybių zeralenonas gali sukelti vaisingumo sutrikimus arkliams, karvėms, avims [Abdelhamid ir kt., 1992; Baliukonienė, Bakutis, 2002].

Mielių kamienai – „žudikai“ (kileriai), sintetinantys baltyminius toksinus (mikocinus), turinčius fungicidinį ir fungistatinį poveikį, yra žinomi daugiau nei 40 metų [Bevan, Makower, 1963]. Šis reiškinys plačiai paplitęs tarp įvairių mielių, mikroorganizmų taksonų ir ypač tarp šių genčių: *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Williopsis*, [Starmer ir kt., 1987].

Kileriniu fenotipu pasižymintys mielių kamienai gamtoje yra pranašesni už jautrius mielių kamienus, nes produkuojamas toksinas leidžia lengviau įsitvirtinti aplinkoje. Ta savybė svarbi vyno pramonėje, kadangi procesas vykdomas ne visiškai steriliomis sąlygomis [Kondratienė ir kt., 2003].

1.2. Priešgrybeliniai toksiniai baltymai

Priešgrybeliniai baltymai gali būti izoliuoti iš įvairių organizmų: gyvūnų, augalų, bakterijų, grybų. Augalai patogeniniams grybams yra puikus taikynys. Jie neturi imuninės sistemos, kaip žmonės ir gyvūnai, bet turi keletą gynybos mechanizmų. Vienas iš jų – mažos molekulinės masės junginiai, baltymai bei peptidai, pasižymintys priešgrybeliniu aktyvumu. Šios medžiagos yra susijusios su pastoviu arba indukuojamu atsparumu prieš grybus.

Šiuo metu visose organizmų grupėse yra atrasta šimtai baltymų ir peptidų, pasižyminčių priešgrybelinėmis savybėmis. Pasirinkus tik tuos, kurių grandinės ilgis daugiau nei 50 aminorūgščių ir masė virš 5 kDa, galima suskirstyti į trylika klasių. Tai: PR-1 baltymai, (1,3)b-gliukanazės, chitinazės, chitiną surišantys baltymai, į taumatinę panašūs baltymai (TL), defensinai, į ciklofiliną panašūs baltymai, glicinu/histidinu praturtinti baltymai, ribosomas deaktyvuojantys baltymai (RIPs), lipidus pernešantys baltymai (LTPs), baltymai „žudikai“ (kileriniai toksinai), proteazių inhibitoriai ir kiti baltymai. Kai kurie baltymai gali priklausyti iškart kelioms grupėms [Selitrennikoff, 2001].

Priešgrybelinius toksinus, išskiriamus gyvūnų, augalų ar mikroorganizmų, atsižvelgiant į baltymo dydį, savybes ir žudantį poveikį, bandoma klasifikuoti (3 lentelė).

3 lentelė. Priešgrybiniai toksinai [Selitrennikoff, 2001]

Priešgrybinio baltymo tipas	Trumpa informacija apie baltymą
PR-1 baltymai	Aptinkami ryžiuose, kukūruose, tabake, kviečiuose. Molekulinė masė nuo 15 iki 17 kDa. Po infekcijos gaminami labai dideliais kiekiais. <i>In vivo</i> ir <i>in vitro</i> žudo grybus: <i>Uromyces fabae</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Erysiphe graminis</i> ir kitas rūšis. Veikia ląstelės membranos kanalinius baltymus ir inhibuoja kalcio jonų apykaitą.

3 lentelės tęsinys	
PR-2 baltymai (b- gliukanazės)	Sekretuoja dauguma augalų: tabakas, įvairūs javai bei vaisiai. I klasės baltymai yra apie 33 kDa ir randami augalų vakuolėse. II ir III klasės baltymai yra apie 36 kDa ir yra tarpląsteliniai. Skiriasi nuo PR-1 tuo, kad yra sintetunami kaip preprotoksinai ir nėra fermentiškai aktyvūs, tam reikalingas brendimas. Žudo <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> ir kitas rūšis. Mažiau nei per savaitę suardo grybų ląstelių sienelės.
PR-3 baltymai (chitinazės)	Izoliuoti iš įvairių grupių grybų, augalų (javų, agurkų, pupelių), bakterijų. Molekulinė masė nuo 26 iki 43 kDa. Žudo <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria radicina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Coprinus comatus</i> ir kitas rūšis. Endochitinazės skaldo sienelėje esančius chitino polimerus ir keičia ląstelės osmosinį slėgį.
PR-4 baltymai (surišantys chitiną)	Aptinkami pomidoruose, bulvėse, tabake, miežiuose. Molekulinė masė apie 13 – 14,5 kDa. Žudo <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> ir kitus patogenus. Veikimo mechanizmas neišsiaiškintas, tačiau žinoma, kad veikia ląstelės poliariškumą ir tai lemia jos augimą.
PR-5 (TL) baltymai	Sekretuoja dauguma javų – ryžiai, kviečiai, taip pat tabakas, moliūgai, pomidorai, linai. Molekulinė masė ~ 22 kDa. Turi disulfidinį ryšį, kuris suteikia didelį stabilumą proteazių veikimui.
Defensinai	Aptinkami žinduoliuose, grybuose, vabzdžiuose, augaluose. Mažos molekulinės masės (nuo 3 iki 5 kDa). Žudo <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Candida albicans</i> ir kitas rūšis. Skirstomi į 4 klases.

3 lentelės tęsinys	
Į ciklofiliną panašūs baltymai	Aptinkami bakterijose, augaluose, gyvūnuose, grybuose. Molekulinė masė apie 18 kDa. Veikia <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> ir <i>Coprinus comatus</i> .
Histidino ir glicino praturtinti baltymai.	Aptinkami vabzdžiuose. Apie 80 % baltymo sudaro glicinas ir histidinas. Žudo daugelį patogenų, tarp jų ir dažnai sutinkamą žmones veikiantį <i>Candida albicans</i> .
RIP	Tai augalų RNR glikozidazės, veikiančios ribosominę RNR ir dėl to stabdančios baltymų sintezę. Molekulinė masė apie 60 kDa. Inhibuoja gyvūninių, augalinių, bakterinių ir grybinių baltymų sintezę <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> .
LTP	Mažos molekulinės masės (8,7 kDa). Yra izoliuoti iš įvairių rūšių gyvūnų, augalų, grybų bei bakterijų. Tarp membranų gali transportuoti fosfolipidus.
Kileriniai toksinai	Molekulinė masė nuo 10,7 iki 156,5 kDa. Žudo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Ustilago maydis</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Kluveromyces lactis</i> ir keletą <i>Pichia</i> rūšių.
Proteazių inhibitoriai	Izoliuoti iš įvairių rūšių augalų (rausvoji pirštunė – <i>Eleusine coracana</i>) kviečių, miežių. Baltyminiai serino, cisteino proteazių inhibitoriai, kurie gali žudyti įvairius patogenus. Pavyzdžiui, <i>Fusarium solani</i> ir <i>Trichoderma reesei</i> .
Kiti baltymai	Tai naujai atrasti baltymai, tokie kaip Viridinas izoliuotas iš <i>Trichoderma viride</i> ir yra 65 kDa, bei Snakin-1 izoliuotas iš bulvių, mažos molekulinės masės (6,9 kDa). Dar vienas baltymas – 30 kDa, išskirtas iš <i>Engelmannia pinnatifida</i> augalo. Jie gali žudyti įvairius patogenus, tačiau nepriskiriami nei vienam aprašytam tipui.

Daugumos šių baltymų veikimo mechanizmai neišaiškinti.

1.3. Kileriniai toksinai

1.3.1. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* genomai

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra pirmas eukariotinis organizmas, kurio genomai yra pilnai sekvenuoti [Goffeau ir kt., 1996]. Jų ląstelės turi apie 1,5 µm diametro branduolį, apgaubtą dviguba membrana. Nukleoplazmoje yra išsidėsčiusios 16 linijinių chromosomų. Mielės *S. cerevisiae* gali būti haploidai arba diploidai. Pramonėje dažniau naudojamos diploidinės kultūros. *S. cerevisiae* turi 5885 baltymus koduojančius genus, 275 tRNR genus, 140 rRNR genų bei 40 snRNR (*angl.* small nuclear RNA) genų. *S. cerevisiae* mielių branduolyje arba mitochondrijose aptinkama plazmidžių. Geriausiai aprašyta yra dvimikroninė mielių plazmidė, kuri plačiai naudojama mielių vektorių konstravimui. Tai žiedinė DNR (6318 bp) ir sudaro apie 80 kopijų haploidiniame genome [Рыбчин, 1999]. Citoplazmoje yra mitochondrinė DNR, kurios dydis 75 kb. Kai kurios *S. cerevisiae* mielės citoplazmoje turi į virusus panašių dalelių (VPD) su dvigrande RNR (dgRNR), kurioje yra kileriškumo determinantai. [Tipper ir kt., 1991; Schmitt, Breinig, 2002]. Replikacijos iniciacijos lokusai (ori-saitu analogija bakterijose) žymimi kaip ARS (*angl.* autonomously replicating sequence) ir sudaro apie 50 bp seką. [Goffeau ir kt., 1996; Рыбчин, 1999].

1.3.2. Kilerinis fenotipas

Dar 1963 m. Makoveris ir Bevanas pastebėjo, kad kai kurie *Saccharomyces cerevisiae* kamienai sugeba žudyti kitus kamienus, priklausančius tai pačiai rūšiai. Tokie kamienai buvo pavadinti „kileriniais“, o baltymas – „kileriniu toksinu“ [Bevan, Makower, 1963]. Šis reiškinys plačiai paplitęs tarp įvairių mielių genčių: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* [De Ingeniis ir kt., 2009]

Kileriniai toksinai žudo mielių jautrias ląsteles tarpininkaujant receptoriui. Pirmas etapas: greitas, nuo energijos nepriklausantis surišimas su pirminiu toksino receptoriu R1 – ląstelės sienelės manoproteinų arba P-1,6-gliukano frakcijose. Svarstoma, ar toksino surišimas koncentruoja toksiną ląstelės sienelės lygyje, ar susidaro glaudus ryšys tarp toksino sienelėje ir ląstelės membranos. Jautrūs kamienai gali tapti atsparūs toksinui, jei jie turi potencialių genų, kurie koduoja baltymus, atsakingus už ląstelės sienelės struktūrą, VPD susirinkimą, baltymų – toksinų brendimą. Tai nulemia chromosominės mutacijos [Flegelova ir kt., 2002].

Antras etapas reikalauja energijos: toksino translokacija į citoplazminę membraną ir sąveika su antriniu membranos receptoriu R2. Šiuo metu identifikuotas tik vienas membranos receptorius mielių *S. cerevisiae* K1 tipo toksinui – Kre1p. Tai O-glikozilintas mielių ląstelės paviršiaus baltymas, pritvirtintas prie plazmos membranos glikozilfosfatidilinozitolu, įtrauktas į β -1,6-gliukano biosintezę, ir ląstelės sienelės K1 tipo receptoriaus susirinkimą. Po to, kai plazmos membrana pasiekta, toks kilerinis toksinas kaip K1 ir zigocinas (pastarasis toksinas sekretuojamas *Zygosaccharomyces bailii*), sutrikdo citoplazminės membranos funkciją, sudarydamas katijonams selektyvius kanalus. Mielių *S. cerevisiae* K28 toksinas patenka į ląstelės vidų, kur blokuoja DNR sintezę ir sulaiko ankstyvą ląstelės ciklo S fazę [Novotna ir kt., 2004]

Kilerinis fenotipas daugeliu atvejų susijęs su dvigrandės RNR (dgRNR) (*S. cerevisiae*, *U. maydis*), linijinės DNR (*P. acaciae*, *K. lactis*, *P. inositovara*) arba atitinkamų genų buvimu chromosomose *S. cerevisiae*, (*P. kluyveri*, *P. farinosa*, *W. mrakii*) [Magliani ir kt., 1997]. Genetinių determinantų, apsprendžiančių žudantį efektą, įvairovė pateikta 4 lentelėje.

4 lentelė. Mielių kilerinio fenomeno genetinių determinantų įvairovė [Schmitt, Breinig, 2006; De Ingeniis ir kt., 2009]

Mielių rūšis	Toksiną koduojantis genas	Genetinis pagrindas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M1, M2, M28 dgRNR	dgRNR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR, KHS	Chromosominė DNR
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	M dgRNR	dgRNR
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	M dgRNR	dgRNR
<i>Ustilago maydis</i>	M dgRNR	dgRNR
<i>Kluyveromyces lactis</i>	pGK11	Linijinė dgDNR plazmidė
<i>Pichia accaciae</i>	pPac1	Linijinė dgDNR plazmidė
<i>Pichia inositovora</i>	pPin1	Linijinė dgDNR plazmidė
<i>Pichia kluyveri</i>	Neidentifikuotas	Chromosominė DNR
<i>Pichia farinosa</i>	SMK1	Chromosominė DNR
<i>Williopsis mrakii</i>	HMK	Chromosominė DNR

Pateikti lentelėje duomenys apie kilerinio fenomeno genetinių determinantų įvairovę rodo, kad kileriškumo mechanizmai yra labai sudėtingi.

1.3.3. *Saccharomyces cerevisiae* kilerinė sistema

Mielių *S. cerevisiae* kileriniai toksinai – tai mažo molekulinio svorio baltymai, kuriuos koduoja dvigrandės RNR molekulės, inkapsiduotos į baltyminių apvalkalą arba branduolio chromosominė DNR. Jie koduojami kaip preprotoksinai, vėliau brandinami ir sekretuojami kaip toksinai [de la Pena ir kt., 1981; Marquina ir kt., 2002; Breinig ir kt., 2006].

Aptikti trys pagrindiniai kilerinių mielių *S. cerevisiae* tipai: K1, K2 bei K28 [Schmitt, Breinig, 2006]. Kiekvienos iš trijų grupių atstovai produkuoja specifinį kilerinį toksiną ir nepilnai identifikuotą imuniškumo komponentą, kuris suteikia kilerinėms ląstelėms atsparumą savo produkuojamam toksinui [Sartakova ir kt., 2004]. Genai L–A atsakingi už virusinės dalelės susiformavimą ir kilerinių genų pasidauginimą. Skirtingai nei L–A genai, M genai koduoja tik kilerinį preprotoksiną, atsakingą už kileriškumą ir imuniškumą. Visų trijų tipų (K1, K2, K28) kilerinių toksinų dgRNR genomai kartu nebūna ląstelėje,

kadangi replikacijos metu jie yra išstumiami [Schmitt, Breinig, 2006; Breinig ir kt., 2006] (5 lentelė).

5 lentelė. dgRNR *S. cerevisiae* kileriniuose kamienuose [Schmitt, Breinig, 2006]

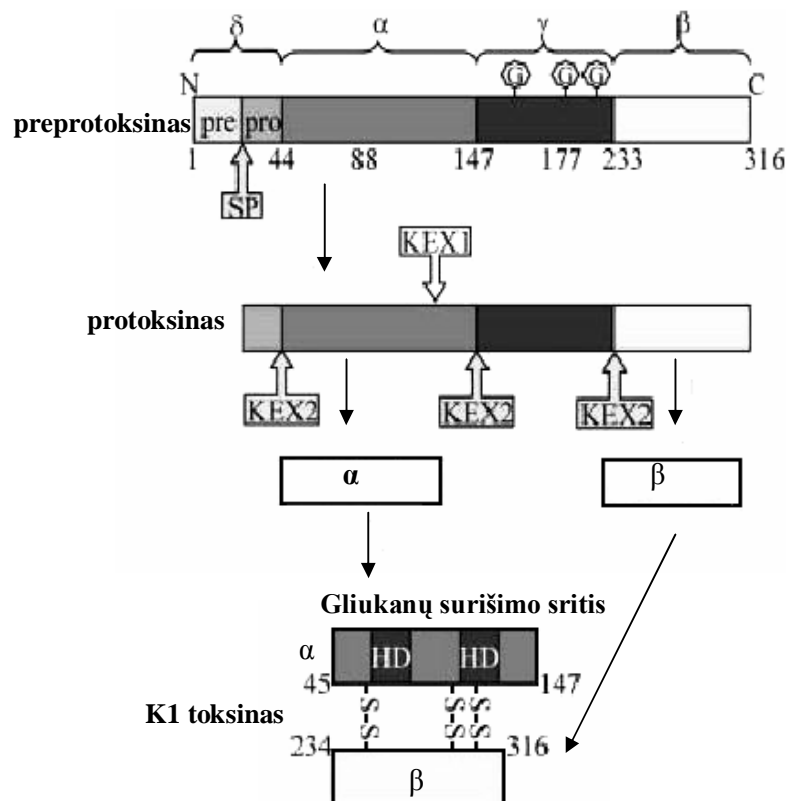
dgRNR genomai	dgRNR, kb	Koduojami baltymai
L–A genai	4,6	GAG – pagrindinis kapsidės baltymas, Pol - RNR priklausoma RNR-polimerazė (<i>in vivo</i> ekspresuojamas kaip GAG–Pol baltymas)
M1 genas	1,6	K1 preprotoksinas (nesubrendęs K1 tipo toksino pirmtakas ir imuniškumo determinantė)
M2 genas	1,5	K2 preprotoksinas (nesubrendęs K2 tipo toksino pirmtakas ir imuniškumo determinantė)
M28 genas	1,8	K28 preprotoksinas (nesubrendęs K28 tipo toksino pirmtakas ir imuniškumo determinantė)

Kilerinė *S. cerevisiae* sistema yra įdomi nagrinėjant fundamentinius klausimus. Mielių kilerinis virusas – puikus eukariotų virusų modelis, kurį galima tirti genetiniais ir molekulinės biologijos metodais. Kilerinio toksino brendimą ir sekreciją galima tirti kaip bendrą eukariotų baltymų brandinimo ir sekrecijos modelį. Panaudojant toksiną koduojantį geną, gali būti konstruojami vektoriai baltymų sekrecijai. Naudojant kilerinių virusų nukleotidų sekas, galima konstruoti vektorius heterologinių baltymų ekspresijai ir produkavimui mielėse tirti [Magliani ir kt., 1997].

1.3.4. Kilerinis toksinas K1

Iš visų žinomų mielių *S. cerevisiae* kilerinių toksinų geriausiai charakterizuotas K1 tipo toksinas. Tai mažo molekulinio svorio – 19 kDa baltymas. Pirminis M1 dgRNR transliacijos produktas – preprotoksinas yra

316 aminorūgščių baltymas, susidedantis iš N gale esančios lyderinės sekos (δ), α subvieneto (103 aminorūgščių), už jo glikozilinamos γ srities ir C gale esančio β subvieneto (83 aminorūgščių) (1 pav.) [Bostian ir kt., 1984; Skipper ir kt., 1984; Wickner, 1996; Marquina ir kt., 2002; Novotna ir kt., 2004]. Po translacijos preprotoksinas patenka į endoplazminį tinklą, Goldžio aparatą, kur vyksta brendimas. Po to baltymas patenka į sekretines pūsleles, o iš jų sekretuojamas aktyvus toksinas. N galo sritis nukreipia baltymą – pirmtaką į endoplazminį tinklą, kur molekulė paverčiama į 34 kDa protoksina, tai yra, glikobaltymą. Glikozilinimas yra būtinas produktyviai toksino sekrecijai, nors aktyvus K1 toksinas nėra glikozilintas. Kai protoksinas pereina per Goldžio aparatą, formuojamas α/β dimeras, kurio subvienetai jungiami disulfidiniais tilteliais. Toksinas yra sekretuojamas per plazmos membraną [Marquina ir kt., 2002].



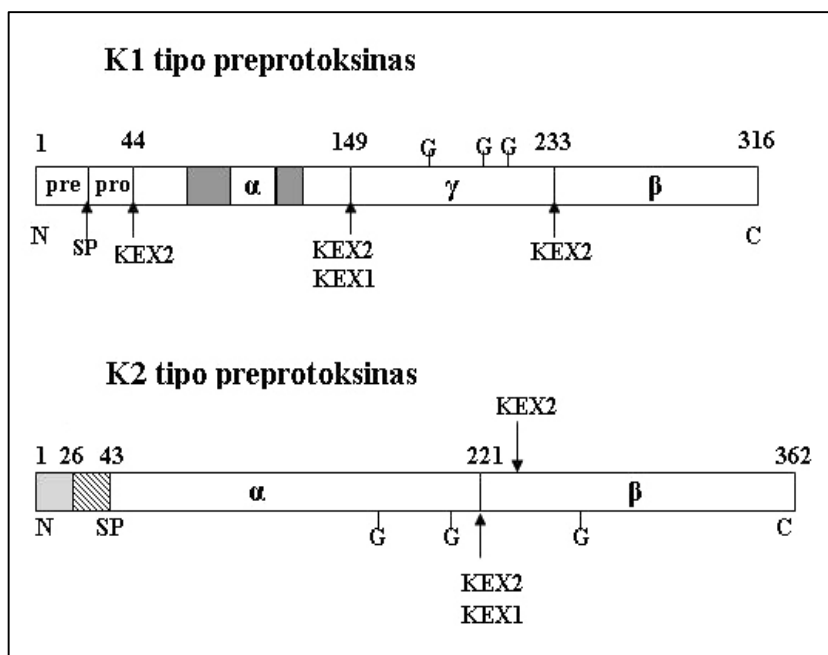
1 pav. *S. cerevisiae* K1 kilerinio preprotoksino, protoksino ir toksino struktūra. SP – signalinė peptidazė, KEX1 ir KEX2 – endopeptidazės, G – glikozilintų asparagino liekanų vietos (preprotoksino γ sritis), HD – hidrofobinė sritis [Marquina ir kt., 2002].

1.3.5. Kilerinis toksinas K2

K2 kilerinį toksiną koduoja M2 dgRNR [Dignard ir kt., 1991]. Jis yra labai panašus į K1, nors juos koduoja skirtingos dgRNR. Tai baltymas, kurio molekulinis svoris yra 21,5 kDa. Išryškėja pagrindinis skirtumas tarp K1 ir K2 signalinių sekų: K2 N – gale turi hidrofilinę 26 aminorūgščių seka, kurios funkcijos neaiškios [Dignard ir kt., 1991; Meškauskas, 1991]. K2 toksinas yra aktyvus ir stabilus pH 2,9 – 4,9 ribose, o jo optimalus pH yra 4,0 – 4,3 [Pfeiffer, Radler, 1984].

Pirminių M1 ir M2 dgRNR nukleotidų sekų palyginimas neparodė žymesnių panašumų, tačiau jie išryškėja preprotoksinų antrinėje struktūroje. Tiek K1, tiek K2 kilerinių preprotoksinų antrinėje struktūroje išskiriamos trys sritys, galinčios suformuoti transmembraninius rajonus: K1 preprotoksine dvi sritys išsidėsčiusios α subvienete ir viena lyderinėje sekoje, o K2 preprotoksino atveju – visos trys yra α rajone. K1 ir K2 preprotoksinų C galuose aptinkama daugiausiai rūgštinių aminorūgščių [Bostian ir kt., 1984]. Abu baltymai turi 3 glikozilinimo vietas, tačiau jos išsidėsčiusios visiškai skirtingose pozicijose: K1 preprotoksine išsidėsčiusios γ subvienete, o K2 preprotoksine – 2 α subvienete ir viena – β srityje. K2 neturi Pro-Arg sekos, kuri K1 tipo preprotoksine aptinkama 43 – 44 padėtyse ir yra hidrolizuojama neidentifikuotos proteazės. Todėl manoma, kad ši proteazė nereikalinga K2 kilerinio toksino brendimui. K2 preprotoksinas (panašiai kaip K1) turi kelias cisteino liekanas, kurios subrendusiame toksine formuoja disulfidinius tiltelius [Lolle ir kt., 1984]. Tikėtina, kad subrendęs K2 toksinas sudaro α/β heterodimerą, kuriame subvienetai sujungti disulfidinėmis jungtimis [Dignard ir kt., 1991; Meškauskas, Čitavičius, 1992]. Neatmetama galimybė, kad K2 toksinas gali egzistuoti kaip monomerinis N-glikoproteinas [Dignard ir kt., 1991] (2 pav.). Aktyvaus K2 toksino susidarymui, kaip ir K1 bei K28, reikalingos Kex1p ir Kex2p proteazės Remiantis potencialių brendimo vietų mutantų tyrimais, manoma, kad K2 toksinas sudarytas iš dviejų komponentų, gaunamų kerpant preprotoksiną signalinės peptidazės kirpimo vietoje ir po

Kex1p, Kex2p peptidazių poveikio [Dignard ir kt., 1991; Meškauskas, Čitavičius, 1992].



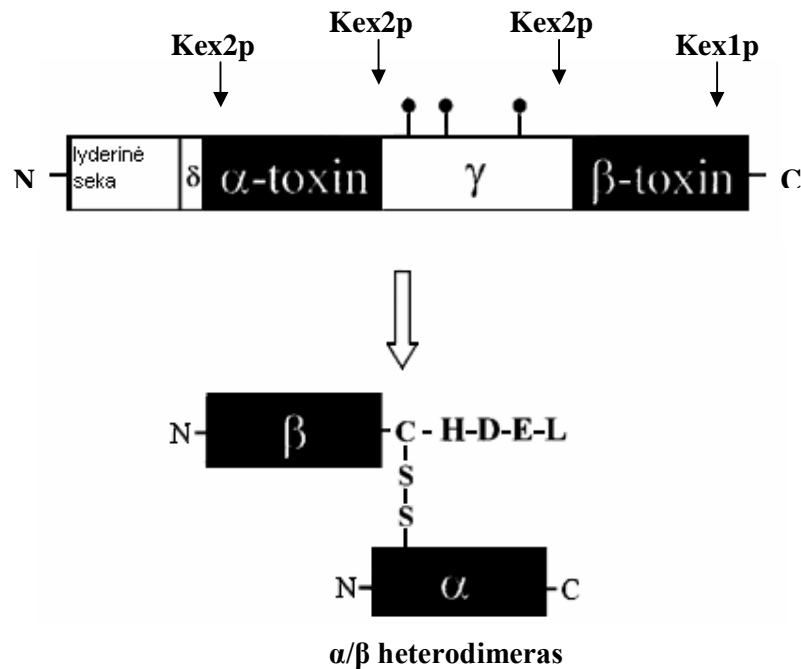
2 pav. K1 ir K2 kilerinių preprotoksinų palyginimas. Parodyti α , β , γ subvienetai, SP – signalinė peptidazė, KEX1 ir KEX2 – endopeptidazės, G – glikozilintų asparagino liekanų vietos (preprotoksino γ sritis) [Dignard ir kt., 1991; Bussey, 1991].

Kex1 ir Kex2 peptidazių poreikis aktyvaus toksino produkcijai tirtas kex1 ir kex2 mutantiniuose kamienuose. Esant abiem mutacijoms, kileriškumo funkcija išnyksta, tačiau imunitetas K2 toksinui lieka nepakitęs [Wickner, 1986].

1.3.6. Kilerinis toksinas K28

K28 kilerinis toksinas atrastas vėliau nei K1 ir K2, tačiau intensyvūs šios kilerinės sistemos tyrimų metu nustatyta toksino struktūra bei veikimo mechanizmas [Marquina ir kt., 2002, Breinig ir kt., 2006]. K28 preprotoksinas, susidedantis iš 345 aminorūgščių, sintetinamas kaip turtingas serino monomerinis baltymas [Schmitt, Tipper, 1995]. Preprotoksinas turi stipriai hidrofobinę signalinę sritį, svarbią toksino pernašai, bei α ir β subvienetus (10.5 kDa ir 11 kDa), atskirtus N-glikozilina γ sritimi [Schmitt, Tipper,

1995] (3 pav.). Mielių K28 toksino pirmtakas turi N galo signalinę seką, reikalingą preprotoksino pernešimui į endoplazminį tinklą. Mielėms yra būdingas potransliacinės baltymų pernašos į endoplazminį tinklą mechanizmas [Riffer ir kt.; Schmitt, Breinig, 2006].



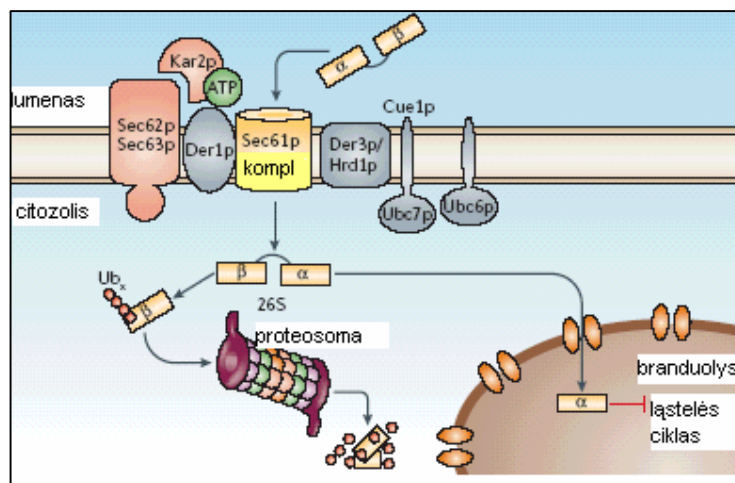
3 pav. K28 kilerinio preprotoksino ir toksino struktūra. Toksinas sekretuojamas heterodimeriniame būvyje, sujungus α ir β subvienetus disulfidiniu tilteliu. α , β , γ – preprotoksino subvienetai; Kex2p, Kex1p – proteazių taikiniai; γ srityje parodytos glikozilinimo vietos [Riffer ir kt., 2002].

Po preprotoksino transliacijos toksino pirmtakas importuojamas į endoplazminį tinklą Ssa1p-Ssa4p šaperonais per Sec61p porų kompleksą. Endoplazminiame tinkle yra pašalinama signalinė (pre-) sritis. Protoksino sulankstymas inicijuojamas ir katalizuojamas Hsp70 šaperonų ir baltymų BiP (Kar2p), kalneksino (Cne1p) poveikiu, γ seka yra glikozilinama ir vienintelis disulfidinis tiltelis tarp α ir β subvienetų yra suformuojamas, dalyvaujant Pdi1p-disulfidizomerazei. Goldžio aparate endopeptidazės Kex1 ir Kex2p pašalina pro-regioną ir γ seką. Sekretorinėje pūslelėje visiškai suformuojamas toksino K28 α/β dimeras, kuris sekretuojamas per ląstelės membraną ir sienelę. HDELRL (HisAspGluLeuArg) – signalo seka -

„adresas“, nukreipiantis baltymą į endoplazminį tinklą ir Goldžio aparatą; HDEL (HisAspGluLeu) – „adresas" – į sekretorinę pūslelę. Signalo sekas pašalina signalo peptidazės [Schmitt, Breinig, 2006].

K28 toksinas yra vienintelis *S. cerevisiae* kilerinių toksinų pavyzdys, kuris patenka į ląstelę endocitozės būdu jam susirišus su receptoriais, esančiais jautrios ląstelės paviršiuje.

Citozolyje siunčiamas signalas branduoliui. K28 eksportas iš endoplazminio tinklo į citozolį vyksta tarpininkaujant Sec61p kompleksui (translokonui) – pagrindiniam transporto kanalui endoplazminio tinklo membranoje ir kituose eukariotuose. Sec61p dalyvauja eksportuojant ir pašalinant neteisingai sulankstytus baltymus iš sekrecijos kelio ir jų proteosominėje degradacijoje citozolyje. Toksino pernaša per Sec61p translokoną vyksta padedant endoplazminio tinklo Kar2p šaperonui. Citozolyje β subvienetas yra ubikvitilinas ir proteosomiškai degraduojamas, o α subvienetas patenka į branduolį, kur negrįžtamai blokuoja DNR sintezę [Marquina ir kt., 2002; Schmitt, Breinig, 2006] (4 pav.).



4 pav. Mielių *S. cerevisiae* K28 toksino pernešimas iš endoplazminio tinklo į citozolį ir žudantis poveikis mielių branduolyje [Marquina ir kt., 2002].

Citotoksinis K28 tipo toksino α subvienetas yra 10,5 kDa, todėl jis gali patekti į branduolį pasyvios difuzijos būdu, nereikalaudamas aktyvaus importo mechanizmo. Jei α subvienetas papildomai modifikuotas,

toksiškumas *in vivo* yra žymiai padidėjęs, ir tai lemia greitesnį importą į branduolį, tarpininkaujant šeimininko ląstelės α/β importinams. Branduolyje K28 α specifiskai sąveikauja su šeimininko ląstelės baltymais, kurie yra būtini eukariotų ląstelių ciklo kontrolei ir DNR sintezės iniciacijai ankstyvoje S fazėje. Todėl K28 toksino veikimas nukreiptas į būtinus ir evoliuciškai konservatyvius šeimininko baltymus su pagrindinėmis funkcijomis, atsparumo mechanizmai pagrįsti būtinomis chromosominėmis mutacijomis, neįprastomis *in vivo*. Taigi K28 toksinas formuoja „protingą“ strategiją efektyviai prasiskverbti į ląstelę ir ją nužudyti [Marquina ir kt., 2002; Schmitt, Breinig, 2006].

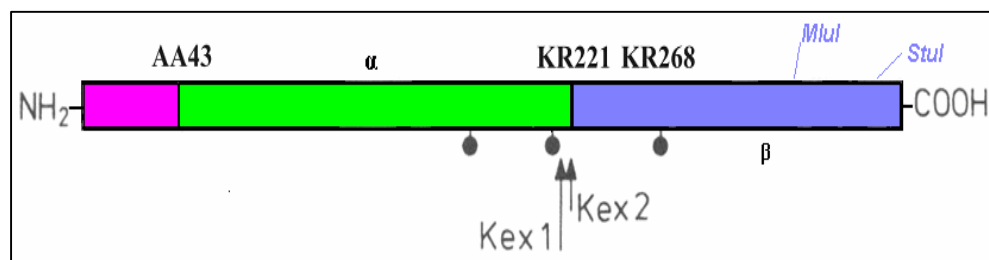
Mielių *S. cerevisiae* kilerinė sistema yra plačiausiai ištirta ir kelia didelį susidomėjimą. Pagal kilerinį fenotipą koduojančius genetinius determinantus šiuo metu išskirtas dar vienas mielių *S. cerevisiae* kilerinis toksinas Klus. M dgRNR dydis siekia nuo 2,1 iki 2,3 kb. Buvo įrodyta, kad toksino Klus M dgRNR seka nėra homologiška su M1, M2 bei M28 sekomis, nors ir turi daug panašumų. Mielių *S. cerevisiae* toksino Klus sekrecijai taip pat reikalingos Kex1 ir Kex2 peptidazės [Rodriguez–Cousino ir kt., 2011].

1.3.7. Mielių ląstelių imuniškumas kileriniams toksinams

Kileriniai mielių kamienai yra atsparūs savo produkuojamiems toksinams. *S. cerevisiae* kileriškumą ir imunitetą nulemia M dgRNR ir nuo jų sintetintos cDNR [Lolle ir kt., 1984; Dignard ir kt., 1991; Meškauskas, Čitavičius, 1992]. Atliekant K1 preprotoksino geno sait–specifinę mutagenezę buvo įrodyta, kad visas preprotoksinas yra atsakingas už imuniškumo palaikymą. Atsparumas sumažėja, esant lyderinio peptido delecijai arba pakeitus pirmas keturias aminorūgštis į Met-Gly-Asp-Glu. Nustatyta, kad už imunitetą atsakinga centrinė hidrofobinė α subvieneto dalis, bei N-galinė γ subvieneto sritis [Zhu, Bussey, 1989]. Bone (Boone) su mokslininkais teigia, kad K1 preprotoksinas susiriša su membranos receptoriumi stipriau nei

toksinas ir formuoja stabilų kompleksą [Boone ir kt., 1986]. Tokiu būdu jis trukdo toksino prisirišimui ir veikimui bei apsaugo ląstelę nuo žuvimo. Kiti mokslininkai paskelbė alternatyvų imuniškumo susidarymo modelį. Yra žinoma, kad K1 kilerinis toksinas gali aktyvuoti TOK1 kanalus. Veikdamas iš išorės jis pažeidžia K^+ jonų homeostazę, tačiau, veikdamas iš vidaus, jis supresuoja išorinio toksino veikimą. Tokiu būdu sekretuojamas toksinas, aktyvuodamas TOK1 kanalus, žudo ląsteles, o viduląstelinis sąlygoja imuniškumą [Sesti ir kt., 2001].

Atlikus K2 preprotoksino geno mutacinę analizę nustatyta, kad 38 padėtyje esančio Thr pakeitimas į Lys bei dvi aminorūgštis (Phe ir Pro) įterpus tarp 38 ir 39 aminorūgščių, yra prarandamas imuniškumas savam toksinui, o kileriškumas sumažėja [Dignard ir kt., 1991]. Remiantis Botanikos instituto Genetikos laboratorijoje gautais tyrimų rezultatais, galima teigti, kad pažeidimai K2 preprotoksino geno tiek lyderinėje sekoje, tiek α ir β subvienetuose sąlygoja kileriškumo ir imuniteto praradimą. Vadinasi, visas preprotoksinas yra svarbus imuniteto funkcijos formavimui [Gulbinienė ir kt., 2001]. K2 geno mutacijos β subvieneto C-gale lemia pilną imuniteto praradimą. Todėl manoma, kad K2 kilerinio preprotoksino β subvieneto C-galinės sritys, skirtingai nuo K1 preprotoksino β subvieneto, yra svarbios užtikrinant ląstelių imunitetą. Pastarosios K2 preprotoksino sritys taip pat dalyvauja užtikrinant toksiškumą – mutacijos (MluI ir StuI restriktazėmis) visiškai eliminuoja poveikį jautrioms ląstelėms (5 pav.) [Gulbinienė, 2002].



5 pav. K2 preprotoksino geno mutacijos. MluI ir StuI restrikcijos endonukleazių taikiniai [Gulbinienė, 2002].

K2 kilerinio preprotoksino geno raiška nėra visiškai priklausoma nuo reguliuojančių promotoriaus sekų – promotoriaus atžvilgiu atvirksčiai orientuotas preprotoksino genas, lyginant su wt genu, užtikrina didelį kilerinio toksino aktyvumą. Jo aktyvumas priklauso nuo jį supančių sekų, o pašalinus ADH1 promotorių, toksino aktyvumas sudaro 66 % [Gulbinienė ir kt., 2004].

Apibendrinus tiek K1, tiek K2 bei K28 kilerinių sistemų tyrimų duomenis, galima teigti, kad visų jų imuniteto formavimo mechanizmai yra panašūs [Magliani ir kt., 1997].

Genetikos laboratorijoje aptiktas naujomis kilerinėmis savybėmis pasižymintis mielių *S. cerevisiae* kamienas Kx. Nustatytas unikalus naujai atrasto kamieno bruožas – sugebėjimas stabdyti visų tipų kilerių veikimą. Remiantis tyrimų duomenimis, šį fenomeną sąlygojantis baltymas sietinas su sekretuojamu kileriniu toksinu ir yra pavadintas X faktoriumi [Melvydas ir kt., 2007].

Literatūroje neaptikta duomenų apie mieles, kurios produkuotų antitoksinus savo rūšies ar kitų rūšių kileriams. Turimais duomenimis, tokius junginius produkuoja tik kai kurios bakterijos, tačiau tai nėra plačiai paplitęs reiškinys [Kristoffersen ir kt., 2000].

1.4. Toksinus produkuojančių organizmų panaudojimas

[vairių rūšių mielės ir bakterijos gali būti panaudotos kaip apsauginė priemonė nuo maisto gedimo pramonėje, medicinoje, genų inžinerijoje ir t. t. Mielės *S. cerevisiae* yra vienas plačiausiai naudojamų tyrimo objektų ir komercinių mikroorganizmų. Jos naudojamos maisto pramonėje, farmacijoje, medicinoje. Plačiausiai mielės naudojamos etilo spirito gamyboje. Mielės, pasižyminčios kilerinėmis savybėmis, turi privalumų konkurencinėje kovoje. *S. cerevisiae* auga ant uogų ir vaisių – cukraus turtingose terpėse. Dėl visiško saugumo žmogui, paprasto kultyvavimo, trumpo šių eukariotinių mikroorganizmų generacinio laiko mielės tapo populiariu mokslinių tyrimų objektu [Rumbold ir kt., 2009].

1.4.1. Maisto pramonėje

Mielės su kileriniu fenotipu plačiai naudojamos alkoholinės fermentacijos procesuose, pavyzdžiui, įvairių gėrimų: alaus, sakės (ryžių degtinės), vyno, o pastaruoju metu dar ir cukrinių augalų (cukranendrių) perdirbimui. Daugumoje šių fermentacinių procesų naudojama nepasterizuota terpė, kurioje gali vyrėti laukinių mielių kamienų (pvz., iš žaliavos), išbalansuojančios pradinį užsėjamų mielių kiekį. Šis užteršimas gali lemti fermentacijos greitį, dažniausiai jį mažinti, bloginti vyno kokybę ar mažinti etilo spirito išėigą. Žinoma, kad esant aukštesnei temperatūrai, aukštesniam pH, žemai azoto koncentracijai suintensyvėja aukštesniųjų alkoholių gamyba bei mažėja etanolio išėiga [Comitini ir kt., 2004].

Toksiną produkuojančios mielės sėkmingai naudojamos maisto pramonėje ir konservuotų produktų apsaugai nuo gedimo. Kai kurie *Kluyveromyces* mielių kamienai sekretuoja toksiną esant dideliame druskų kiekiui terpėje, dėl ko gali būti apsaugomas sūdytas maistas nuo gedimo. *K. lactis* kilerinės mielės inhibuoja laukinių mielių, gadinančių silosą, augimą [Colussi ir kt., 2005]. Nustatyta, kad apsaugoti maistą ir pašarus nuo gedimo taip pat gali ir *Williopsis mrakii* produkuojamas toksinas. Platus šio toksino biologinio aktyvumo spektras leidžia jį panaudoti tiek jogurto gamybai, tiek pašarinio siloso saugojimui. *W. mrakii*, *Pichia anomala*, *P. guillirmondii* bei *S. cerevisiae* kilerinės mielės plačiai naudojamos maisto apsaugai nuo pelėsinų grybų mažai vėdinamose, drėgnose patalpose [Selvakumar ir kt., 2006]. Kilerinį toksiną produkuojančios mielės *W. saturnus* gali būti panaudotos sūrio gamybai [Liu, Tsao, 2009]. Į maisto produktus, alkoholinius, nealkoholinius gėrimus ar kitokius gaminius dedama konservantų. Tai medžiagos, stabdančios mikroorganizmų gyvybinę veiklą, veikiančios normalią žarnyno mikroflorą, todėl jos potencialiai gali pakenkti žmonėms ar gyvūnams. Aktualu yra naudoti natūralias medžiagas, kaip apsauginę priemonę nuo produktų gedimo. Dėl savo savybių mielės *W. saturnus* gali pakeisti net tris maisto pramonėje naudojamus konservantus: E202 (kalio sorbatas), E214 (etilparahidroksibenzoatas), E224 (kalio metadisulfitas) [Goretti ir kt., 2009].

Vyno gamyboje naudojamos pienarūgštės bakterijos – *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* genčių; actarūgštės bakterijos – *Gluconobacter*, *Acetobacter* genčių; pelėsiniai grybai – *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ucinula* genčių. Bakterijos iš *Clostridium* ir *Enterobacter* genčių kaip šalutinį produktą išskiria etilo alkoholi (susidaro redukuojantis Acetil-CoA) [Esteve-Zarzoso ir kt.,1998].

Viena iš pagrindinių duonos gedimo priežasčių yra pelijimas. Mikromicetų gaminami mikotoksinai gali sukelti vartotojų sveikatos problemų. Mikrobiologinis gedimas pasireiškia ypač šiltuoju metų laiku ir dėl to susidaro didelių gamybinių nuostolių. Pagrindiniai duonos kepiniuose aptinkami mikromicetai priklauso šioms gentims: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*. Pastaruoju metu tarptautinėje praktikoje vis didesnę susidomėjimą kelia cheminių konservantų pakeitimas mikroorganizmais, pvz. pieno rūgšties bakterijomis (PRB), lemiančiomis konservuojančiu efektu pasižyminčių metabolitų susidarymą. *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus hilgardii* pieno rūgšties bakterijos pasižymi antimikrobiniu efektu, kuris iš esmės siejamas su organinių rūgščių, tokių kaip pieno ir acto rūgštys bei kitų metabolitų susidarymu. Pastaruoju metu atkreiptas dėmesys į pieno rūgšties bakterijų kultūras, gaminančias bakteriocinus, pasižyminčius antimikrobinėmis savybėmis. Tai bakterijų sintetiniai ir į mitybos terpę išskiriami baltymai, kurie pasižymi antibakteriniu poveikiu giminingsiems producentui bakterijų rūšims [Narbutaitė ir kt., 2007]. Nustatytas *Lactobacillus paracollinoides* bei *Weissella paramessenteroides* izoliuotus iš šviežių vaisių – daržovių poveikis prieš *Fusarium graminearum*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* ir *Sclerotinia minor* [Sathe ir kt., 2007].

1.4.2. Biotechnologijoje

Biotechnologija – tai gyvųjų organizmų ir biologinių procesų naudojimas gamyboje. Šis terminas plačiai pradėtas vartoti praėjusio šimtmečio septintajame dešimtmetyje, nors pačios biotechnologijos, pagrįstos mikroorganizmų naudojimu, jau seniai buvo taikomos kai kuriose ūkio šakose ir namų ūkyje, pavyzdžiui, duonos, vyno, alaus gamyboje, pienininkystėje, odos apdorojimo srityse ir panašiai. Plačiausiai aplinkos valymo biotechnologijose naudojamos *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Yarovvia*, *Bacillus* genčių bakterijos. Šiuo metu gaminami biopreparatai, naudojant vieną ar kelis mikroorganizmus. Naftai valyti Rusijoje plačiai naudojamo preparato „Devoroil“ sudėtyje yra naftą oksiduojančių mikroorganizmų koncorciumas iš *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Yarovvia* sp. Europoje plačiai propaguojamas „Biodex-50“ preparatas yra kelių štamų darinys. Lietuvoje prieš 7 metus sukurtas biopreparatas „GVT“ taip pat daugiakomponentis, ardantis ne tik lengvuosius, bet ir sunkiuosius angliavandenilius [Liužinas, Paunksnytė, 2008]. Gamybinis *Bacillus subtilis* štamas Ch-13 produkuoja įvairius fermentus, antigrybinius metabolitus, sugeba stimuliuoti augalų auginimą (sintetina fitohormonus). Biopreparatu inokuliuoti pomidorai 2,5 karto mažiau užsikrečia *Fusarium oxysporum* fitopatogenu. Gyvendamas ant šaknų štamas Ch-13 kelia augalų imunitetą. Bakterijos gerina šakniaplaukių vystymąsį ir jų sugebėjimą įsisavinti azoto, fosforo bei kalio mineralines medžiagas. Dėl to galima 30 – 40 % sumažinti mineralinių medžiagų dozę dirvožemyje [Chebotar ir kt., 2009]. *Bacillus subtilis* biopreparatai „2/10“ bei „63z“ taip pat naudojami prieš fitopatogenus ir nėra keksmingi augalams bei šiltakraujams gyvūnams [Lapa, Reva, 2005]. Čekiški biopreparatai „Supresivit“, „Ibefungin“, „Poliversum“, kurių pagrindą sudaro *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* bei *Pythium oligandrum* mikroorganizmai atitinkamai, taikomi sėklų apdirbimui prieš fitopatogenus *Fusarium*, *Drechsiera*, *Pseudocercospora*, *Gaeumannomyces*,

Rhynchosporium [Hysek ir kt., 2005]. Norint, kad biopreparatų naudojimas gruntui ir dirvožemiui valyti būtų efektyvus, juos reikia jungti į vieną kompleksą reguliuojant pH, aeraciją, biogeninį medžiagų įterpimą, drėgmės kiekį ir temperatūrą. Priklausomai nuo užteršimo tipo (ar sunkieji, ar lengvieji angliavandeniliai, ar kitos cheminės medžiagos) ir įvertinus teršiančių medžiagų galimą biodegradacijos intensyvumą laike bei meteorologines vietas sąlygas ir jų kaitą, parenkamas biopreparatas ir, jei yra galimybė, pagaminama jo modifikacija konkrečiam atvejui [Liužinas, Paunksnytė, 2008].

1.4.3. Etilo alkoholio gamyboje

Bioetanolio gamyba tampa vis svarbesnė, nes naftos išteklių vis mažėja bei nuolat kyla degalų kainos. Gaminant bioetanolį siekiama sumažinti aplinkos taršą ir mažinti naftos produktų naudojimą [Pretorius ir kt., 2003]. Mielės *S. cerevisiae* yra plačiai naudojamos bioetanolio gamyboje [Argueso ir kt., 2009]. Taip pat siūloma naudoti ir kt. rūšių mieles, pavyzdžiui, *Pichia* [Canilha ir kt., 2009], *Kluyveromyces* [Tamura ir kt., 2006]. Etanolio fermentacijoje taip pat naudojami bazidiomicetai, turintys tinkamų savybių tam procesui įvykdyti (pvz. *Flammulina velutipes*) [Mizuno ir kt., 2009].

Etilo alkoholis – tai mielių gyvybinės veiklos produktas. Plačiausiai maistiniam etilo alkoholiui gauti naudojamos krakmolingos (grūdai, bulvės) ir cukringos medžiagos (melasa, defektiniai runkeliai ir kt.). Etilo alkoholio mielės yra paviršinio rūgimo, gali rauginti gliukozę, fruktozę, manozę, galaktozę, sacharozę, maltozę ir rafinozę, tačiau nesugeba metabolizuoti ribozės, ksilozės, arabinozės, celiuliozės ir laktozės.

Daugumai alkoholinio fermentavimo procesų naudojamos nepasterizuotos terpės, kurios gali būti užterštos laukinių mielių kamienais, o tai gali lemti produkto kokybę ir bloginti etanolio išėigą. Etilo alkoholio išėiga mažina ir aukšta temperatūra, pH, žema azoto koncentracija. Dėl šių priežasčių padidėja aukštesniųjų alkoholių gamyba. Kad būtų išvengta tokio neigiamo

efekto ir įsivyratų pageidaujamos mielių rūšys, spirito gamyboje naudojamos mielės, pasižyminčios kileriniu aktyvumu [Ceccato – Antonini ir kt., 2004].

Siekiant įvertinti mielių padermes, tinkamas pramoniniam naudojimui, reikia iširti jų specifines, fiziologines ypatybes. Pavyzdžiui, etanolio tolerancija, cukraus tolerancija ir invertazių veikla yra vienos iš svarbių padermių ypatybių, naudojant jas pramoninėje etanolio gamyboje [Osho, 2005]. Mielė fermentiniam aktyvumui turi įtakos didelės cukraus ir susidariusio alkoholio koncentracijos. Yra žinoma, kaip keičiant maistinę sudėtį išlaikyti mieles aktyvias ir padidinti etanolio koncentraciją [Siler, Morris, 1996].

Brazilijoje, naudojant mieles, biokurui skirtas etanolis gaminamas iš cukranendrių [Hamidimotlagh, Nahvi, 2007], Lietuvoje – iš grūdų. Pasaulyje 93 % etanolio pagaminama fermentacijos būdu ir tik 7 % – sintetiniu būdu iš naftos produktų [Chandel ir kt., 2009].

1.4.4. Medicinoje

Įvairių rūšių bakterijos ir grybai gyvena ant žmonių odos ir nėra kenksmingi organizmui, t. y. sudaro normalią mikroflorą. Tačiau kai kurios infekcijos gali būti labai pavojingos žmonėms ir gyvūnams. Grybelinės kilmės išbėrimai dažnai yra painiojami su psoriaze arba egzema. Grybeliniais organizmais užkrečiamas paviršinis odos sluoksnis arba plaukų folikulės. Viena pagrindinių odos funkcijų – apsauginė arba barjerinė. Kai pažeidžiamas barjeras, vyksta ligų plitimas. Išlieka aktualu ieškoti naujų natūralių priemonių nuo grybelinių ligų. Iš dirvožemio išskirti *B. cereus* kamienai pasižymi antigrybeliniu aktyvumu prieš *S. cerevisiae* ir *Candida albicans* grybus [Qazi ir kt., 2009].

Kileriniams mielių kamienams skiriamas didelis dėmesys medicinoje – patogeninių mielių tyrimuose bei kuriant naujos kartos vakcinas ir antibiotikus. Daugeliu atvejų mielinės infekcijos siejamos su įvairiomis ligomis: piktybine neoplazija, hematologinėmis ligomis, daugybine skleroze, įgimtomis širdies

ligomis bei galimomis komplikacijomis po imunosupresyvinės terapijos arba atlikus inkstų persodinimą [Magliani ir kt., 1997].

Pastebėta, kad mikroorganizmų produkuojami toksinai gali reguliuoti gyvūnų virškinamojo trakto bei burnos ertmės mikrobinę dinamiką. Jau seniai gastroenterologijoje taikomi „gerųjų bakterijų“ įvedimo per maistą metodai, siekiant išspręsti daugelį mikroorganizmų disbalanso sąlygotų funkcinių sutrikimų. Domimasi ir kilerinėmis mielėmis, galinčiomis atlikti svarbų bioreguliacinio vaidmenį. Senokai iširtas gerai žinomas interferono poveikis. Rekombinantinių DNR technologijų panaudojimas leido klonuoto interferono geno ekspresiją tirti mielėse ir bakterijose. Nustatyta, kad jo antivirusinis aktyvumas tiesiogiai susijęs su mielėse esančių dgRNR molekulių buvimu. Aptikta galimybė indukuoti interferono sintezę, panaudojant mielių kilerines dgRNR [Pestka ir kt., 1987; Watanabe ir kt., 1988; Magliani ir kt., 1997]. Mielių produkuojamas kilerinis toksinas taip pat gali atlikti specifinio markerio vaidmenį. Pigi ir greita biotipavimo technika, naudojant mielių kilerines sistemas kartu su jautrumo cheminiams preparatams tyrimais, galėtų būti reikšminga analizuojant patogeninius mikroorganizmus. Biotipavimo procedūroje galima naudoti kilerinių mielių kamienus arba jau išskirtą toksiną [Polonelli ir kt., 1987; Candido ir kt., 1995; Silva ir kt., 2007].

Pastaruoju metu intensyviai tiriamos kilerinių toksinų antiobiotinės savybės bei galimybė juos panaudoti sisteminėje antigrybelinėje imunoterapijoje. Kileriniai mielių kamienai pasižymi plačiu veikimo spektru, veikiant įvairias *Candida* grybų genties rūšis. Nustatyta, kad kilerinės mielės inhibuoja *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, taip pat *K. lactis* ir *S. cerevisiae* mielių kamienus, išskirtus iš įvairių ligonių audinių ir organų [Sangorin ir kt., 2001; da Silva ir kt., 2006]. Mielių produkuojamas kilerinis toksinas atakuoja mikroorganizmų arba mielių ląstelių paviršiuje esančius taikinius ir tokiu būdu žudo jautrias ląsteles, tačiau neaptikta jokio toksino poveikio aukštesniųjų eukariotų ląstelėms. Šis požymis ypač svarbus siekiant išnaudoti antibiotines kilerinių toksinų savybes, nepažeidžiant žmogaus imuninės sistemos. Rimta problema išlieka kilerinio

toksino, kaip svetimo didelio molekulinio svorio glikoproteino, antigeniškumas. Siekiant neutralizuoti antikūnus ir sustabdyti imuninį atsaką į toksiną, iškelta prielaida apie galimą kilerinio toksino panaudojimą specifinių monokloninių antikūnų gamybai. Tačiau didžiausias pasiekimas – idiotipinių ir antiidiotipinių vakcinų sukūrimas. Nustatyta, kad laboratoriniams gyvūnams įvedus monokloninių antikūnų (susiformavusių prieš kilerinį toksiną) dėl imuninio atsako gaminasi antiidiotipiniai antikūnai – struktūriniai toksino analogai. Pastarieji pasižymi dideliu stabilumu fiziologinėmis sąlygomis (skirtingai nuo kilerinio toksino), o svarbiausia, dėl kilerinių savybių sugeba žudyti jautrias patogeninių mielių ląsteles [Polonelli ir kt., 1991; Snyder ir kt., 1999].

1.4.5. Genų inžinerijoje

Mielių ląstelės yra patogus modelis baltymų brendimo ir sekrecijos mechanizmams tirti. Baltymų sekrecijos kelias mielėse yra panašus į aukštesniųjų organizmų baltymų sekreciją. Naudojant kilerinių virusų nukleotidų sekas, sukonstruoti vektoriai heterologinių baltymų ekspresijai ir produkavimui mielėse. Tokiu būdu išplečiamas mielių kileriškumo spektras, žudant kitų rūšių (pvz., patogenines) mieles. Neatmetama galimybė, kad pavyks gauti ir rekombinantinius kilerinius genus *in vivo* ir *in vitro* turinčius *S. cerevisiae* K2 kilerinio preprotoksino geną ir *K. lactis* genus. Tokiu būdu sujungiamos abiejų sistemų galimybės. Tai ypač aktualu, nes šios dvi mielių rūšys, manoma, mažiausiai patogeniškos. Be to, *K. lactis* preprotoksino geno signalinė seka pritaikyta pramoninių vektorių konstravimui. Pastaruoju metu kileriniai mielių genai bandomi perkelti į augalus, siekiant juos apsaugoti nuo grybelinių ligų [Mehlgarten ir kt., 2007].

Genetiniai virusiniai determinantai ir kiti genai, koduojantys kilerinius toksinus bei imuniškumo faktorius, gali būti genetiškai modifikuojami įterpiant į pradines *S. cerevisiae* mielių kamienų kultūras, taip genų inžinerijos

metodais sukuriant naujus mielių kamienus. Pagrindinė užduotis konstruojant zimocidinius (kilerinėmis savybėmis pasižyminčius) kamienus – sukurti rekombinantinius mielių kamienus, turinčius *S. cerevisiae* dvigubų K1/K2 virusinių kilerinių toksinų determinantus prieš kitas mieles (pvz., *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*) ir kitas bakterijas bei pelėsius. Genų bei ląstelių inžinerijos metodais perkeliant atsparumą sąlygojančius genus iš mikroorganizmų į augalus, kuriami transgeniniai augalai, atsparūs grybiniams ir virusiniams patogenams. Tačiau šiuo atveju labai svarbu įvertinti šeiminko – augalo ir patogeno tarpusavio santykius bei ryšį su supančia aplinka ir įtaką jai [Ira ir kt., 2010].

1.5. Biocidines medžiagas koduojančių genų perkėlimas į augalus

Biocidinių medžiagų ir jas koduojančių genų pritaikymo galimybės yra labai plačios. Perkeliant šias medžiagas koduojančius genus į augalus galima efektyviai apsaugoti pasėlius nuo įvairių grybelinių ligų [Donini ir kt., 2005].

Pasaulyje augalų transformacija ir mielių kilerinės sistemos yra plačiai tiriamos: atliekami tyrimai ne tik su mielių *S. cerevisiae* K1, K2 ir K28 kileriniais toksinais, bet ir su kitų rūšių (pvz., *Pichia membranifaciens*) toksinais, bandant jų genus perkelti į įvairius modelinius augalus (pvz., tabaką, bulves, pomidorus, petunijas ir t. t.), panaudojant skirtingus transformacijos metodus. Tačiau Lietuvoje tokio pobūdžio darbai yra nauji ir vykdomi tik GTC Botanikos instituto Genetikos laboratorijoje.

Sanfordas ir Džonstonas (Sanford ir Johnston) buvo pirmieji mokslininkai, kurie intensyviai tyrinėjo atsparumo mechanizmus prieš augalų patogenus [Sanford, Johnston, 1985]. Vėliau buvo atliekami bandymai transgeniniams augalams suteikti antivirusinio atsparumo, kurio pagrindas būtų virusams atsparių genų ar genomo fragmentų raiška. Daugelis šių bandymų buvo sėkmingi ir tai lėmė virusams atsparių bulvių, pomidorų, tabako ir kitų augalų rūšių sukūrimą [Baulcombe, 1996].

Kilerinius toksinus koduojančių genų įterpimas, raiška ir jų produktų sekrecija yra sudėtingi procesai. Tačiau šiuo metu atsiranda vis daugiau pavyzdžių, kai kilerinių toksinų genai sėkmingai funkcionuoja transgeniniuose augaluose. Pavyzdžiui, išskirti antimikrobiškai veikiantys antikūniai, specifiški *Pichia anomalia* kilerinio faktoriaus fragmentui, sudarytam iš 10 a. r. (atitinkančių *Pichia anomalia* kilerinio toksino aktyvų centrą). Šis toksinas, kaip ir daugelis kilerinių mielių faktorių (KP), turėjo stiprų antimikrobinį aktyvumą prieš žmonių patogenus. Tuo tikslu šis peptidas buvo panaudotas augalų atsparumui patogenams ir buvo tiriamas jo antimikrobinis aktyvumas prieš platų fitopatogeninių bakterijų ir grybų spektrą. Sintetinis kilerinis faktorius turi antimikrobinį aktyvumą *in vitro* prieš *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Botrytis cinerea* ir *Fusarium oxysporum* rūšis. Kilerinio faktoriaus raiška buvo sukelta augaluose, panaudojant bulvės viruso X (PVX) išvestą vektorių. Augalų virusiniai vektoriai yra plačiai naudojami gaunant didelę svetimų baltymų produkciją [Lacorte ir kt., 2010]. KP genas susijungia su viruso apvalkalėlio baltymu ir skleidžia chimerines virusines daleles (CVPs), turinčias heterologinių peptidų [Scholthof ir kt., 1996]. Išgrynintos CVPs pasižymi padidintu antimikrobinio aktyvumu prieš anksčiau minėtus augalų ir žmonių patogenus, tokius kaip *Staphylococcus aureus* ir *Candida albicans*. Rezultatai rodo, kad PVX sistema yra pagrįstai ekonomiškai, greitas ir efektyvus metodas produkuoti ir įvertinti antimikrobinius peptidus augaluose. Be to, mielių kilerinis faktorius yra perspektyvus junginys, kurio genas gali būti įklonuojamas į augalus, suteikiant jiems plataus spektro atsparumą fitopatogenams [Donini ir kt., 2005].

Transgeniniai ryžių pasėliai su *Bacillus thuringiensis* genais, produkuojančiais toksinus, apsaugoti nuo fitopatogenų ir auginami nuo 1996 metų [Yang ir kt., 2011].

Bacillus amyloliquefaciens lipopeptidai pasižymi antigrybeliniu aktyvumu prieš fitopatogeną *Fusarium oxysporum* [Romano ir kt., 2011].

Kitas sėkmingos augalų transformacijos kilerinį baltymą koduojančių konstrukto pavyzdys yra iš *Ustilago maydis* išskirtas kilerinis toksinas KP6.

U. maydis yra kukurūzų grybelinis patogenas. Keletas jo atmainų koduoja polipeptidinius toksinus (KP1, KP4, KP), galinčius žudyti kitas *U. maydis* jautrias atmainas. KP6 toksinas yra visiškai ištirtas ir charakterizuotas. Toksino α ir β domenai yra būtini baltymo aktyvumui [Li ir kt., 1999]. Buvo parodyta, kad vienas iš šių toksinų genų (KP6 toksino), kontroliuojamas žiedinio kopūsto mozaikos viruso promotoriumi, gali būti sintezuojamas transgeniniuose tabako augaluose. Nustatyta, kad iš transgeninių tabako augalų tarpląstelinio skysčio išskirtas KP6 toksinas turi tokias pat α ir β sudedamąsias dalis ir pasižymi identišku aktyvumu ir specifiškumu kaip ir *U. maydis* ląstelių sekretuojamas toksinas. Iš tabako išskirtas β polipeptidas buvo tokio pat dydžio ir su identiškomis N – galinėmis sekomis kaip ir *U. maydis* KP6 β polipeptidas. *U. maydis* ląstelėse KP6 preprotoksino brendime dalyvauja Kex2p proteazė, kuri taip pat yra gyvūnų ir grybų ląstelėse. Ji reikalinga nedidelių sekretuojamų polipeptidinių hormonų ir sekretuojamų toksinų brendimui. Svarbu pastebėti, kad augaluose taip pat aptinkama į Kex2p panaši proteazė, kuri reikalinga KP6 toksinui subręsti [Tao ir kt., 1990]. Galima manyti, kad šio virusinio kilerinio toksino produkcija pasėliuose galėtų sukurti naujus biologinės kontrolės metodus, kurie apsaugotų pasėlius nuo grybelinių patogenų [Kinal ir kt., 1995].

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Mielių *S. cerevisiae* ir bakteriniai kamienai, plazmidiniai vektoriai

Mielių *S. cerevisiae* kamienai:

Kileriniam toksinui jautrus kamienas α '1 (*MAT α* , *leu2 [kil-0]*) [Čitavičius, Inge–Večtomov, 1972];

Standartiniai kamienai:

K7 (*MAT α arg9 [kil-K1]*) [Somers, Bevan, 1969];

DBY4975(*MAT α ade2 his3-200 leu2-3-112 lys2-801 ura3-52 gal+[kil-K1]*) [Leibowitz, Wickner, 1976];

Romanešti K100 (RomK–100) (wt, *HM/HM [kil-K2]*) [Jokantaitė ir kt., 1982];

M437 (wt, *HM/HM [kil-K2]*) [Naumova, Naumov, 1973];

K28 (wt, *HM/HM [kil-K28]*) [Schmitt, Tipper, 1990];

MS300 (*MAT α leu2 ura3-52 [kil-K28]*) [Schmitt, Tipper, 1990];

***E. coli* kamienas:** DH5 α [Woodcock ir kt., 1989];

Klonavimo vektoriai:

pAD4 klonavimo vektorius (gautas iš M. Wigler);

pUC57 klonavimo vektorius (AB „Fermentas“)

pART27 klonavimo vektorius (gautas iš dr. A. Ražanskienės)

2.2. Terpės

YEPD terpė: mielių auginimui [Zakharov ir kt., 1976]

1 % mielių autolizato,

2 % peptono,

2 % gliukozės.

LB terpė (skysta arba agarizuota): *E. coli* ląstelėms auginti (pH 7,0):

[Sambrook ir kt., 1989]

1 % triptono,

0.5 % mielių ekstrakto,

1 % NaCl,

2 % agaro (į agarizuotą terpę).

MD terpė: mielių transformantų atrankai [Sherman ir kt., 1986]

2 % gliukozė,

0.09 % KH_2PO_4 ,

0,023 % K_2HPO_4 ,

0,05 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,

0,01 % NaCl,

0,01 % CaCl_2 ,

1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

MB terpė: kileriškumo ir imuniškumo nustatymui, pH 3,0 – 5,6 [Naumova,

Naumov, 1973]

0,5 % peptono,

0,5 % mielių autolizato,

4 % gliukozės,

1,06 % citrinos rūgšties ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$),

3,53 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Terpės pH reguliuojamas citrat–fosfatiniu buferiu. Nustačius pH, ruošiant agarizuotą terpę, pridedama 0,003 % metileno mėlio ir 2 % agaro.

Kilerinio toksino išskyrimui naudojama skysta MB terpė be metileno mėlio, pH 4,4.

Minimali terpė: naudojama kilerinių mielių kamienų auginimui [Sherman ir kt., 1986]

2 % gliukozės,

0,2 % K_2HPO_4 ,

0,1 % $MgSO_4 \times 7H_2O$,

0,1 % $(NH_4)_2SO_4$,

Į vieną litrą terpės pridedama vitaminų tirpalo:

Vitaminų tirpalas, mg/100 ml:

Biotinas 0,2, tiaminas 20,0, β – alaninas 50,0.

Taip pat atitinkamų aminorūgščių priedai, mg/l:

L – leucinas 30,0, L – histidinas 20,0, adenino sulfatas 20,0, L – metioninas 20,0, uracilas 20,0, L – argininas – HCl 20,0, L – lizinas – HCl 30,0.

2.3. Medžiagos

Rasti bakterijų kamienai	Šaltinis	Augimvietė
Ux	Gudobelės uogos	Vilnius
Tx	Melynių uogos	Vievis
V8	Geltonžiedės sedulos uogos	Ignalina
B9	Bruknių uogos	Ignalina
B18	Pakalnučių uogos	Vievis
KB	Kadagio uogos	Vilniaus rajonas

Rasti mielių kileriniai kamienai	Šaltinis	Augimvietė
20K++	Raudonųjų serbentų uogos	Širvintos
4+	Vyšnių uogos	Rokiškis
IIx31	Putino uogos	Širvintos
III–2	Vynuogių uogos	Šakiai
Spanguolė	Spanguolės	Vilniaus rajonas
K+ob	Obuoliai	Vilnius
1M	Obuoliai	Anykščiai

2.4. Metodai

2.4.1. Mikroorganizmų, augančių spontaniniuose rauguose, klonavimas

Mielės ir kiti mikroorganizmai, esantys spontaniniame rauge, paskleidžiami Petri lėkštelėse ant agarizuotos YEPD terpės iki atskirų kolonijų. Termostatuojama 3 paras 30 °C temperatūroje. Išaugusios atskiros kolonijos, besiskiriančios savo išvaizda, persėjamos į atskiras lėkšteles ant agarizuotos YEPD terpės brūkšniais. Auginama 3 paras 30 °C temperatūroje. Išaugę klonai naudojami tolimesniems tyrimams, saugoma šaldytuve +4 °C temperatūroje [laboratorijos metodika].

2.4.2. Kileriškumo nustatymas

Mielių kilerinis aktyvumas nustatomas pagal testuojamų kamienų sugebėjimą suformuoti lizės zonas ant jautraus kamieno α '1 gazono. Visi eksperimentai buvo atlikti naudojant pH 3,0; pH 3,6; pH 4,0; pH 4,8; pH 5,2; pH 5,6 MB terpes.

Į Petri lėkšteles plonu sluoksniu išpilstoma MB terpė, tokiu būdu suformuojamas pagrindas, naudojamas kaip papildomų maistinių medžiagų šaltinis bei išlyginantis lėkštelių paviršių. Išdžiūvus apatiniam sluoksniui, į 10 ml išlydytos ir iki 45 °C temperatūros atvėsintos MB terpės pridedama jautrių mielių ląstelių suspensijos iki $\sim 10^6$ ląstelių gazonui. Terpė užpilama ant paruoštų lėkštelių su apatiniu agaro sluoksniu. Sustingus viršutiniame agaro sluoksniui, spausdinamos arba mikrobiologine kilpele užsėjamos testuojamų kultūrų kolonijos. Lėkštelės 3 paras inkubuojamos 26 °C temperatūroje. Aplink kolonijas, išskiriančias kilerinį toksiną, šiam toksinui jautraus kamieno gazonas neišauga, todėl susidaro skaidrios lizės zonos [Somers, Bevan, 1969; Naumova, Naumov, 1973].

2.4.3. Mielių imuniškumo kileriniam toksinui įvertinimas

Standartiniai testeriniai mielių kamienai brūkšneliais pasėjami ant YEPD terpės ir auginami 2 paras 30 °C temperatūroje. Lėkštelės su $\sim 1 \times 10^6$ ląst./ml tankio giluminiu gazonu paruošiamos, kaip aprašyta 2.5.2 skyriuje, tik vietoje jautraus *S. cerevisiae* kamieno ląstelių suspensijos naudojamos testuojamos kultūros ląstelės. Ant šių lėkštelių nuo YEPD terpės perspausdinami arba mikrobiologine kilpele pasėjami testeriniai kileriai: K7, DBY4975 – K1 tipo, Romanešti–K100, M437 – K2 tipo, 28, MS300 – K28 tipo kileriai. Lėkštelės 3 paras inkubuojamos 26 °C temperatūroje. Aplink tiriamą kamieną susidariusios lizės zonos rodo tiriamų mielių jautrumą šio tipo kileriniam toksinui: lizės zonos nebuvimas – imuniškumą [Naumova, Naumov, 1973].

2.4.4. Kilerinio toksino išskyrimas

Kilerinį toksiną produkuojantis mielių kamienas užsėjamas į 5 ml skystos MB terpės (be metileno mėlio, pH 4,4) ir inkubuojama per naktį 18 – 20 °C temperatūroje be aeracijos. 2 ml naktinės kultūros, sulyginus pagal optinį tankį, perkeliama į 100 ml skystos MB terpės ir inkubuojama 4 paras 18 – 20 °C temperatūroje. Kultūra centrifuguojama 10 min. 5 000 rpm. Supernatantas nufiltruojamas per PVDF membraną (porų dydis 0,22 μm) ir naudojamas kilerinio toksino aktyvumo nustatymui [Zhu, Bussey, 1991].

2.4.5. Kilerinio toksino aktyvumo nustatymas

Kilerinio toksino aktyvumo tyrimuose naudojamos Petri lėkštelės su užpiltu jautraus kamieno gazonu (lėkštelės paruošiamos kaip aprašyta 2.5.2. skyriuje, terpės pH 4,4). Pirminiam nustatymui filtruoti mėginiai užnešami lašais (po 50 μl) ir po 4 parų inkubacijos 26 °C temperatūroje stebimos

susidariusios lizės zonos ant jautraus visų tipų kileriams α' 1 kamieno gazono. Matuojamas lizės zonos dydis ir apskaičiuojamas kilerinio toksino aktyvumas procentais, lyginant su laukinio K2 kilerinio kamieno M437 formuojama zona [Zhu, Bussey, 1991].

2.4.6. Plazmidžių konstravimas ir analizė

2.4.6.1. DNR karpymas restrikcijos nukleazėmis

Buferiniai tirpalai bei inkubacijos temperatūra buvo parenkami pagal „Thermo Fisher Scientific“ rekomendacijas. 1 μ g DNR sukarpymui buvo imama 10 restrikcijos endonukleazės aktyvumo vienetų. Mišinys inkubuojamas 1 val. [Maniatis ir kt., 1982, Sambrook ir kt., 1989].

2.4.6.2. DNR viengrandžių galų užbukinimas

Po karpymo restrikcijos endonukleazėmis gauti viengrandžiai DNR galai buvo pervedami į viengrandžius panaudojant *E. coli* DNR polimerazės I Klenow fragmento katalizuojamą reakciją. Reakcija vykdoma G+, R+, Y+, O+, B+ buferiuose 37 °C temperatūroje 30 min., pridėjus dNTP iki 50 μ M galutinės koncentracijos ir nutraukiama inkubuojant mišinį 15 min. 65 °C temperatūroje [Maniatis ir kt., 1982, Sambrook ir kt., 1989].

2.4.6.3. 5' – galinių fosfatų pašalinimas

Buvo naudojama šarminė fosfatazė (CIAP). Reakcija buvo vykdoma CIAP buferyje 30 min. 37 °C temperatūroje, pridedant 0,1 vnt. fermento/1 μ g DNR. Po reakcijos DNR deproteinizuojama ir išsodinama [Maniatis ir kt., 1982, Sambrook ir kt., 1989].

2.4.6.4. DNR ligavimas

DNR ligavimo reakcija buvo vykdoma ligavimo buferyje 1 val. kambario temperatūroje pridėjus 1 vnt. T4 DNR ligazės/1µg liguojamos DNR. Vektoriaus ir DNR fragmento molekulių santykiai ligavimo mišinyje nuo 1:1 iki 1:5. Įvykus reakcijai, ligavimo mišiniu transformuojamos kompetentinės *E. coli* ląstelės [Maniatis ir kt., 1982, Sambrook ir kt., 1989].

2.4.7. Bakterijų *E. coli* transformacija

I. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas: *E. coli* recipientinio kamieno *DH5α* ląstelės užsėjamos į mėgintuvėlį su 5 ml skystos LB terpės. Inkubuojama per naktį 37 °C termostate. 1 ml naktinės *E. coli* kultūros užsėjama į 100ml skystos LB terpės. Inkubuojama purtyklėje (200 aps./min.) 2 – 4 val. 37°C temperatūroje, kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 5×10^7 ląst./ml ($D_{550} = 0,4 - 0,6$). Visos tolesnės procedūros atliekamos ledo vonioje. Terpė su bakterijomis atšaldoma lede (~10 min.). Centrifuguojama 3 000 rpm greičiu 5 min. Ląstelės 2 kartus plaunamos 100 ml iki 0 °C atšaldyto A tirpalo, centrifuguojama 3000 rpm greičiu 5 min. Ląstelės suspenduojamos 50 ml iki 0 °C atšaldyto B tirpalo ir inkubuojamos ledo vonioje 40 – 60 min. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Ląstelės suspenduojamos 5 ml iki 0 °C atšaldyto B tirpalo. Gauta kompetentinių ląstelių suspensija po 250 µl paskirstoma į atšaldytus *Eppendorf* mėgintuvėlius. Paruoštą kompetentinę kultūrą galima laikyti 4 °C temperatūroje 12 – 24 val. Ilgesniam laikymui užšaldoma –70 °C, pridėjus iki 20 % glicerino.

II. Transformacija: į 100 – 200 µl kompetentinių ląstelių suspensijos pridedama 0,05 – 0,1 µg DNR (5 – 20 µl tūryje). Mišinys inkubuojamas ledo vonioje 30 – 60 min. Mėgintuvėliai 2 min. perkeliama į 42 °C vandens vonią. Po temperatūrinio šoko mėgintuvėliai 1 min. atšaldomi ledo vonioje. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 1ml skystos LB terpės ir inkubuojama 1

val. 37 °C termostate. Ląstelės surenkamos centrifuguojant ir pasėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilino priedu. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje per naktį. Transformantai atrenkami pagal atsparumą ampicilinui, tikrinami išskirtą plazmidinę DNR karpant restriktazėmis [Sambrook ir kt., 1989].

2.4.8. Mielių *S. cerevisiae* transformacija

I. Kompetentinių *S. cerevisiae* ląstelių paruošimas: į 5 ml skystos YEPD terpės užsėjama recipientinio mielių kamieno kolonija ir inkubuojama per naktį 30 °C temperatūroje termostate. 1ml naktinės kultūros užsėjamas į 100 ml skystos YEPD terpės. Inkubuojama purtant (200 aps./min.) 2 – 4 val. 30 °C, kol ląstelių kultūros optinis tankis (bangos ilgis 600 nm) pasiekia 0,5 – 1 O. V. Kultūra atšaldoma, ląstelės nusodinamos centrifuguojant 3 000 rpm greičiu 2 – 3 min. ir plaunamos 50 ml TE buferio.

Ląstelės plaunamos 50 ml TE/LiCl tirpalo, nucentrifuguojamos, resuspenduojamos 50 ml TE/LiCl. Inkubuojama 30 – 60 min. 30 °C temperatūroje purtant 150 aps./min. Centrifuguojama 7 000 rpm greičiu 10 min. Ląstelės suspenduojamos 1ml TE/LiCl tirpalo. Taip paruoštą kompetentinių ląstelių kultūrą galima laikyti 4 °C temperatūroje 12 – 24 val.

II. Transformacija: į 100 µl kompetentinių ląstelių kultūros pridedama 1 – 2 µg plazmidinės DNR (5 – 10 µl tūryje) ir 7 µl 96 % etilo alkoholio. Inkubuojama 30 min. 30 °C temperatūroje purtant 150 aps./min. Pridedama 2 tūriai 50% polietilenglikolio 4000/TE. Inkubuojama 60 min. 30 °C temperatūroje termostate. Mėgintuvėliai 5 min. perkeliama į 42 °C temperatūros vandens vonią. Mėgintuvėliai atvėsunami iki kambario temperatūros, užpilama 1 ml sterilus distiliuoto vandens ir centrifuguojama 15000 rpm greičiu 1 min. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 100 µl YEPD terpės. Pusė turimos suspensijos pasėjama ant selektyvios agarizuotos MD terpės. Auginama 30 °C temperatūroje 5 – 7 paras. Likusi

suspensija užpilama 1ml skystos YEPD terpės, inkubuojama 30 °C temperatūroje per naktį ir pasėjama ant selektyvios agarizuotos MD terpės [Ito ir kt., 1983].

2.4.9. Plazmidinės DNR išskyrimas iš bakterijų *E. coli*

Bakterijų kolonija, turinti reikiamą plazmidę, užsėjama į 50 ml LB terpę su ampicilino priedu, inkubuojama ~ 18 – 20 val. 37 °C temperatūroje purtant. Terpė atšaldoma, biomasė surenkama centrifuguojant 9 000 rpm greičiu 10 min. Biomasė 2 kartus plaunama 30 ml STE buferinio tirpalo, centrifuguojama 9 000 rpm greičiu 10 min. Biomasė suspenduojama 6 ml STE buferio. Pridedama 12 ml NaOH/SDS tirpalo, švelniai sumaišoma ir 5 min. inkubuojama kambario temperatūroje. Pridedama 9 ml NaAc (pH 4,8) tirpalo, atsargiai suplakama, 20 min. inkubuojama ledo vonioje, centrifuguojama 10 000 rpm 15 min. Supernatantas surenkamas į naują mėgintuvėlį, pridedama 0,7 – 0,8 tūrio izopropanolio, 5 min. inkubuojama kambario temperatūroje, centrifuguojama 10 000 rpm 15 min. Nuosėdos plaunamos etilo alkoholiu (70 %), išdžiovinamos 37 °C temperatūroje, ištirpinamos 5 ml TE buferio. RNR pašalinimui į tirpalą pridedama 1 tūris 10 M LiCl tirpalo, 20 min. inkubuojama –70 °C temperatūroje, centrifuguojama 10 000 rpm greičiu 15 min. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį, plazmidinė DNR išsodinama pridedant lygų tūrį izopropanolio, kaip aprašyta anksčiau. Nuosėdos ištirpinamos 1 ml dejonizuoto vandens.

Maži plazmidinės DNR kiekiai išskirti pagal šią metodiką: tiriami bakterijų kolonija suspenduojama 40 µl TE buferio. Pridedama 80 µl NaOH/SDS tirpalo, švelniai sumaišoma. Pridedama 60 µl NaAc tirpalo, sumaišoma. Pridedama 180 µl chloroformo – izoamilo alkoholio mišinio (24:1), suplakama, centrifuguojama 10 min. Vandens fazė surenkama į naują mėgintuvėlį, pridedamas lygus tūris (~180 µl) izopropanolio, sumaišoma, centrifuguojama 15 min. Nuosėdos plaunamos 70 % etilo alkoholio,

išdžiovinamos 37 °C temperatūroje, ištirpinamos dejonizuotame vandenyje (50 – 100 µl) [Sambrook ir kt., 1989].

2.4.10. Plazmidinės DNR išskyrimas iš mielių *S. cerevisiae*

Mielių transformantai auginami YEPD terpėje 48 val. 30 °C temperatūroje. Kultūra centrifuguojama 5 min. 5 000 rpm greičiu, ląstelės 2 kartus praplaunamos TE buferiniu tirpalu. Biomasė suspenduojama 30 ml 0,6 M sorbitolio buferinio tirpalo, inkubuojama 10 min. 30 °C temperatūroje, nucentrifuguojama 5 min. Ląstelės suspenduojamos 20 ml protoplastų buferinio tirpalo ir inkubuojama 2 – 3 val. 30 °C temperatūroje, centrifuguojama 15 min. Protoplastai 3 kartus plaunami 0,6 M sorbitolio/TE, suspenduojami TE buferiniame tirpale ir centrifuguojama. Pridedama 2 tūriai NaOH/SDS tirpalo ir švelniai maišoma kambario temperatūroje 10 min. Pridedama 1,5 tūrio NaAc (pH 4,8), laikoma 20 min. 4 °C temperatūroje, centrifuguojama. Pridedama izopropanolio, sumaišoma, centrifuguojama 10 min. RNR hidrolizuojama inkubuojant su pankreatine ribonukleaze. Ekstrahuojama lygiu tūriu fenolio, fenolio – chloroformo mišinio bei chloroformo. Nuosėdos plaunamos 75 % etilo alkoholiu, išdžiovinamos 37 °C temperatūroje, ištirpinamos TE buferiniame tirpale (50 µl) [Birnboim, Doly, 1979].

2.4.11. Aukštos molekulinės masės DNR ekstrakcija iš augalo ląstelių

Žalio augalo biomasė homogenizuojama su skystu azotu. Augalo milteliai perkeliama į 2 ml *Eppendorf* mėgintuvėlių, pilama 600 µl buferinio tirpalo A (8 % DTAB, 1,5 M NaCl, 100 mM TRIS-HCl (pH 8,6), 50 mM EDTA) ir inkubuojama apie 10 min. 65 – 75 °C temperatūroje. Sekančiame etape vykdoma baltymų deproteinizacija: sumaišoma su 900 µl chloroformo, gerai suplakamas mėgintuvėlio turinys ir centrifuguojama 5 min. 10 000 rpm.

Viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir švelniai sumaišoma su 900 µl buferinio tirpalo B (5 % CTAB, 0,4 M NaCl) bei centrifuguojama 15 min. 11 000 rpm 4 °C temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ant nuosėdų pilama 200 µl 1,2 M NaCl ir inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje. DNR ir RNR išsodinama 2 tūriais šalto etanolio (96 %). Pradžiūvusios nuosėdos tirpinamos TE tirpale (100 – 200 µl) ir DNR detektuojama elektroforetiškai. RNR pašalinama inkubuojant mėginį 15 min. 37 °C temperatūroje su 1 µl ribonukleazės (25mg/ml). Papildoma deproteinizacija atliekama pridėdant į tirpalą 2 µl proteinkinazės K (15mg/ml), inkubuojama 40 min. 50 °C temperatūroje, pridėdama 150 µl fenolio/chloroformo mišinio, centrifuguojama 5 min. 10 000 rpm. Viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir užpilama 300 µl chloroformo bei centrifuguojama 5 min. 10 000 rpm. Viršutinį sluoksnį perkėlus į naują mėgintuvėlį, DNR išsodinama pridėjus prie supernatanto 1/10 tūrio natrio acetato (pH 5,2) ir 2 tūrius 96 % šalto etanolio. Nuosėdos tirpinamos TE (50 µl). Preparatas laikomas –20 °C temperatūroje [Murray, Thompson, 1980].

2.4.12. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdyta horizontaliame elektroforezės aparate 1 % agarozės geliuose, TAE buferiniame tirpale, esant 10 V/cm įtampai. Geliai 3 – 5 min. buvo dažomi EtBr tirpale (1 µg/ml), praplaunami distiliuotu vandeniu ir analizuojami UV šviesoje [Sambrook ir kt., 1989].

2.4.13. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

PGR reakcijos mišinio komponentai: vanduo, 10x PGR buferinis tirpalas, dNTP, tiesioginis pradmuo, atvirkštinis pradmuo, MgCl₂, genominė DNR, Taq DNR polimerazė. Šiuo atveju PGR reakcija buvo atliekama 50µl tūryje.

PGR atlikti buvo naudojami pradmenys:

- Tiesioginis pradmuo ADH-kilF (00058770_1), kurio nukleotidų seka yra 5'-gca ttc tag acc aac aga tgt cgt tgt tcc-3'. Šis pradmuo yra komplementarus tam tikrai alkoholdehidrogenazės ADH1 promotoriaus sekai.
- Atvirkštinis pradmuo ADH-kilR (00058770_2), kurio nukleotidų seka yra: 5'-gca tcc cgg ggc cgc cac gct cga cga gc-3'. Šis pradmuo yra komplementarus tam tikrai K2 geno sekai, esančiai apie 250 bp nuo geno pradžios.
- Tiesioginis pradmuo Oligo1(00080105_1), kurio nukleotidų seka yra: 5'-gca ttc tag aat gag gat ccg ggc cac cag-3'. Šis pradmuo PGR metu jungiasi prie geno K2 N gale esančios komplementarios jam sekos.
- Tiesioginis 1 pradmuo (00083319_1), kurio nukleotidų seka: 5'-gca tct gca gtt gaa gat gcc tct gcc gac-3'. Šis pradmuo PGR metu jungiasi prie žiedinio kopūsto mozaikos viruso CaMV 35S promotoriaus sekos, 250 bp iki jo C galo [Ausubel, 1999].

PGR programos ciklų parametrai:

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
95 °C	3 min.	1
95 °C	1 min.	
58 °C	1 min.	30
72 °C	2 min.	
72 °C	6 min.	1
4 °C	2 min.	1

Viso: ~2,5 val.

2.4.14. Gyvų ląstelių skaičiaus įvertinimas

Darbas atliekamas aseptinėmis sąlygomis laminariniame bokse. Mėgintuvėliai sunumeruojami po šešis ir į kiekvieną iš jų įpilama po 9 ml izotoninio fiziologinio NaCl (0,9 %) tirpalo. 1 ml ląstelių suspensijos steriliai perkeliama į pirmąjį mėgintuvėlį su fiziologiniu tirpalu. Gauta suspensija

gerai išmaišoma pipetuojant ir procedūra kartojama nuosekliai – po 1 ml praskiestos kultūros pernešama vis į sekantį mėgintuvėlį iki šeštojo mėgintuvėlio imtinai (skiedimas iki 10^{-6}). Tuomet po 100 μ l arba 50 μ l reikiamo praskiedimo ląstelių suspensijos išsėjama ant paruoštų Petri lėkštelių su YEPD agarizuota terpe, po kelias lėkšteles kiekvienam praskiedimui atskirai. Lėkštelės inkubuojamos termostate 30 °C temperatūroje dvi paras. Kiekvienoje lėkštelėje suskaičiuojami titrų vidurkiai (CFU, *angl. Colony Forming Unity*) – išaugusių kolonijų skaičius. Gyvų ląstelių skaičius 1 ml apskaičiuojamas pagal formulę: $M = A \times 10^n \times 10$, kur M – gyvų ląstelių skaičius 1 ml; A – kolonijų skaičiaus lėkštelėse vidurkis; n – substrato skiedimo laipsnis; 10 – koeficientas, kai į lėkštelę sėjama 0,1 ml ląstelių suspensijos [Gedminienė, 2006].

2.4.15. Augimo kreivių sudarymas

Bandymas atliktas Erlenmejerio kolbose su 200 ml obuolių sulčių, į kiekvieną kolbą užsėjant tiriamo mielių kamieno 2 % naktinės kultūros. Mielės kultivuotos 20 °C temperatūroje lengvai aeruojant (70 aps/min.). Tokios sąlygos parinktos atsižvelgiant į tai, kad sekretuojamo kilerinio toksino stabilumas mažėja esant intensyviai aeracijai ir aukštesnei nei 20 °C temperatūrai. Mielių *S. cerevisiae* augimo kreivėms sudaryti, ląstelių suspensijos drumstumas buvo matuojamas kas 2 valandas $OD_{600\text{ nm}}$, aseptiškai paimant mėginius [Gedminienė, 2006].

2.4.16. Ląstelių tankio nustatymas spektrofotometriškai

Mėginiai praskiedžiami ir matuojamas tirpalo šviesos sugėrimas prie 600 nm bangos ilgio. Tokiu būdu 0,1 OD₆₀₀ atitinka $\sim 3 \times 10^6$ ląst./ml [Ausubel, 1999].

2.4.17. Alkoholių, aukštesniųjų alkoholių, esterių, aldehidų koncentracijų įvertinimas fermentuojant obuolių sultis mielių *S. cerevisiae* kamienais

Analizė atlikta Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute (pagal tyrimų protokolus Nr. 10997Ch1-8, Nr. 332Ch1-3 [1 priedas]).

2.4.18. Mielių kamienų identifikacija

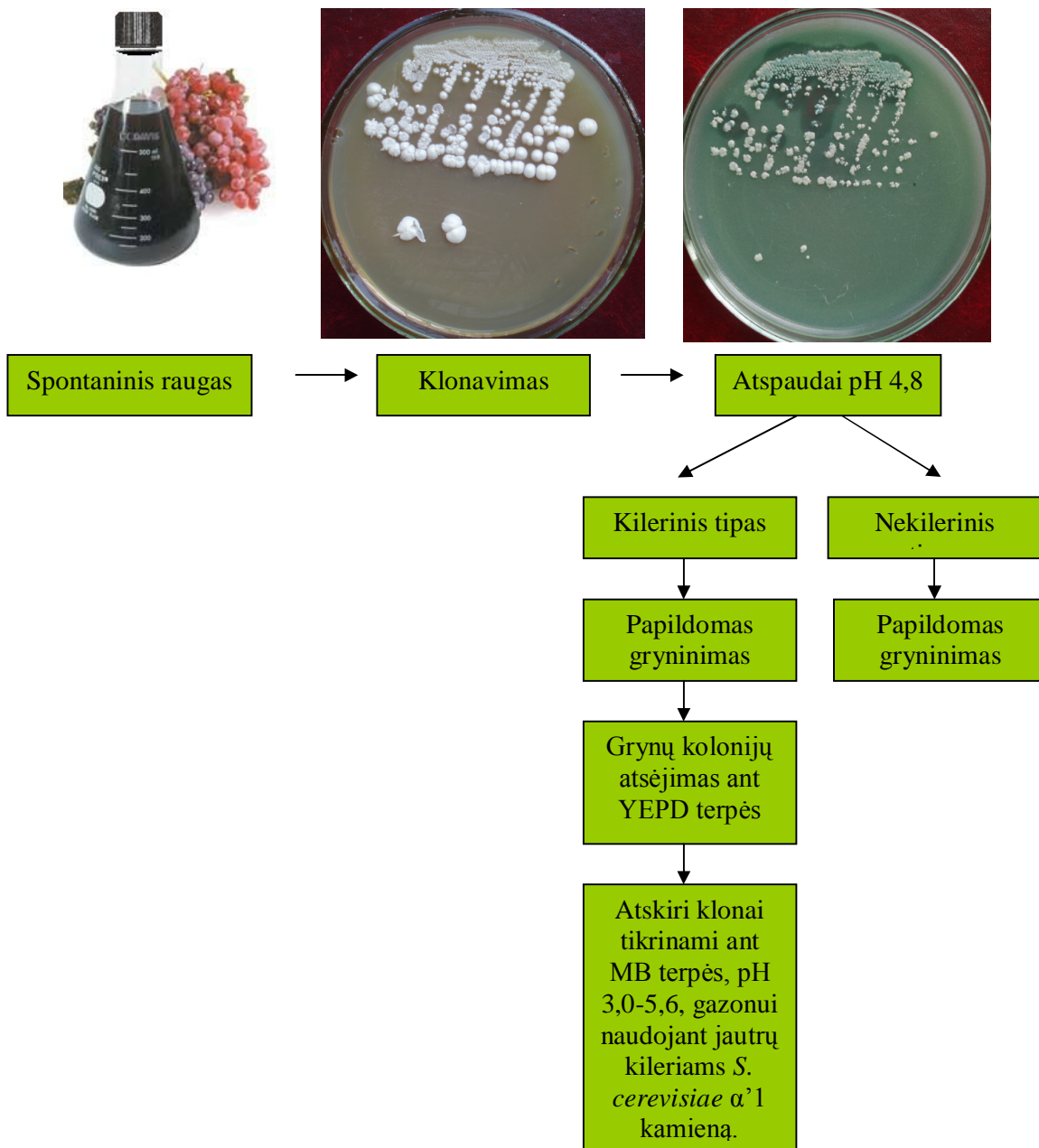
Analizė atlikta Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje, naudojant automatizuotą mini AP I 20 CAUX sistemą.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Mikroorganizmų, augančių spontaniniuose rauguose, pradinė analizė

Siekiant panaudoti natūralioje aplinkoje paplitusių mikroorganizmų sintetinamas antibakterines ir antigrybines medžiagas augalų apsaugai nuo kenkėjų, GTC Botanikos instituto Genetikos laboratorijoje buvo vykdoma naujų plataus veikimo bakterijų bei mielių kamienų, pasižyminčių kileriniu aktyvumu, paieška [Kondratienė ir kt., 2003; Melvydas ir kt., 2005; Melvydas ir kt., 2009]. Ieškomi ne visi paplitę mikroorganizmai, bet sugebantys raugti. Buvo kreipiamas dėmesys į fungicidinio faktoriaus aktyvumą, raugo kultūrų grynumą bei spontaninio raugo rūgimo vizualinį efektyvumą.

Iš įvairių vaisių – uogų spontaninių raugų laboratorijoje išskirta skirtingų mikromicetų, bakterijų rūšių ir mielių kamienų. Darbe naudojami vaisiai, uogos, žiedai surinkti Lietuvos teritorijoje. Spontaniniai raugai paruošiami sudedant sutrintas uogas į mėgintuvėlius ir užpilant distiliuotu vandeniu. Rūgimas vykdomas kambario temperatūroje (~20 °C) be cukraus priedų, esant nesterilioms sąlygoms. Rūgimas stebimas pagal išsiskiriančių dujų intensyvumą. Jį skatina mikroorganizmai, esantys ant vaisių ir uogų. Kad būtų galima tirti dominančias bakterijas ir mieles atliekamas daugkartinis klonavimas (6 pav.). Pradinė mėginių analizė atliekama po 10 dienų nuo rauginimo pradžios, vėliau mėginiai klonuojami kas mėnesį. Šios analizės metu matoma konkurencija tarp įvairių mikroorganizmų. Rauginimui uogos surinktos nesterilomis sąlygomis, todėl pradinės analizės metu vizualiai stebima atskirų kolonijų įvairovė pagal spalvą, formą ir augimo greitį. Įvertinamas mikroorganizmų pasiskirstymas. Iš vieno raugo gauta tik vienintelė galima rūšis gali rodyti ypatingą klono konkurenciškumą. Galimas ne tik kilerinis fenomenas, bet ir kontaktinė konkurencija. Norint išaiškinti gautų kolonijų prigimtį, atliekama mikroskopinė analizė.

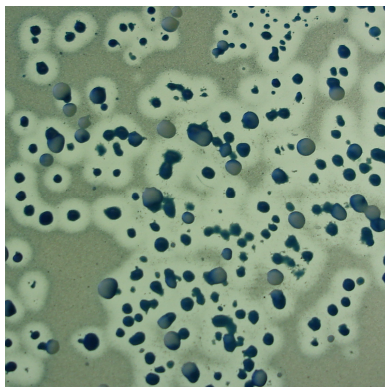


6 pav. Mikroorganizmų, produkuojančių medžiagas, toksiškai veikiančias mieles ir mikromicetus, paieškos schema, temperatūra nuo 20 °C iki 37 °C.

Pirmiausia atliekamas kileriškumo nustatymas. Tolimesni eksperimentai atliekami su kilerinėmis savybėmis pasižyminčiomis kolonijomis (7 pav.).

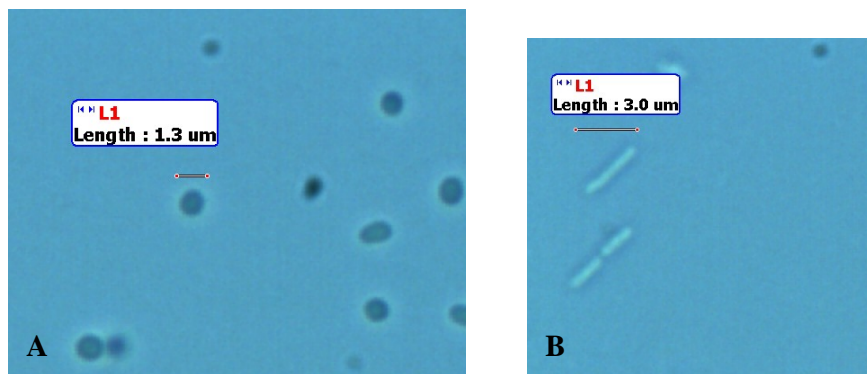
Mielių kamienai buvo tiriami kileriškumo ir imuniškumo testais, žymint tarpusavio skirtumus ir lyginant juos su standartiniais *S. cerevisiae* K1, K2 ir K28 tipo kileriniais kamienais. Darbe naudotų *S. cerevisiae* kilerinių standartų

išskiriami toksinai pagal tipą : K7 ir DBY4975 – K1 tipo, M437 ir RomK100 – K2 tipo, 28 ir MS300 – K28 tipo.



7 pav. Klonuotų mielių atspaudai ant standžios MB terpės kileriškumo raiškai įvertinti, gazonas – *S. cerevisiae* α '1 kamienas, pH 4,8. Aplink kiekvieną koloniją susiformavusi lizės zona (šviesinė aureolė) rodo, kad yra išskiriama toksinė medžiaga, žudanti gazono jautrias ląsteles.

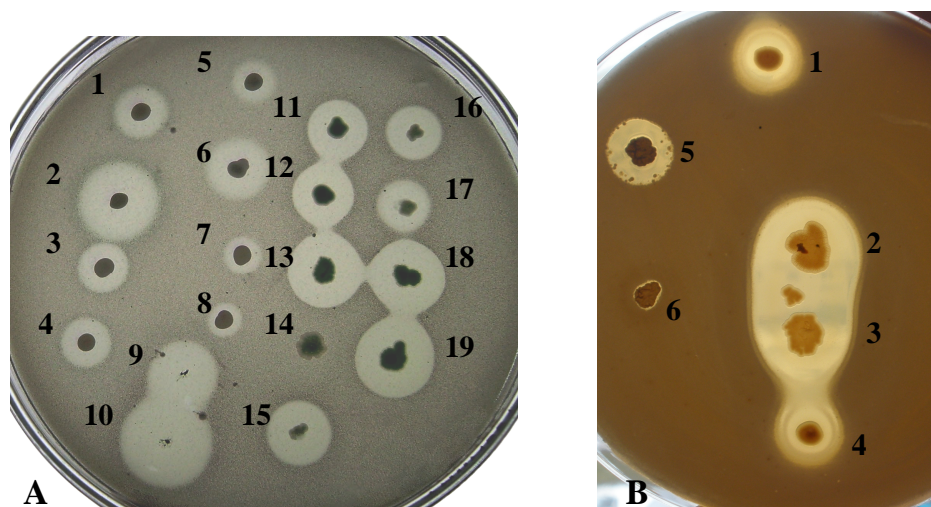
2006 metais iš įvairių vaisių – uogų spontaninių raugų buvo išskirti du bakteriniai izoliatai, laboratorijoje pavadinti Tx ir Ux. Vizualiai pastebėta (kolonijų forma, spalva, augimas), kad jie neturėtų būti nei tos pačios rūšies, nei tos pačios genties. Tai parodė mikroskopavimo tyrimai (8 pav).



8 pav. Ux (A) ir Tx (B) bakterijų izoliatų mikroskopavimo bendras vaizdas.

Tx ir Ux bakteriniai kamienai sekretuoja biologiškai aktyvias medžiagas, kurios pasižymi dideliu kileriniu aktyvumu. Tx ir Ux izoliatai sugeba formuoti lizės zonas ne tik ant jautraus *S. cerevisiae* α '1 kamieno

gazono, bet ir ant standartinių K1, K2 ir K28 kilerinių kamienų gazonų. Taip pat buvo rastas trečias izoliatas – V8, morfologiškai ir pagal toksino sekrecijos ypatybes panašus į Ux (8 pav., A, nr. 9 ir 10), bet jo išskiriamas toksinas pasižymi didesniu aktyvumu, ypač esant 20 °C – 26 °C temperatūrai. Taip pat naujai rasti bakterijų izoliatai, morfologiškai panašūs į Tx, pavadinti pagal kilmę – B9 (tirti du jo klonai: B9I ir B9II), B18 (tirti trys klonai: B18I, B18II, B18III), bei KBI ir KBII. Ux ir V8 bakteriniai izoliatai pasižymi neįprasta savybe: jie patys silpnai augdami produkuoja didelį kiekį toksino (9 pav., A, nr. 9 ir 10). Kamienai gerai išsilaiko net ant išdžiūvusių terpių. Ant maistingos YEPD terpės Ux bei V8 izoliatai produkuoja tik apie 20 % toksino (lyginant su MB terpe), tai yra reta savybė. V8 kamienas yra jautrus Tx1, Tx4, B18I, B9I bei Ux izoliatams (9 pav.).

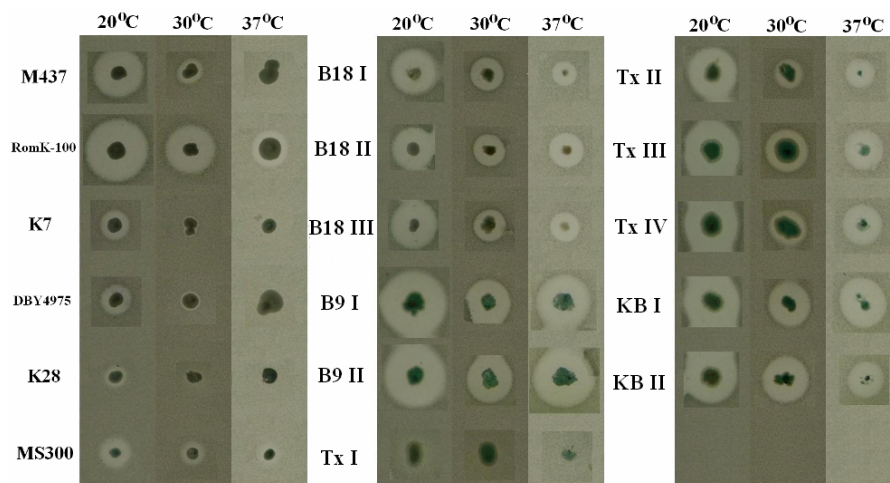


9 pav. A – Bakterijų izoliatų B9, B18 ir V8 kilerinio aktyvumo pasireiškimo palyginimas su izoliatais Tx ir Ux, MB terpė, pH 4,8, 20 °C temperatūra, gazonas – α' 1: 1–RomK100, 2–M437, 3–K7, 4–DBY4975, 5–K28, 6–MS300, 7–B18I, 8–B18II, 9–Ux, 10–V8, 11–B9I, 12, 13–B9II, 14–TxI, 15–TxII, 16–TxIII, 17–TxIV, 18–KBI, 19–KBII. B – Tx1, Tx4, B18I, B9I ir Ux kilerinis aktyvumas, gazonas – kamienas V8, YEPD terpė: 1–B18I, 2–B9I, 3–TxI, 4–TxIV, 5–Ux, 6–V8.

Daugumos žinomų kilerinių toksinų raiška yra gerai ištirta, žinomos reikalingos terpių sudėtys, pH, temperatūra ir kiti duomenys. Darbe buvo aktualu optimizuoti naujai rastų toksinų, bakterijų izoliatų raišką, kad būtų galima gauti didelius kiekius toksinų, reikalingų norint juos ištirti ir vėliau

pritaikyti gamyboje, taip pat atrinkti kamienus, kurie turėtų aukštą temperatūrinį ir pH stabilumą bei didelį aktyvumo spektrą prieš pelėsinius grybus. Reikėjo nustatyti tinkamas sąlygas, kurioms esant producentai geriausiai auga ir išskiria daugiausiai toksino. Pasaulyje mokslininkai bando optimizuoti mielių bei bakterijų, pasižyminčių priešgrybiniu aktyvumu, augimo bei laikymo sąlygas [Lowes, 2000].

Kamienai buvo tiriami, kleriškumą tikrinant ant jautraus *S. cerevisiae* α '1 gazono ir lyginant su standartiniais *S. cerevisiae* K1, K2 ir K28 tipo kileriniais kamienais. Mikroorganizmai buvo auginami ant skirtingo rūgštingumo MB terpių (pH 3,0; 3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,2 ir 5,6) ir inkubuojami 20 °C, 30 °C ir 37 °C temperatūrose (10 pav.).



10 pav. Bakterijų izoliatų išskiriamų toksinų formuojamos lizės zonos ant jautraus α '1 gazono, inkubuojant skirtingose temperatūrose, pH 4,8, terpė MB. Standartiniai mielių kamienai: M437, Rom K–100, K7, DBY4975, K28, MS300. Tiriami bakterijų izoliatų kamienai: B18 I, B18 II, B18 III, B9 I, B9 II, Tx I, Tx II, Tx III, Tx IV, KB I, KB I.

Kaip matyti iš paveikslo, tiek Tx, tiek B18 I, B18 II, B18 III, KB I ir KB II, didėjant temperatūrai, augimas mažėja, tačiau toksino produkcija išlieka gana aukšta, o didėjant temperatūrai standartinių *S. cerevisiae* mielių kamienų augimas bei toksino produkcija ryškiai sumažėja. B9 klonai auga ir produkuoja toksiną trimis skirtingomis temperatūromis gana panašiai.

Taip pat mikroorganizmai buvo auginami ant skirtingo rūgštingumo terpių. Lentelėse (6, 7, 8 lentelė) minimi standartiniai mielių *S. cerevisiae* kamienai bei darbo metu gauti bakterijų kamienai. Iš pateiktų darbo duomenų galima teigti, kad skystoje MB terpėje norint iš rastų bakterinių izoliatų gauti daugiau toksino, reikia palaikyti terpės rūgštingumą – pH 4,8 ir kultivuoti 20 °C temperatūroje. Žinoma, kad kuo aukštesnė temperatūra, tuo tiek mielių kileriai, tiek bakterijų produkuojami baltyminiai toksinai greičiau degradoja, o žemesnėse temperatūrose patys mikroorganizmai pradeda blogiau augti [Servienė ir kt., 2002]. B18 klonai prie visų pH ir temperatūrų produkuoja mažiausiai toksino, lyginant su Tx, Ux, V8 bei B9 klonais, tačiau tai nereiškia, kad jie blogai veiks prieš kitų rūšių mieles ir mikromicetus.

6 lentelė. Atrinktų mikroorganizmų produkuojamų toksinų ekspresijos įvertinimas skirtingo rūgštingumo terpėse pagal lizės zonų dydžius 20 °C temperatūroje

Tiriamieji kamienai	MB terpės pH						
	3,0	3,6	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6
RomK-100	++	++	+++	+++±	++	+	-
M437	++	++	+++	++++	+++	++	±
K7	-	-	-	+	++	+±	-
DBY4975	-	-	-	+	++	+±	-
K28	-	-	±	±	+	++	±
MS300	±	±	+	+	++	+++	+±
B9 I	++	+++±	+++	+++±	++++	+++±	++
B9 II	++	+++±	+++	+++±	++++	+++	+++±
B18 I	±	+	+	++	++	+±	±
B18 II	±	+	+	++	++	+±	+
B18 III	±	+	+	++	++	+±	+
Tx I	±	-	-	-	-	-	-
Tx II	+	+±	+++±	++	+++	+++	+++±
Tx III	+	+±	+++±	+++±	+++	+++	+++±
Tx IV	+	+±	+++±	+++±	+++	+++	+++±
KB I	+	+±	+++±	+++±	+++±	+++±	+++±
KB II	+	+±	+++	+++	+++±	+++	+++±
Ux	++	+++	++++	++++	+++±	+++	+++
V8	++	+++	++++	++++	++++	+++	+++

Lizės zonų dydžiai, diametras, mm: +++++ (>18), +++± (18-15), +++ (15-12), +++± (12-9), ++ (9-6), + (6-4), ± (4-1), - (<1)

7 lentelė. Atrinktų mikroorganizmų produkuojamų toksinų ekspresijos įvertinimas skirtingo rūgštingumo terpėse pagal lizės zonų dydžius 30 °C temperatūroje

Tiriamieji kamienai	MB terpės pH						
	3,0	3,6	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6
Romk-100	+±	+±	+++±	++	++	±	-
M437	+±	+±	++	+++	++	+	-
K7	-	-	-	±	++	+	-
DBY4975	-	-	-	±	++	+	-
K28	-	-	-	-	+	++	±
MS300	-	±	±	+	++	+++±	±
B9 I	+±	+++±	++	+++±	++++±	+++±	+±
B9 II	+±	++	++	+++±	++++±	++	+±
B18 I	±	+	+	++	+±	+	±
B18 II	±	+	+	++	+±	+	±
B18 III	±	±	+	++	++	+	±
Tx I	-	-	-	-	-	-	-
Tx II	+	+±	++	++	+++	++	+
Tx III	+	+±	+++±	++	+++±	+++±	++
Tx IV	+	+±	++	++	+++	+++±	++
KB I	+±	+±	+++±	+++±	+++	+++±	++
KB II	+	++	+++±	+++±	++++±	+++	++
Ux	++	+++	++++	++++	+++	+++	+++
V8	++	+++	+++	++++	+++	+++	+++

Lizės zonų dydžiai, diametras, mm: +++++ (>18), +++± (18-15), +++ (15-12), ++± (12-9), ++ (9-6), + (6-4), ± (4-1), - (<1)

8 lentelė. Atrinktų mikroorganizmų produkuojamų toksinų ekspresijos įvertinimas skirtingo rūgštingumo terpėse pagal lizės zonų dydžius 37 °C temperatūroje

Tiriamieji kamienai	MB terpės pH						
	3,0	3,6	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6
Romk-100	-	-	-	-	-	-	-
M437	±	++	++	++	+	-	-
K7	-	-	-	-	-	-	±
DBY4975	-	-	-	-	-	-	-
K28	-	-	-	-	-	-	-
MS300	-	-	±	±	+	±	-
B9 I	+±	+++±	+++±	+++±	++	+++±	+
B9 II	+±	+++±	+++±	+++±	+++	++	+++±
B18 I	+	+	+	+	+	+	+
B18 II	+	+	+	+	+	+	+
B18 III	+	+	+	+	+	+	+
Tx I	-	-	-	-	-	-	-

8 lentelės tęsinys

Tx II	+	+	++	+	+	+	±
Tx III	±	+	+	++	+	+	+
Tx IV	+	+	++	++	++	++	±
KB I	+	+±	++	++	+	++	+
KB II	+	+	++	+	+	+	+
Ux	++	+++	++++	++++	+++	+++	+++
V8	++	+++	++++	++++	+++	+++	+++

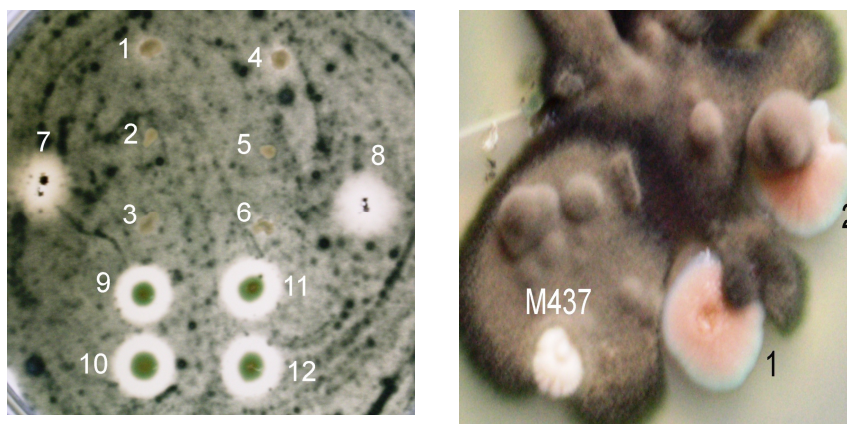
Lizės zonų dydžiai, skersmuo, mm: +++++ (>18), +++± (18-15), +++ (15-12), ++± (12-9), ++ (9-6), + (6-4), ± (4-1), - (<1)

Akivaizdu, kad rastų izoliatų išskiriami kileriniai faktoriai daug aktyvesni už mielių *S. cerevisiae* kilerinius toksinus (6,7,8 lentelės).

Darbo eigoje buvo pastebėta, kad rasti kamienai lizuoja patogenus, atsiradusius kaip užkratas Petri lėkštelėse. Dauguma rastų klonų tokiomis savybėmis nepasižymėjo. Todėl buvo suformuluota hipotezė, kad rastieji mikroorganizmai gali pasižymėti svarbiomis antigrybelinėmis ir antipatogeninėmis savybėmis. Nusprendus patikrinti kultūrų antipatogeninį poveikį, iš Lietuvos Sodininkystės ir Daržininkystės instituto mokslininkų buvo gautos obelinio rauplėgrybio (*Venturia inaequalis*) bei balzganojo menturgrybio (*Verticillium albo-artum*) grynos kultūros. Rauplėmis sergantis vaismedžiai prastai auga, mažiau sukrauna žiedinių pumpurų, žiemą pašala [Pileckis, 1994]. Pastebėtos praskaidrėjusios zonos aplink visus rastus mikroorganizmų klonus, pasėtos ant patogeno *Verticillium albo-artum* gazono. Tai rodo, kad jie sugeba stabdyti patogenų plitimą. Standartiniai K2 tipo kileriniai kamienai negalėjo naikinti minėto patogeno. KBI ir Tx1 mikroorganizmai naikino *Venturia inaequalis* grybo paviršinius hifus. Grybo paplitimo stabdymas yra akivaizdus (11 pav.).

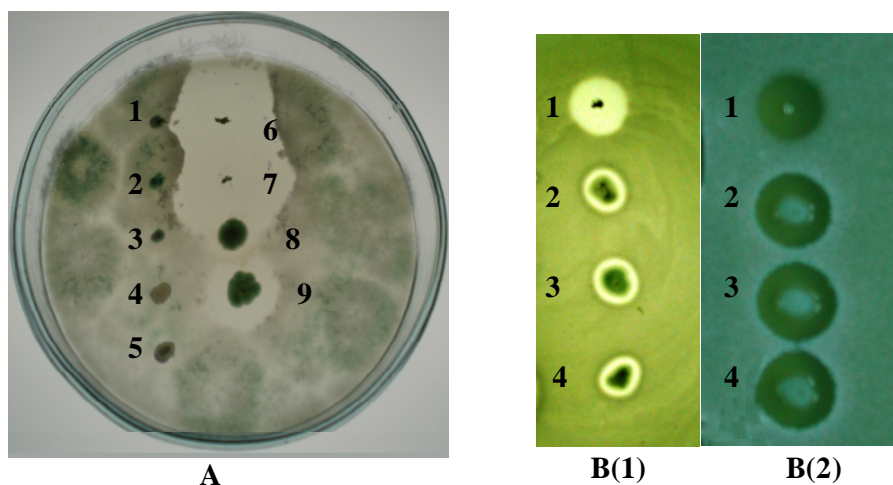
Kadangi rasti mikroorganizmai turėjo perspektyvų naikinant sodo parazitus, buvo nuspręsta išplėsti tyrimus bendradarbiaujant su Botanikos instituto Biodestruktorių ir Fitopatogenų laboratorijomis. Nustyta, kad rasti klonai gali sunaikinti ne tik *Saccharomyces*, *Venturia*, *Verticillium* gentims priklausančius, bet ir *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* genčių mikromicetus. Tikėtina, kad šių mikroorganizmų radimas yra vienas

svarbiausių šio darbo rezultatų ir ateityje gali turėti komercinės reikšmės (11,12 pav.).



11 pav. A – surastų mikroorganizmų poveikis augalų patogeno *Verticillium albo-artum* gazonui: 1–6 kileriniai standartai, 7 – V8, 8 – Ux, 9, 10 – Tx, 11, 12 – KB. **B** – surastų mikroorganizmų poveikis augalų patogeniui *Venturia inaequalis*: 1 – KBI izoliatas, 2 – Tx izoliatas, M437 – standartinis mielių *S. cerevisiae* K2 tipo kamienas, terpė MB, pH 4,8.

Kamienas Ux rūgštinėje terpėje beveik visiškai neauga, bet produkuoja labai didelį kiekį toksino (12 pav.).



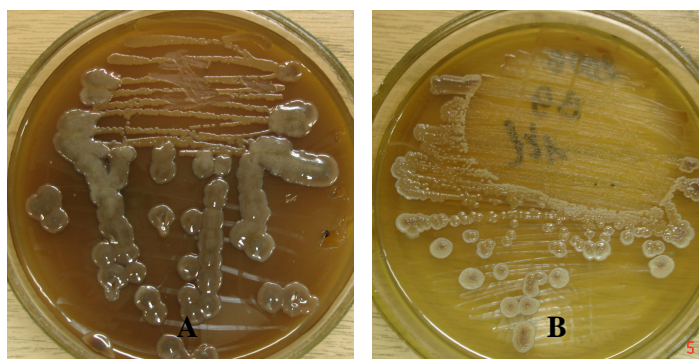
12 pav A – bakteriniai izoliatai ant standartinės kilerinės terpės MB, pH 4,8, gazonas – *Fusarium* sp.: 1–5 – *S. cerevisiae* kileriniai standartai, 6 – Ux, 7 – V8, 8 – B9, 9 – Tx; **B** – bakterinių izoliatų poveikis žmogaus ligų sukėlėjams *Candida glabrata* B(1) bei *Candida tropicalis* B(2), 1 – Ux, 2–4 – Tx.

Biologiniu požiūriu toks augimas yra daug pranašesnis, nes kitos bakterijos tokiomis sąlygomis žūsta. Kamienas bando išlaikyti terpę, kurioje jis

galėtų kuo daugiau daugintis. Rūgštinėje aplinkoje izoliatas produkuoja daug toksino, tad gali būti, kad po kurio laiko terpės pH gali tapti šarminis. Už bakterinio izoliato genai, koduojantys toksiną, galėtų būti panaudoti kuriant naujus modifikuotus organizmus, o jų toksinai – naujos kartos vaistus.

Tx bakteriniai izoliatai gerai auga ant YEPD terpės, tačiau blogai ant jos išsilaiko, nes po kiek laiko, pradėdant trūkti maisto medžiagų, prasideda bendrojo brukšnio autolizė, bet ne sporuliacija (13 pav.). Gyvybingi išlieka tik atskiri brukšniai bei jų kraštai (nėra faginis užkrėtimas). Dėl to galima kontroliuoti kilerinių faktorių producentus ir išvengti ilgalaikio užteršimo tiek jais, tiek toksiniais. Izoliatas, pasižymintis tokiomis savybėmis, būtų galima panaudoti biopreparatų gamybai, kadangi viena didžiausių šiuolaikinių biopreparatų panaudojimo problemų yra ta, kad jie gali kauptis biosferoje ir sukelti jos užterštumą. Šiuo metu biopreparatai jau naudojami praktikoje: ežerų valymui, kovai prieš augalų patogenus, kaip vaistiniai preparatai [Kurzawinska, Mazur, 2007]. Taip pat kiti organizmai gali tapti atsparūs konkrečiam preparatui. Kuriant tokius biopreparatus yra svarbu, kad jie būtų nekenksmingi gamtai ir greitai degraduotų.

Šių kultūrų palaikymui tinka kilerinė MB terpė, kurios pH 4,8. Ant jos netgi esant skirtingoms pH reikšmėms kultūra išsilaiko apie 2 – 3 mėnesius. Taip pat kultūros išlaikymui tinka alaus misos terpė, ant kurios autolizė nevyksta.



13 pav. Bakterinio izoliato Tx autolizė, terpė YEPD: A – autolizės pradžia, B – įvykusi autolizė.

Ux ir V8 bakteriniai izoliatai yra gramteigiami ir lengvai sporuliuoja bei labai gerai auga ant YEPD terpės. Tx bakterinis izoliatas yra gramteigiamas ir blogai sporuliuoja.

Ux ir Tx baltymų gryninimas ir koncentravimas buvo atliekamas naudojant *Millipore* filtravimo sistemą. Ux bakterinių izoliatų atveju valymo metu pastebėta, kad dalis produkto praeina per TM-100 membraną, tačiau koncentruojasi ant TM-10. Gauti rezultatai rodo panašumą su M437 K2 tipo kileriniu toksinu, kurio molekulinė masė apie 21 kDa. Tx atveju toksinas praeina pro TM-10 membraną, bet koncentruojasi ant TM-5. Naudojant skirtingo porų dydžio filtravimo membranas nustatyta, kad tiriamo toksino molekulinė masė gali neviršyti 5 kDa.

Atlikus Tx kamieno identifikaciją buvo nustatyta, kad izoliatas priklauso *Bacillus* sp.

Rušys neskelbiamos, kadangi gali turėti komercinės reikšmės. Galimas patentavimas.

3.2. Kilerinių mielių gamybinis perspektyvumas vyno bei etilo alkoholio pramonėje

3.2.1. Naujų kamienų kileriškumo ir imuniškumo rezultatai

Viena svarbiausių mielių genčių charakteristikų yra anaerobinis cukrų rūgimas. Angliavandenių anaerobinis skaidymas, katalizuojant mielių fermentams iki etanolio ir CO₂, vadinamas alkoholiniu rūgimu. Pagrindiniai alkoholinio rūgimo sukėlėjai yra askomicetinės mielės – Saccharomicetai. Alkoholinį rūgimą gali sukelti ir kiti grybai, bet etanolio susidaro daug mažiau (5–7 %) [Masteikienė, 1999]. Kai kurios bakterijos iš *Clostridium* ir *Enterobacter* genčių rūgimo metu kaip šalutinį produktą gamina etanolį. Etanolio pirmtakas acetaldehidas, šiuo atveju, susidaro ne tiesiogiai iš piruvato, veikiant piruvatdekarboksilazei, o redukuojantis acetil – CoA [Esteve Zarzoso, 1998].

Analizuojant raugus buvo rasta mielių klonų (kilerinių ir nekilerinių), kurie labai greitai rūgo. Svarbu rasti efektyvesnius negu naudojami vyno

gamyboje bei etanolio pramonėje kamienus, augančius ant plataus spektro substratų, žemoje temperatūroje ir gaminančius kuo didesnę etanolio kiekį. Tokio pobūdžio darbai išlieka aktualūs, siekiant įvertinti mikroorganizmų išgyvenamumą ir konkurencingumą bei praktiniam pritaikymui. Todėl, norint neprarasti rastų mielių (ieškant plataus veikimo spektro antimikrobinių producentų), buvo atliekami darbai ir šia kryptimi. Kultūros buvo labai grynos, tai rodo jų galimą konkurencingumą. Tirtos potencialios mielių kamienų rauginimo galimybės. Šiuose eksperimentuose panaudoti mielių kamienai – 20K++, 4+, IIx31, III–2, spanguolė, K+ob ir 1M. 9 ir 10 lentelėse aprašoma šių kamienų sąveika su standartiniais mielių *S. cerevisiae* kileriniais kamienais bei kileriškumo savybės ant skirtingų pH.

9 lentelė. Standartinių ir tiriamų kilerinių mielių tarpusavio sąveika

Kamienas	Sudaro lizės zonas ¹	Nesudaro lizės zonų ²	Kilerinis fenotipas	Imunitetas
20K++	K1, K28	K2	K2	In ₂
4+	K1, K28	K2	K2	In ₂
IIx31	K1	K2, K28	Km	In _{2,28}
III-2	K1	K2, K28	Km	In _{2,28}
Spanguolė	-	K1, K2, K28	Kx	In _{1,2,28}
1M	K1, K2, K28	-	Kn	I-
K+ob	K1, K2, K28	-	Kn	I-

¹ – tiriamieji kamienai sudaro lizės zonas ant MB paskleistų K1, K2 arba K28 tipo kamienų; ² – tiriamieji kamienai nesudaro lizės zonų ant MB terpės paskleistų K1, K2 arba K28 tipo kamienų; Km – tiriamas kamienas žudo tik K1 tipo kilerinius kamienus; Kn – tiriamas kamienas žudo K1, K2 ir K28 tipų kilerinius kamienus; Kx – tiriamas kamienas žudo tik jautrų mielių α'1 kamieną; In₂ – imuniškumas K2 tipo kileriniams kamienams; In_{2,28} – imuniškumas K2 bei K28 tipo kamienams; In_{1,2,28} – imuniškumas visų tipų kileriniams kamienams; I- – imuniškumo neturintys kamienai.

Pagal sąveiką tarp standartinių bei tiriamų mielių kamienų išskirti skirtingomis savybėmis pasižymintys kileriniai tipai: K2 kileriniu fenotipu pasižymintys kamienai 4+ ir 20K++ žudo K1 ir K28 kilerinio tipo mieles bei formuoja imuniškumą K2 tipo toksinams. 1M kamienas žudo K1, K2 ir K28 kilerinio tipo mieles, tačiau pats neturi imuniškumo visų tipų kileriniams toksinams. IIx31 ir III–2 izoliatai žudo K1 tipo mieles. Spanguolės mielių

kamienai yra atsparūs visiems kilerinių mielių tipams. K+ob, kamienas išskirtas iš vyno gamybos etapų, todėl tikėtina, kad jis gali būti labai konkurenciškas gamyboje. Šios mielės buvo išskirtos iš kooperatinės bendrovės “Vaisių sultys” obuolių sulčių fermentacijos raugų kaip užkratas. Jos pasižymi silpnu kileriškumu, bet išskiria stabdymo faktorių, kuris inhibuoja K1, K2 ir K28 tipo kilerinius toksinus, bet pats neturi imuniškumo visų tipų kileriniams kamienams. Kamieno savybės įdomios moksliniu požiūriu.

10 lentelė. Optimalus terpės pH testuotų mielių kamienų kileriniam aktyvumui

Kamienas	Lizės zonos, susidaranti ant jautraus α '1 kamieno gazono, kai terpės pH:							
	3.0	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6	6.0
20K++	+++	+++	+++±	++++	+++±	+++	+	-
4+	+++	+++	+++±	++++	+++	++±	±	-
IIx31	++	++±	+++±	++++	+++±	+++	±	-
III-2	+	+	+±	++	+	-	-	-
Spanguolė	+++±	+++±	++	++	±	-	-	-
1M	-	-	±	+	±	±	-	-
K+ob	-	-	-	±	±	+	±	-

Lizės zonos diametras (mm): ++++>18, +++± 18-15, +++ 15-12, ++± 12-9, ++ 9-6, + 6-4, ± 4-1.

Įvairių mielių kilerinių kamienų produkuojamų toksinų veikimo pH optimumai yra labai skirtingi. Tiriami bandomieji kamienai, esant ivairiems terpės pH, skirtingu efektyvumu sekretuoja kilerinius toksinus. Optimalaus pH nustatymo metu išsiskyrė 20K++, 4+, IIx31 izoliatai, kurių produkuojamas toksinas veikia plačiame pH intervale (nuo 3,0 iki 5,6). 1M ir K+ob kamienai netoleruoja rūgštinės terpės.

3.2.2. Gliukozės įsisavinimo ir rauginimo efektyvumo įvertinimas

Lyginant gliukozės įsisavinimo greitį su rauginimo efektyvumu, norėta išsiaiškinti koreliaciją tarp šių reiškinių. Rauginimo efektyvumas buvo vertinamas vizualiai pagal CO₂ dujų išsiskyrimą ir cukrų kiekį obuolių sultyse, kurios buvo paruoštos iš obuolių sulčių koncentrato (70,4 %) jas skiedžiant iki

galutinės 9 % koncentracijos. Cukrų kiekis buvo nustatomas po savaitės rauginimo DNS metodu (Kooperatinėje bendrovėje „Vaisių sultys“). Duomenys pateikti 11 lentelėje.

11 lentelė. Obuolių sulčių rauginimo efektyvumo tyrimo rezultatai

Kamienas	Vizualus rauginimo greitis (~20 °C temperatūroje)	Cukrų kiekis po savaitės		
		Gliukozė, mM	Gliukozė, mg/ml	Cukrai, °Blg
RomK100	+++	0,18	0,03	0,5
M437	++	0,42	0,08	2,0
4+	+++	0,19	0,03	0,5
20K++	+++	0,23	0,04	0,5
K+ob	+++	0,32	0,06	1,0
Iix31	+++	0,35	0,06	1,0
III2	++	0,49	0,09	2,5
Spanguolė	+	0,26	0,05	1,0
1M	++++	0,13	0,02	0,5

Pastabos: °Blg – Balingo laipsnis. 1 °Blg atitinka 10 g. cukraus 1 l tirpalo.
CO₂ dujų išsiskyrimas: +++++ - labai intensyvus, +++ - intensyvus, ++ - vidutinis, + - silpnas.

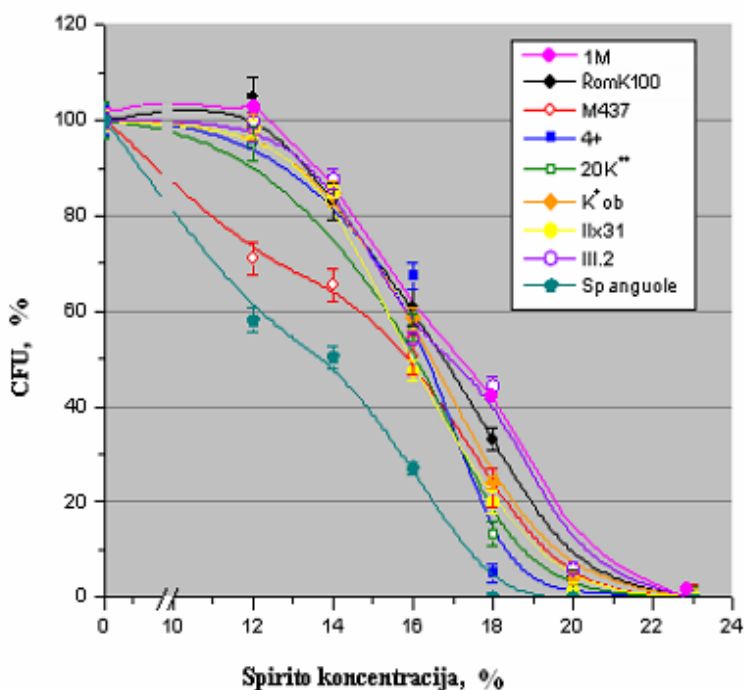
Gliukozės įsisavinimo ir rauginimo efektyvumo analizės metu iš visų kamienų labiausiai pasižymėjo 1M kamienas, kaip labiausiai fermentuojantis cukrus. Rezultatai parodė, kad 1M kamienas yra labai perspektyvus vyno bei alkoholio pramonėje. Toliau izoliuoti aptinkami retai.

3.2.3. Tolerancija etilo alkoholiui

Vienas iš reikalavimų, keliamų vyno mielėms, yra jų gera alkoholio tolerancija. Tie kamieniai, kurie netoleruoja 10 % alkoholio vynu pramonėje yra neperspektyvūs, tačiau gali būti pritaikyti alaus gamyboje. Susipažinus su vynu mielių kataloguose pateikiama informacija, matyti, kad mielės turi

toleruoti 13 % ir aukštesnę alkoholio koncentraciją. Dauguma pramonėje naudojamų kamienų gali išgyventi 13 – 18 % koncentracijos alkoholio tirpaluose, o kai kurie kamienai ir 21 %. Atsparių klonų atrankos būdu galima tikėtis aptikti mielių kamienų, toleruojančių didesnes alkoholio koncentracijas.

Buvo atliktas alkoholio tolerancijos eksperimentas su pasirinktais *S. cerevisiae* kamienais, panaudotais obuolių sulčių fermentacijai. Buvo paruošti tokie etilo spirito tirpalai, kurių koncentracijos procentais (%) yra: kontrolė, 12, 14, 16, 18, 20, 23 po 20 ml kiekvienos 100 ml Erlenmejerio kolbutėse ir užsėta gyvų ląstelių iki galutinės $\sim 1,97 \cdot 10^8$ CFU/ml mielių. Tokia ląstelių koncentracija buvo šio darbo fermentacijų atvejais. Ląstelės inkubuotos 20 °C temperatūroje 2 val. Gyvų mielių ląstelių skaičiui įvertinti suspensija buvo išsėta ant standžios YEPD terpės: kontrolė – tik įnešus mielių ląsteles į etanolio tirpalą ir po 4 val. Gauti alkoholio tolerancijos rezultatai pateikiami 14 paveiksle.



14 pav. Kamienų: 1M, RomK–100, M437, 4+, 20K++ ir K+ob, Iix31, III-2, Spanguolė tolerancijos etilo spiritui įvertinimas.

Mielių tolerancijos etilo alkoholiui rezultatai rodo, kad kai fermentacijos metu susikaupia daug alkoholio, jo perteklius užmuša mielių ląsteles, todėl fermentacija toliau nebevyksta. Visi kamienai pasižymi alkoholio tolerancija iki 18 %, tačiau M437 ir Spanguolė kamienai žymiai jautresni.

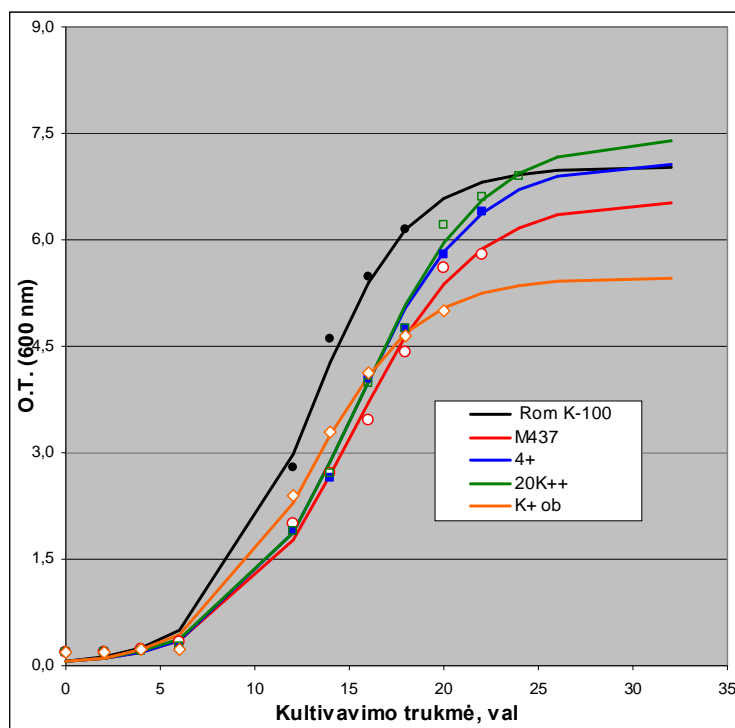
3.2.4. Augimo kreivių sudarymas ir augimo parametrų įvertinimas

Apibūdinant naujus kamienus būtina sąlyga – ištirti mikroorganizmų elgseną (gyvybingumo parametrus). Atrenkant perspektyvias maisto (vyno) pramonei mieles, labai svarbu įvertinti galimai daugiau tiriamo kamieno biologinių savybių. Viena svarbiausių – mikroorganizmo augimo kreivės nustatymas. Augimo kreivės suteikia žinių apie mikroorganizmų populiacijos augimo greitį, atskirų populiacijos stadijų trukmę ir panašiai. Naudojant kelių rūšių mikroorganizmus, fermentacijos metu svarbu juos parinkti taip, kad jų augimo greitis būtų beveik vienodas. Panaudojant tinkamus kamienus galima sumažinti rūgimo laiką, atlikti procesą žemesnėje temperatūroje ir gauti aukštos kokybės vynus.

Mielių augimo kreivės sudarytos obuolių sultyse. Obuolių sultyse yra įvairių cukrų, iš kurių įvairiais santykiais daugiausiai aptinkama fruktozės, gliukozės ir sacharozės. Obuolių sultys buvo pasirinktos kaip dažniausiai naudojama žaliava vynų gamybai šiauriniuose kraštuose. Be to, tikimasi, kad bus galima pasiūlyti naujus mielių kamienus vynų gamybai kooperatinei bendrovei „Vaisių sultys“. Analizei buvo panaudoti galimai perspektyvūs maisto pramonei *S. cerevisiae* kamienai: M437, 4+, 20K++, K+ob ir palyginimui – mažiau perspektyvūs, bet dažnai naudojamas vynų pramonėje *S. cerevisiae* Rom K–100 kamienas.

Nustatyta, kad Rom K–100, K+ob kamienai auga sparčiausiai (analizuojant santykinį augimo greitį), o M437, 4+, 20K++ kamienai pagal santykinį augimo greitį atsilieka. Pagal biomasės išeią išsiskiria Rom K–100, 4+, 20K++ kamienai, mažiausiai biomasės turi K⁺ob kamienas. Nuo augimo

greičio priklauso fermentacijos kokybė, nes atsiranda papildomų metabolitų, todėl tikėtina, kad Rom K–100, K+ob kamienai gali pasižymėti didesniu papildomų fermentacijos medžiagų (priemaišų) išskyrimu (15 pav.). Tačiau reikia pastebėti, kad vis dėl to pirmaisiai kokybę apsprendžia kamieno savybės. Dėl to reikalingi vyno, išraugto atskirais mielių kamienais, tyrimai.



15 pav. *S. cerevisiae* mielių kamienų Rom K–100, M437 bei kamienų 4+, 20K++, K+ob augimo kreivės obuolių sultyse.

Fermentacija buvo vykdoma obuolių sultyse, pridėdant po 10 dienų po du kartus 10 % cukraus. Tokiu būdu buvo tikėtina gauti didesnę alkoholio kiekį. Be to, pagal šią savybę kamienai gali labai išsiskirti. Alkoholio – cukraus sąveika inhibuoja tolesnį rauginimo procesą. Norint įvertinti praktines kilerinių kamienų rauginimo galimybes bei įtaką vyno kokybei, būtina atlikti alkoholių, aukštesniųjų alkoholių, esterių ir aldehidų koncentracijų įvertinimą pagal Europos bendrijos reglamentus ir Lietuvos standartus. Fermentacijos proceso kokybės įvertinimui buvo tikrinami parametrai, pateikti 12 lentelėje.

Parodyta, kad kamienai pagamino skirtingus etanolio kiekius ir skiriasi kenksmingų priemaišų kiekiais.

12 lentelė. Alkoholių, esterių ir aldehidų kiekybinis įvertinimas fermentuojant obuolių sultis mielių kamienais. I ANALIZĖ (po 10 d. fermentacijos, 20 °C temperatūroje, pridant papildomai du kartus 10 % cukraus)

Eil. Nr.	Cheminė medžiaga	Kileriniai mielių kamienai						
		RomK–100	20K++	IIx31	M437	4+	1M	Spanguolė
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Alkoholiai</i>								
1.	Etilo alkoholio kiekis, tūrio %	11,72	12,62	12,38	12,16	12,37	17,34	12,89
2.	Metilo alkoholio kiekis, mg/dm ³	0,008	0,007	0,008	0,006	0,003	0,041	0,002
<i>Aukštesnieji alkoholiai, mg/dm³</i>								
3.	2–metilbutilo alkoholis, mg/dm ³	0,044	0,038	0,037	0,032	0,023	0,026	0,034
4.	3–metilbutilo alkoholis, mg/dm ³	0,136	0,113	0,107	0,181	0,158	0,208	0,154
5.	Propilo alkoholis, mg/dm ³	0,028	0,030	0,030	0,024	0,027	0,118	0,041
6.	Izobutilo alkoholis, mg/dm ³	0,078	0,057	0,053	0,064	0,077	0,051	0,079
7.	2–butilo alkoholis, mg/dm ³	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009
8.	n–butilo alkoholis, mg/dm ³	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
<i>Esteriai, mg/dm³</i>								
9.	Metilacetatas, mg/dm ³	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009
10.	Etilacetatas, mg/dm ³	0,002	0,006	0,001	0,021	0,019	0,082	0,094
<i>Aldehidai, mg/dm³</i>								
11.	Etanalis (acetaldehido ir acetalio suma)	0,091	0,116	0,063	0,112	0,081	0,018	0,192

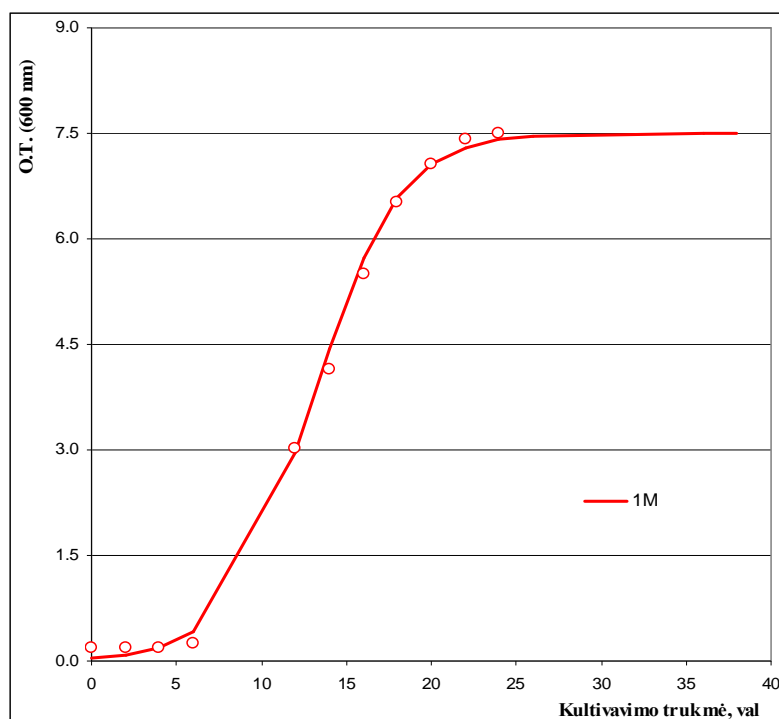
Gauti analizių rezultatai rodo, kad visi pasirinkti kamienai pagamino apie 12–13 % etanolio, išskyrus 1M kamieną, kuris turėjo didžiausią etanolio išeigą (17.34 %). Aukštesniųjų alkoholių, tokių kaip 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, izobutilo, propilo ir kt. daugiausiai pasigamina RomK–100 ir Spanguolės kamienų fermentacijos metu, šiek tiek mažiau – M437 ir 1M

kamienų atveju. Labai didelius kiekius esterių sąlygoja *S. cerevisiae* Spanguolė ir 1M kamienai, palyginti su kontroliniais RomK–100, M437 kamienais, bet atitinka leistinas normas [3 priedas]. Atrinkti mielių klonai, kurie intensyviausiai produkuoja geros kokybės, lyginant su standartiniais kamienais, etanolį. Optimalus vynu gamybai yra *S. cerevisiae* 1M kamienas: didžiausia etanolio išeiga ir kiti kokybės rodikliai atitinka standartus. Todėl buvo atlikti dar 3 nepriklausomi fermentacijos bandymai pusiau gamybinėmis sąlygomis su šiuo kamieniu, norint patvirtinti gautus rezultatus. Gauti rezultatai pateikiami 13 lentelėje.

13 lentelė. Alkoholų, esterių ir aldehidų kiekybinis įvertinimas fermentuojant obuolių sultis mielių *S. cerevisiae* 1M kamieniu. II ANALIZĖ (Po 10 d. fermentacijos 20 °C temperatūroje)

Eil. Nr.	Cheminė medžiaga	Kiteriniai mielių kamienai		
		1M	1M	1M
1	2	3	4	5
<i>Alkoholiai</i>				
1.	Etilo alkoholio kiekis, tūrio %	17,39	16,96	14,97
2.	Metilo alkoholio kiekis, mg/dm ³	0,228	0,246	0,487
<i>Aukštesnieji alkoholiai, mg/dm³</i>				
3.	2–metilbutilo alkoholis, mg/dm ³	0,300	0,205	0,483
4.	3–metilbutilo alkoholis, mg/dm ³	2,565	1,349	2,794
5.	Propilo alkoholis, mg/dm ³	0,160	0,706	0,250
6.	Izobutilo alkoholis, mg/dm ³	0,635	0,314	0,845
7.	2–butilo alkoholis, mg/dm ³	<0,009	<0,009	<0,009
8.	n–butilo alkoholis, mg/dm ³	0,032	0,027	0,029
<i>Esteriai, mg/dm³</i>				
9.	Metilacetatas, mg/dm ³	< 0,009	< 0,009	<0,009
10.	Etilacetatas, mg/dm ³	0,615	0,529	0,407
<i>Aldehidai, mg/dm³</i>				
11.	Etanalis (acetaldehido ir acetolio suma)	0,176	0,116	0,479

1M kamieno pirminiai rauginimo eksperimentai parodė, kad jis gali būti ypač perspektyvus. Nustatyta, kad jis yra silpnas kileris, žudo jautrų α '1 bei silpnai žudo K1, K2 ir K28 tipo kilerius. Jį patį žudo visi minėti standartiniai kileriai. Norint įvertinti populiacijos dinamiką, sudaryta šio kamieno augimo kreivė (16 pav.).



16 pav. 1M kilerinio kamieno augimo kreivė, gauta obuolių sulčių terpėje.

Dėl savitų savybių šis kamienas pasirinktas kaip perspektyvus vynu gamyboje fermentuojant obuolių sultis. 1M kamienas buvo perduotas į kooperatinę bendrovę „Vaisių sultys“, ir po gamybinio patikrinimo panaudotas obuolių vyno natūralaus pusgaminio ruošimui.

Naudojant šį mielių kamieną, buvo išrauginta 558 276 l obuolių vyno natūralaus pusgaminio. Kooperatinėje bendrovėje „Vaisių sultys“ buvo patvirtinta, kad *S. cerevisiae* 1M kamienas pasižymėjo tinkamomis gamybinėmis savybėmis ir buvo ekonomiškai naudingas [2 priedas].

Įvertinus ir apibendrinus visus turimus šio darbo rezultatus, kaip galimai perspektyvius kamienus galima išskirti ir 20K++ bei IIx31, kurie pagal

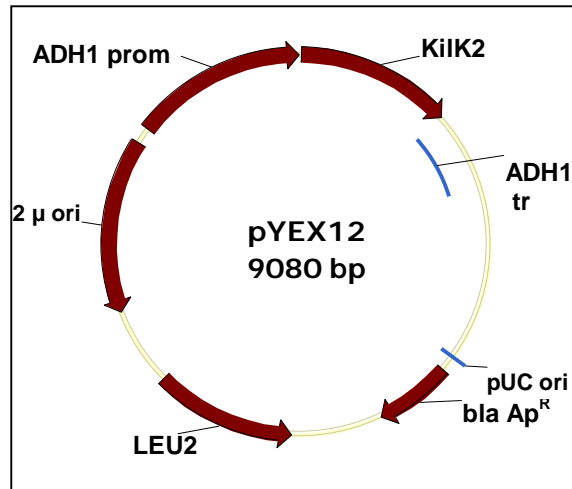
priemašų lygį pralenkia kontrolinį Rom K–100 kamieną (ypač 20K++), be to, pasižymi intensyvesniu rauginimu ir taip pat nepablogina produkto kokybės (mažesni kiekiai aukštesniųjų alkoholių, aldehydų ir pan.). Kiti analizuoti – 4+, III–2, Spanguolė kamienai galėtų būti naudojami etanolio, skirto ne maisto reikmėms, pramonėje, nes fermentacijos metu pagamina daugiau nepageidaujamų šalutinių produktų. Įdomus yra Spanguolė kamienas: fermentuojamos sultys pasižymi maloniu uogų aromatu ir galbūt po papildomų tyrimų jį būtų galima rekomenduoti, kaip mieles, kurios pagerina juslines vynu savybes. Apibendrinant šio eksperimento rezultatus, atkreipiamas dėmesys, kad darbe tirti kamienai išsiskyrė pagal savybes ir yra skirtingi savo biologinėmis savybėmis. 1M kamienas gali būti labai perspektyvus sukuriant kamienus, galinčius pagaminti etilo alkoholio daugiau kaip 20 %.

Identifikuojant minėtus kamienus buvo nustatyta, kad 20K++, Iix31, K+ob bei 1M kamienai priklauso *S. cerevisiae* mielėms. III–2 – *Rodotorula* sp., kamienas Spanguolė – *Kluyveromyces* sp. mielėms.

3.3. K2 kilerinio geno ekspresijos įvertinimas augaluose

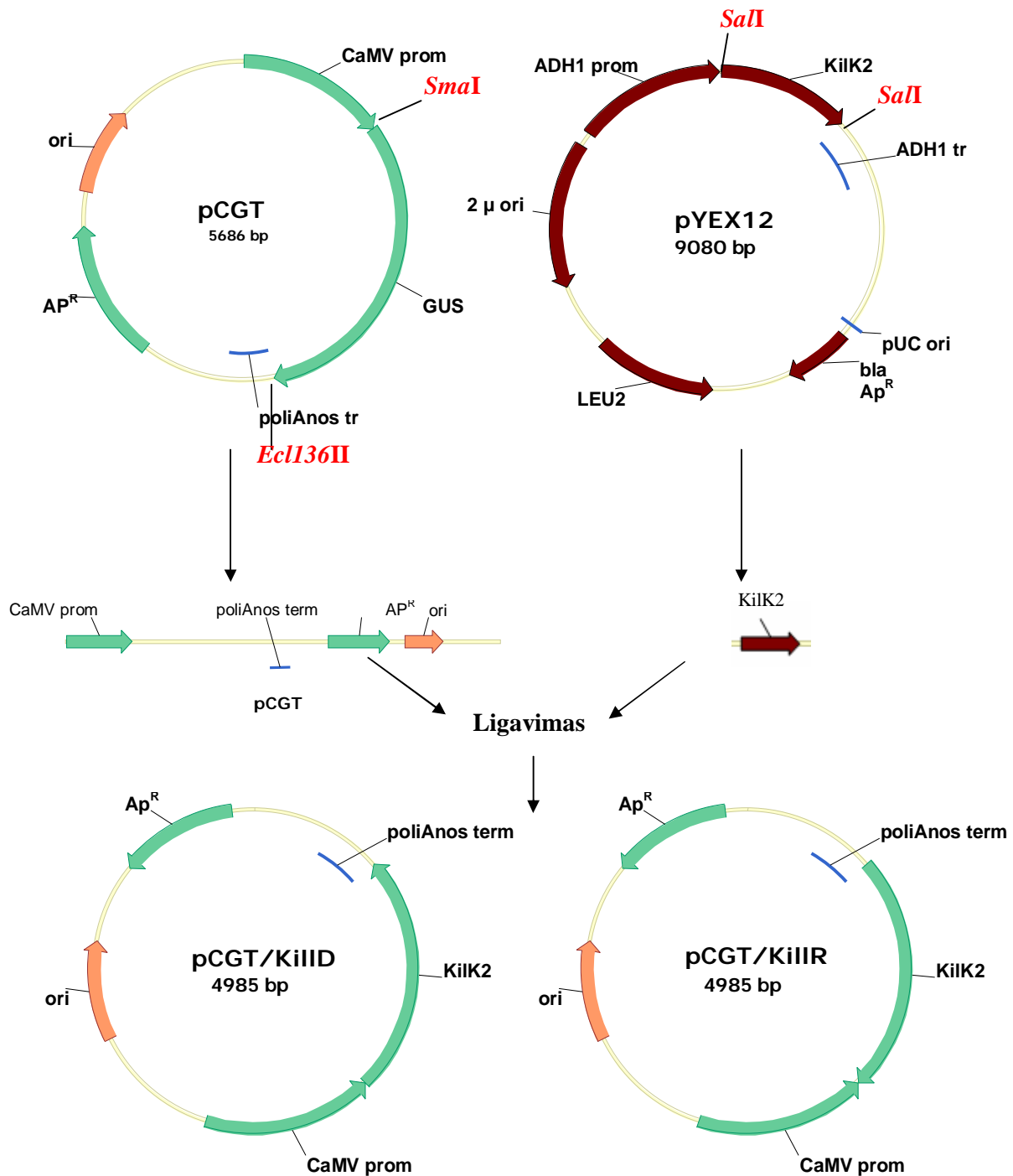
3.3.1. Plazmidžių pCGT/Kill konstravimas

Gamtos Tyrimo Centro Botanikos instituto Genetikos laboratorijoje yra tiriama mielių *S. cerevisiae* K2 tipo kilerinė sistema. Tikėtina, kad K2 kilerinė sistema galėtų būti pritaikoma kuriant transgeninius augalus, atsparius grybelinėms ligoms. Todėl pirmame darbo etape buvo vykdomi augalinių vektorių konstravimo darbai. Darbe panaudota plazmidė pYEX12 (17 pav.), kurioje kilerinio preprotoksino geno veiklą užtikrina ADH1 promotorius ir ADH1 terminatorius. Ši plazmidė jautrioms recipientinėms mielių ląstelėms suteikia abu K2 kilerinio geno koduojamus požymius – kileriškumą ir imunitetą K2 tipo toksinams [Meškauskas, Čitavičius, 1992].



17 pav. pYEX12 plazmidė [Meškauskas, Čitavičius, 1992]: ADH1 prom – alkoholdehidrogenazės promotorius, KilK2 – K2 tipo kilerinio preprotoksino genas, ADH1 tr – alkoholdehidrogenazės terminatorius, pUC ori – replikacijos pradžia, LEU2 – *S. cerevisiae* LEU2 genas, 2 μ ori – 2 μ plazmidės seka, bla Ap^R – genas, koduojantis β -laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampilicilinui.

Mielėse *S. cerevisiae* K2 kilerinio preprotoksino geno cDNR transkripcijai užtikrinti naudojamas alkoholdehidrogenazės (ADH1) promotorius (plazmidė pYEX12), o šio geno raiškai augalų ląstelėse užtikrinti nuspręsta panaudoti stiprų pastoviai veikiančių žiedinio kopūsto mozaikos viruso 35S rRNR CaMV promotorių [Boyko ir kt., 2010]. Tam tikslui reikėjo sukonstruoti plazmidę pCGT/Kill, kurioje mielių K2 kilerinio preprotoksino genas būtų sulietas su CaMV promotoriumi ir poliA^{nos} terminatoriumi. Restrikcijos endonukleazėmis SmaI ir Ecl136II iš bakterinio vektoriaus pCGT [Jefferson ir kt., 1987] (18 pav), iškirptas 1750 bp dydžio fragmentas, kuriame yra β – gliukuronidazės (*GUS*) genas. Tolimesniam darbui naudotas likęs 3936 bp SmaI – Ecl136II fragmentas. Restriktaze SalI iš pYEX12 plazmidės iškirptas 1196 bp fragmentas, kuriame yra K2 kilerinio preprotoksino genas. 1196 bp SalI–SalI fragmentas liguotas su 3936 bp SmaI–Ecl136II fragmentu (18 pav.).

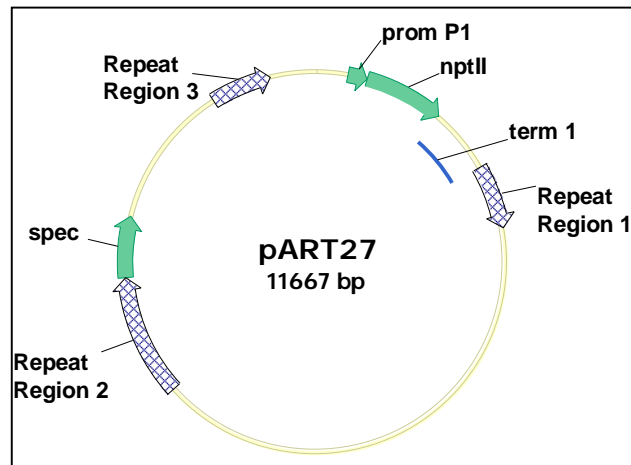


18 pav. Plazmidžių pCGT/Kill D ir pCGT/Kill R konstravimo shema. Į vektorių pCGT vietoje GUS geno įstatytas K2 kilerinio preprotoksino genas, pažymėtas – Kil K2. Atrinkti plazmidės variantai, kuriuose preprotoksino genas įsistatęs tiesioginėje (pCGT/KillD) bei atvirkštinėje (pCGT/KillR) orientacijose CaMV promotoriaus atžvilgiu.

Sukonstruota pCGT/Kill plazmidė padauginta *E. coli* bakterijose ir atrinkti plazmidės variantai, kuriuose preprotoksino genas įsistatęs tiesioginėje (pCGT/Kill-D) ir atvirkštinėje (pCGT/Kill-R) orientacijose CaMV promotoriaus atžvilgiu (7 pav.).

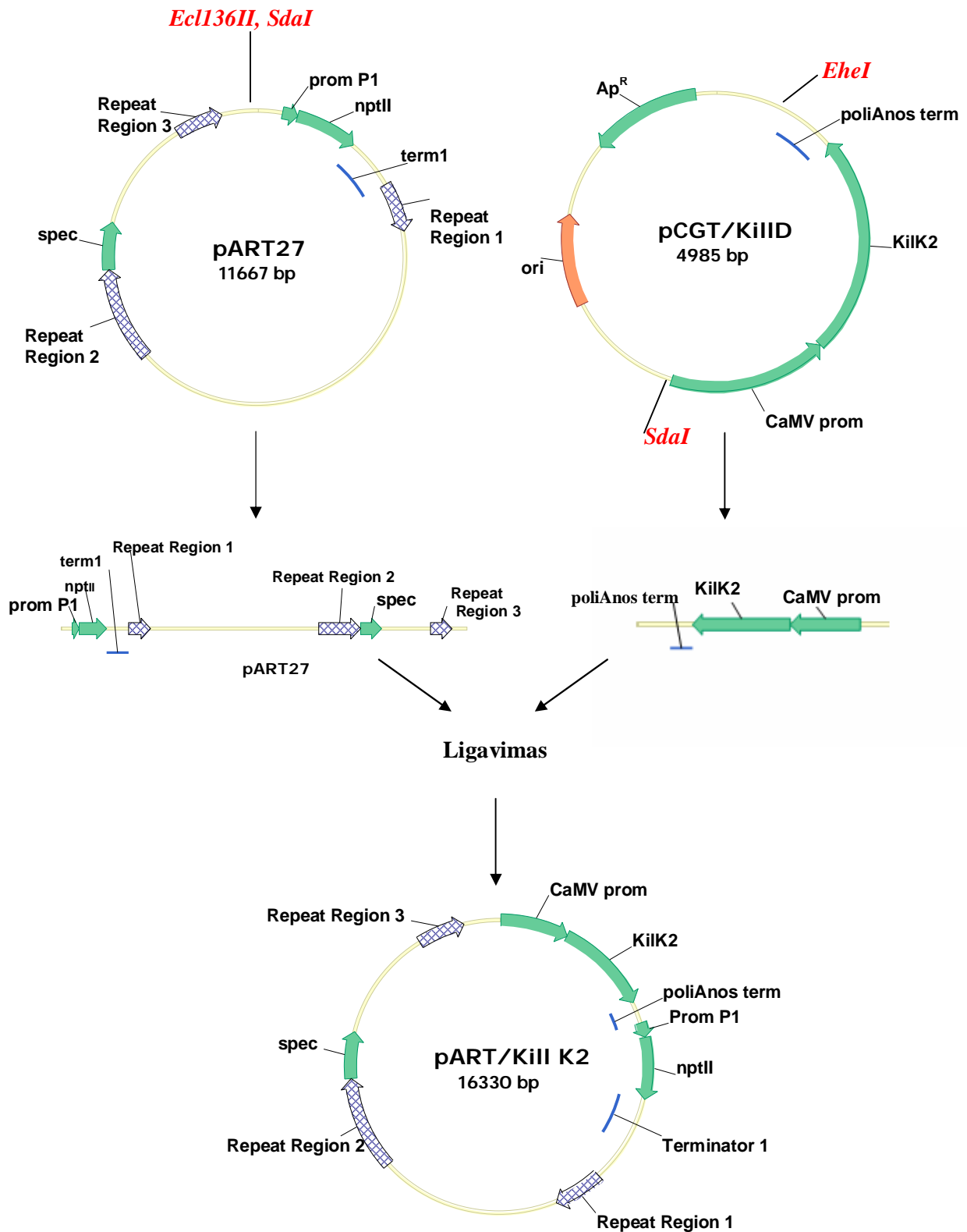
3.3.2. Plazmidžių pART/Kill K2 bei pGA/Kill K2 konstravimas.

Kadangi pCGT/Kill plazmidė netinka transformacijai į augalus, tam buvo pasirinktas pART27 vektorius, turintis augalų transformantų atrankai reikalingą selektyvų markerį – neomicinfosfotransferazės II (*nptII*) geną, kontroliuojamą nopalinsintetazės promotoriaus (prom P1) (19 pav.).



19 pav. Plazmidės pART27 restrikinė kartograma: P1 – nopalinsintetazės promotorius, *npt II* – neomicinfosfotransferazės II genas, term 1 – terminatorius, Repeat Region – pasikartojantys regionai, *spec* – genas, nulemiantys *E. coli* atsparumą spektomicinui.

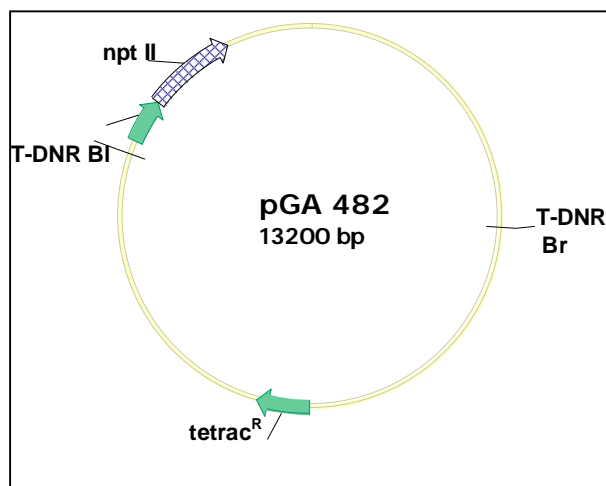
Augalinė plazmidė pART27 linearizuota restrikcijos endonukleazėmis *Ecl136III* ir *SdaI*. Iš plazmidės pCGT/Kill-D restrikcijos endonukleazėmis *EheI* bei *SdaI* iškirptas fragmentas su kilerinio preprotoksino genu, sulietu su CaMV promotoriumi ir poliAnos terminatoriumi. Po ligavimo su vektorine DNR gauta plazmidė pART/Kill K2 (20 pav.).



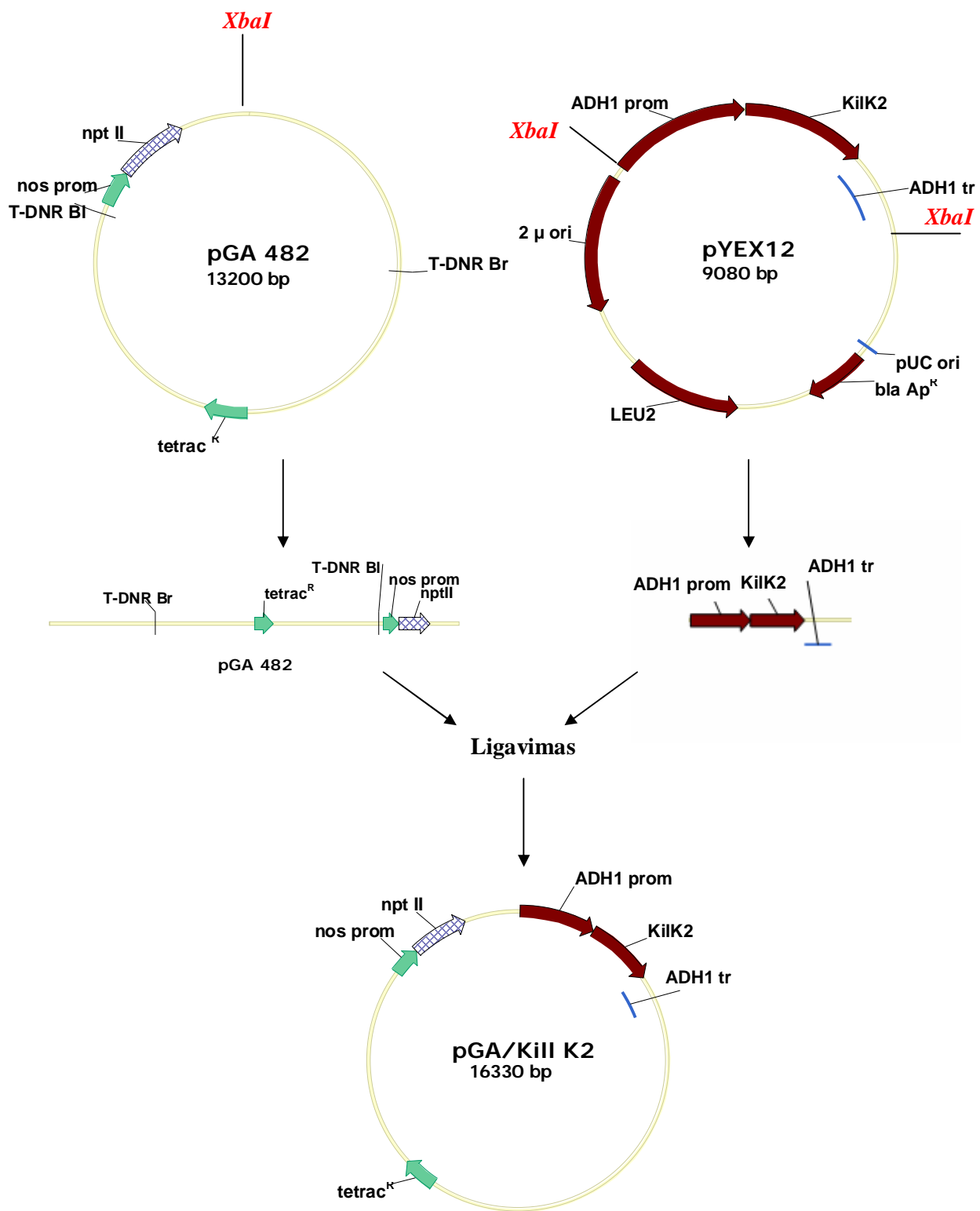
20 pav. Plazmidės pART/Kill K2 konstravimo schema: K2 kilerinio preprotoksino genas, kuriuo, šiuo atveju, veiklą užtikrina CaMV promotorius ir poliAnos terminatorius, įstatytas į augalinį vektorių pART27.

Siekiant įsitikinti, kad konstravimo metu neįvyko jokių K2 preprotoksino geno pakitimų (tikėtina, kad CaMV promotorius gali būti nesuderinamas su kileriniu genu bakterijose), buvo tikrinama pirminė nukleotidų seka, apimanti CaMV promotoriaus 3'– galinę sritį ir K2 geno 5'– dalį. Iš minėtos plazmidės buvo iškirptas tikrinamas DNR fragmentas ir įstatytas į klonavimo vektorių pUC57 bei nustatyta jo pirminė nukleotidų seka (Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre). Rezultatai parodė, kad nei CaMV promotoriuje, nei K2 preprotoksino gene pakitimų nėra.

Augalų transformavimui buvo panaudotos tiek plazmidės, kuriose K2 geno raiška reguliuojama CaMV promotoriumi, tiek ADH1 promotoriumi (teisinga raiška mielėse, bet nežinomas pasireiškimas augaluose). Todėl buvo konstruojama dar viena plazmidė, tinkama augalų transformavimui, tačiau turinti K2 preprotoksino geną, sujungtą su ADH1 promotoriumi. Šiuo tikslu augalinis ekspresijos vektorius pGA482 [Prosevičius, Žukas, 1999] (21 pav.) linearizuotas restriktaze XbaI. Taip pat restrikcijos endonukleaze XbaI iš plazmidės pYEX12 iškirptas fragmentas su kileriniu preprotoksino genu, sulietu su ADH1 promotoriumi. Po vektoriaus ir fragmento sujungimo gauta plazmidė pGA/KillK2, tinkama transformuoti į augalą *Nicotiana tabacum* (22 pav.).

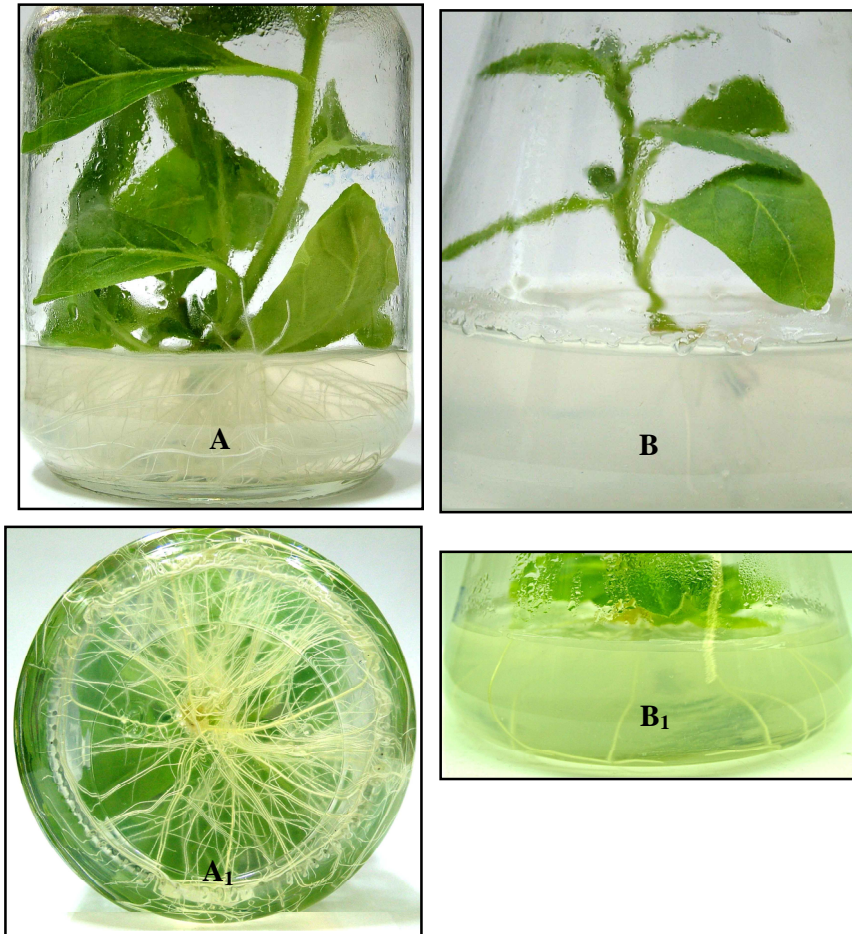


21 pav. Ekspresijos vektoriaus pGA482 restrikcinė kartograma [Prosevičius, Žukas, 1999]: *npt II* – neomicinfosfotransferazės II genas, nos prom – promotorius, T-DNR Br, T-DNR B1 – pasikartojančių nukleotidų sekos, tetrac^R – genas, nulemiantis *E. coli* atsparumą tetraciklinui.



22 pav. Plazmidės pGA/Kill K2 konstravimo schema: kilerinio preprotoksino K2 genas, ADH1 promotorius bei ADH1 terminatorius, įstatytas į augalinį vektorių pGA482.

Rekombinantinės plazmidės pART/KillK2 ir pGA/KillK2, turinčios mielių kilerinį preprotoksiną koduojantį geną, buvo perduotos GTC Botanikos Instituto Ląstelių genų inžinerijos laboratorijai, kur atlikta paprastojo tabako (*Nicotiana tabacum* L.) transformacija agrobakterijomis (*Agrobacterium tumefaciens*) ir gauti regenerantiniai augalai (23 pav.).

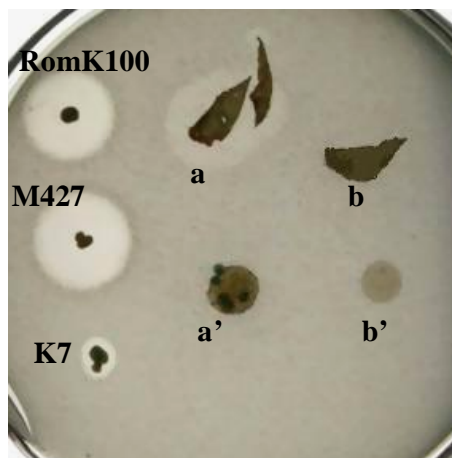


23 pav. Kontrolinių (A ir A₁) bei transformuotų plazmidėmis pART/KillK2 ir pGA/KillK2 (B ir B₁) *N. tabacum* augalų bendras vaizdas: regenerantiniuose augaluose (B ir B₁) šaknų sistema silpnai išsivysčiusi, augalas blogai auga.

Augalai, kuriuose turėtų būti mielių kilerinį preprotoksiną koduojantis genas, buvo silpni. Jie, lyginant su kontrole, netransformuota minėtomis plazmidėmis, vėliau pradėjo leisti šaknis ir prasčiau šaknijosi.

3.3.3. Kilerinio preprotoksino geno raiškos įvertinimas transgeniniuose augaluose

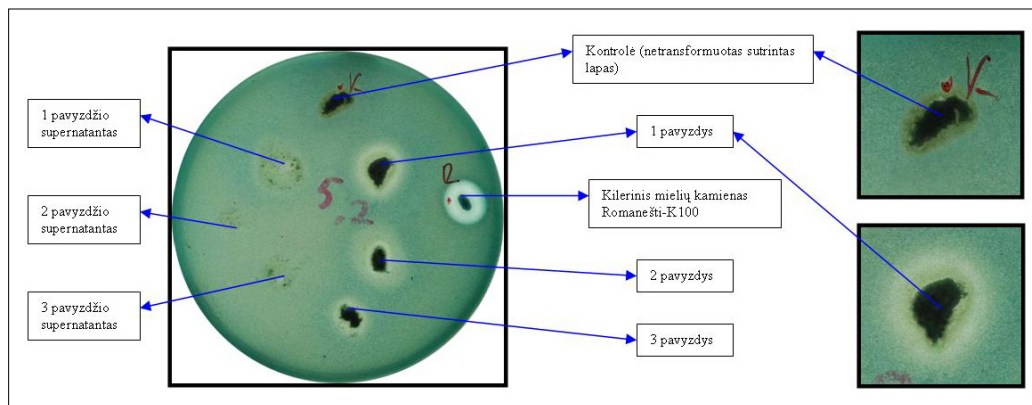
Siekiant patikrinti, ar regeneravę transformantai turi veiklų mielių kilerinį preprotoksiną koduojantį geną ir ar vyksta jo ekspresija, brendimas bei sekrecija, reikėjo atlikti kileriškumo patikrinimą. Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad K2 tipo toksino produkuojamo kamieno Romanešti K100 veikimo optimumas yra apie pH 4,0 [Lebionka ir kt., 2002], todėl iš pradžių augalų kileriškumo nustatymui buvo pasirinkta MB terpė pH 4,0. Esant tokiam pH reikšmei, lizės zonos nesusiformavo nei aplink lapų eksplantus, nei aplink sutrintų lapų pavyzdžius ar išskirtą supernatantą. Kadangi žinoma, kad standartiniai K2 tipo *S. cerevisiae* kileriniai toksinai yra aktyvūs pH esant 3,0 – 5,6, todėl augalų kilerinis aktyvumas buvo nustatomas terpėse pH esant nuo 3,0 iki 5,6. Tačiau skaidrios lizės zonos buvo matomos tik kai pH vertė 5,2 (24 pav.). Kai pH 4,8 – matomi tik aktyvumo pėdsakai.



24 pav. Mielių kilerinio geno K2 raiškos nustatymo rezultatai: Transformuoto pGA/KillK2 plazmide augalo *N. tabacum* lapo eksplantas (a) arba jo biomasė (a'); netransformuoto augalo lapo eksplantas (b) arba jo biomasė (b'), pH 5,2.

Pusiau skaidrios lizės zonos susidarė ir aplink transformuotų augalų trinto lapo pavyzdžius. Naudojant iš lapų išskirtą supernatantą, lizės zonos nesusidarė, kadangi sultys greitai išdžiūvo ir kilerinis toksinas nerodė

aktyvumo. Šiuo atveju, toksinas užneštas vienkartinė doze ir jo nepakanka, nes jis greitai degraduoja (25 pav.).



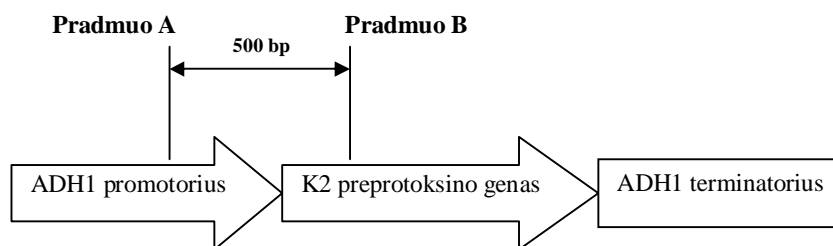
25 pav. Mielių kilerinio geno K2 raiškos nustatymo rezultatai: 1 pavyzdys – transformuoto pGA/KillK2 plazmide paprastojo tabako trintas lapas, arba jo supernatantas, 2 ir 3 pavyzdžiai – transformuoto pART/KillK2 plazmide paprastojo tabako trintas lapas ir jo supernatantas, pH 5,2.

Kadangi pusiau skaidrios lizės zonos susidarė aplink transformuotų augalų, trinto lapo pavyzdžius, o kontroliniuose pavyzdžiuose jų nematyti, galima teigti, kad transformuoto tabako lapų ląstelėse vyksta žemo lygio kilerinio geno ekspresija ir preprotoksino brendimas.

Naudojant modifikuotą Murray ir Thompson [Murray, Thompson, 1980] metodiką, sėkmingai buvo išskirta DNR iš *N. tabacum* augalų. DNR išskyrimas buvo atliekamas tik iš tokių *N. tabacum* transformuotų augalų, kurie geriausiai augo ant selektyvios terpės ir kurių šaknų sistema buvo geriausiai išsivysčiusi. DNR pavyzdžiai buvo išskirti iš transformuotų pART/KillK2 plazmide (K2 preprotoksino geno raiška turėtų būti reguliuojama žiedinio kopūsto mozaikos viruso CaMV 35S promotoriumi) *N. tabacum* augalų. Taip pat DNR pavyzdžiai išskirti iš transformuotų pGA/KillK2 plazmide (K2 geno raiška turėtų būti reguliuojama mielių alkoholdehidrogenazės ADH1 promotoriumi) *N. tabacum* augalų. Kontrolėi DNR buvo skiriama iš netransformuotų kontrolinių SR1-1C *N. tabacum* lapų.

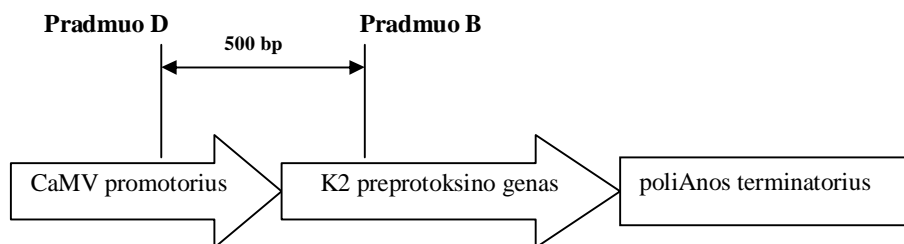
Į pGA/KillK2 plazmidę įkelto kilerinio geno vientisumo įvertinimui buvo pasirinktas tiesioginis pradmuo „ADH-kilF“, kuris jungiasi prie ADH1

promotoriaus sekos, nutolusios nuo kilerinio geno pradžios apie 250 nukleotidų. Atvirkštinis pradmuo „ADH-kilR“, kuris jungiasi prie K2 geno sekos, nutolusios apie 250 nukleotidų nuo jo pradžios (26 pav.). Amplifikacijos metu turėjo būti padaugintas apie 500 nukleotidų fragmentas, kuriame būtų ADH1 promotoriaus pabaiga ir K2 geno pradžia. Tokiu būdu būtų įrodyta, kad ši geno konstrukcija yra nepažeista ir įsiterpusi į augalo genomą. Tačiau atlikus PGR produktų elektroforetinę analizę tikslinio produkto negauta. Tai rodo, kad ekspresuojant sistemą augaluose, kilerinio geno ir ADH1 promotoriaus jungtis buvo pažeista.



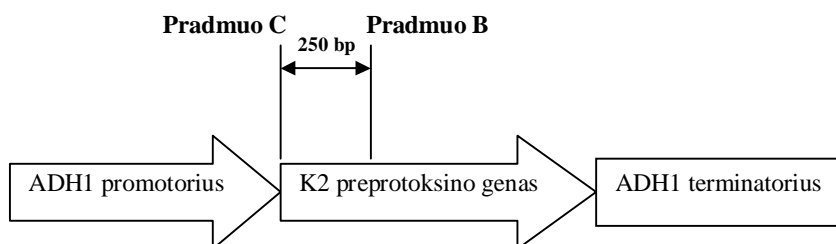
26 pav. PGR metu naudoti pradmenys transformuotų augalų su vektoriumi pGA/Kill K2 pavyzdžiams. A – tiesioginis pradmuo „ADH-kilF“ ir B – grįžtamasis pradmuo „ADH-kilR“.

Taip pat buvo nuspręsta patikrinti, ar transformuotuose pART/KillK2 plazmide, turinčia K2 geną sujungtą su žiedinio kopūsto mozaikos viruso CaMV 35S promotoriumi, augaluose neįvyko kilerinio geno ir promotorinės sekos jungties pakitimų. Buvo pasirinkti pradmenys, kurie jungiasi CaMV 35S promotoriaus 3' – galinėje srityje ir K2 geno pradžioje (27 pav.). Šios amplifikacijos metu turėjo būti padaugintas 500 bp fragmentas, kuriame būtų promotoriaus CaMV 35S pabaiga ir kilerinio geno pradžia. Tačiau tikslinio produkto negauta. Tai įrodo, kad augaluose veikiančio CaMV promotoriaus ir mielių kilerinio geno junginys suskilo. Tačiau tai nepaneigia, kad K2 genas gali būti išlikęs be promotoriaus.



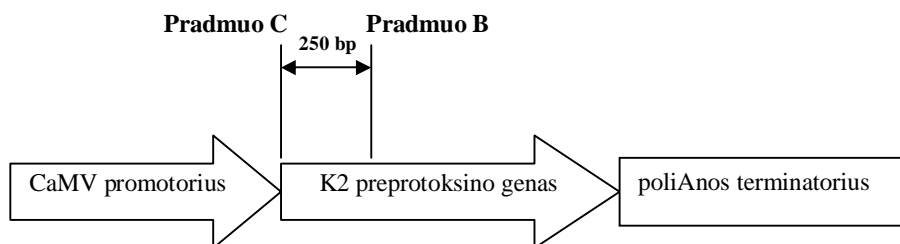
27 pav. PGR metu naudoti pradmenys transformuotų augalų su vektoriumi pART/Kill K2 pavyzdžiams. D – tiesioginis pradmuo ir B – grįžtamasis pradmuo „ADH-kilR“.

Todėl norint išsiaiškinti, ar augaluose aptinkamas kilerinio preprotoksino genas be promotoriaus, buvo nuspręsta panaudoti tiesioginį pradmenį „Oligo 1“, kuris PGR metu jungtųsi prie K2 geno 5' galo, paliekant prieš tai naudotą atvirkštinį pradmenį – „ADH-kilR“ (28 pav.).



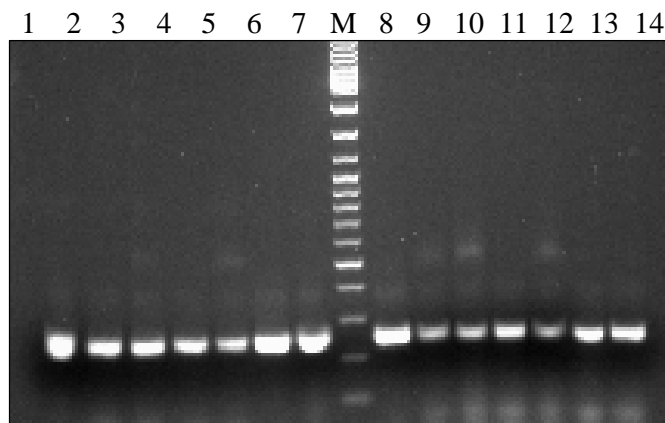
28 pav. PGR metu naudoti pradmenys transformuotų augalų su vektoriumi pGA/Kill K2 pavyzdžiams. C – tiesioginis pradmuo „Oligo 1“ ir B – grįžtamasis pradmuo „ADH-kilR“.

Su analogiškais pradmenimis („Oligo 1“ ir „ADH-kilR“) buvo atliekama transformuotų pART/KillK2 plazmide augalų DNR pavyzdžių analizė (29 pav.).



29 pav. PGR metu naudoti pradmenys transformuotų augalų su vektoriumi pART/Kill K2 pavyzdžiams. C – tiesioginis pradmuo „Oligo 1“ ir B – grįžtamasis pradmuo „ADH-kilR“.

Išanalizavus PGR elektroforezės duomenis nustatyta, kad šiomis sąlygomis amplifikacija vyko ir buvo padaugintas apie 250 nukleotidų DNR fragmentas (30 pav).



30 pav. Transformuotų augalų pGA/Kill K2 ir pART/Kill K2 vektoriais, PGR produktų elektroforezės rezultatai: 1-7 – augalinė DNR transformuota pGA/KillK2 plazmide, 8-13 – augalinė DNR transformuota pART/KillK2 plazmide, 14 – kontrolė (plazmidė pYEX12), M – markeris (Gene Ruler™ Ladder Mix).

Tokiu būdu buvo visiškai įrodyta, kad K2 kilerinio preprotoksino genas ar bent mažiausiai jo dalis yra įsiterpusi į augalo genomą.

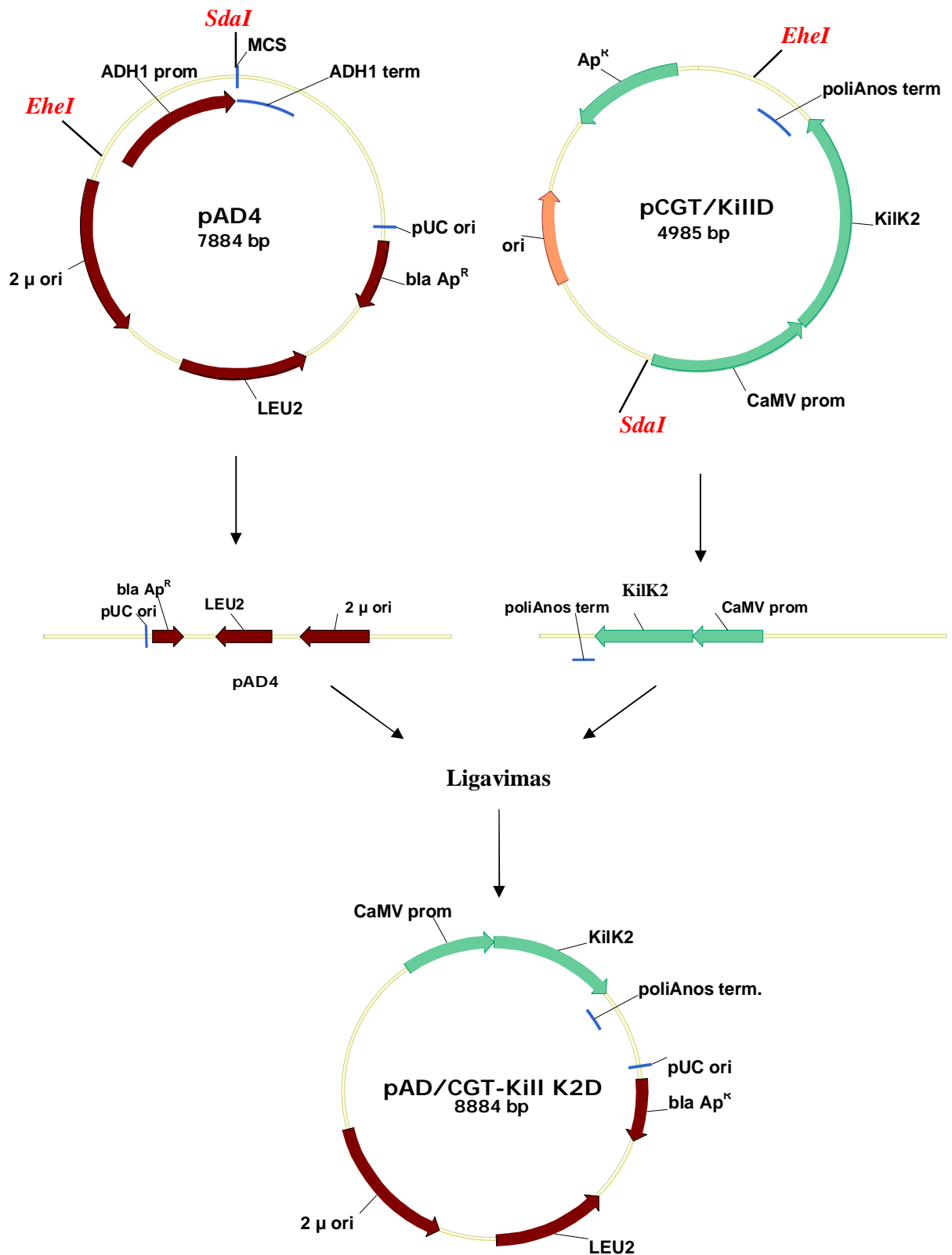
Apibendrinus visus PGR metodo ir elektroforezės rezultatus, galima teigti, kad K2 genas (arba mažiausiai jo dalis) yra įsiterpęs į augalo genomą, tačiau nei ADH1 promotoriaus (su pGA/KillK2 vektoriumi transformuotuose augaluose), nei CaMV 35S promotoriaus (su pART/KillK2 vektoriumi transformuotuose augaluose) geno pradžioje nėra. Gali būti, kad minėtai geno konstrukcijai įsiterpus į augalo genomą, promotoriai yra visai pašalinami iš jo arba jie gali būti įterpiami į kitą vietą ir nutolę nuo geno K2 pradžios.

Kadangi K2 genas koduoja preprotoksina, todėl dėl šio geno kenksmingo poveikio augalo ląstelėms ar dėl kitokių priežasčių gali pasireikšti tiek ADH1 promotoriaus, tiek CaMV 35S promotoriaus nesuderinamumas su genu, dėl ko promotoriai gali būti pašalinami. Be to, įsiterpiant į augalus geno K2 konstrukcija galėjo pakisti, pavyzdžiui, dėl promotorių krypties pakeitimo, transpozonų (judriųjų genomo elementų) įsiterpimo tarp promotoriaus ir geno sekų ir t.t. Jei kilerinio preprotoksino geno konstrukcija, įsiterpiant į augalus,

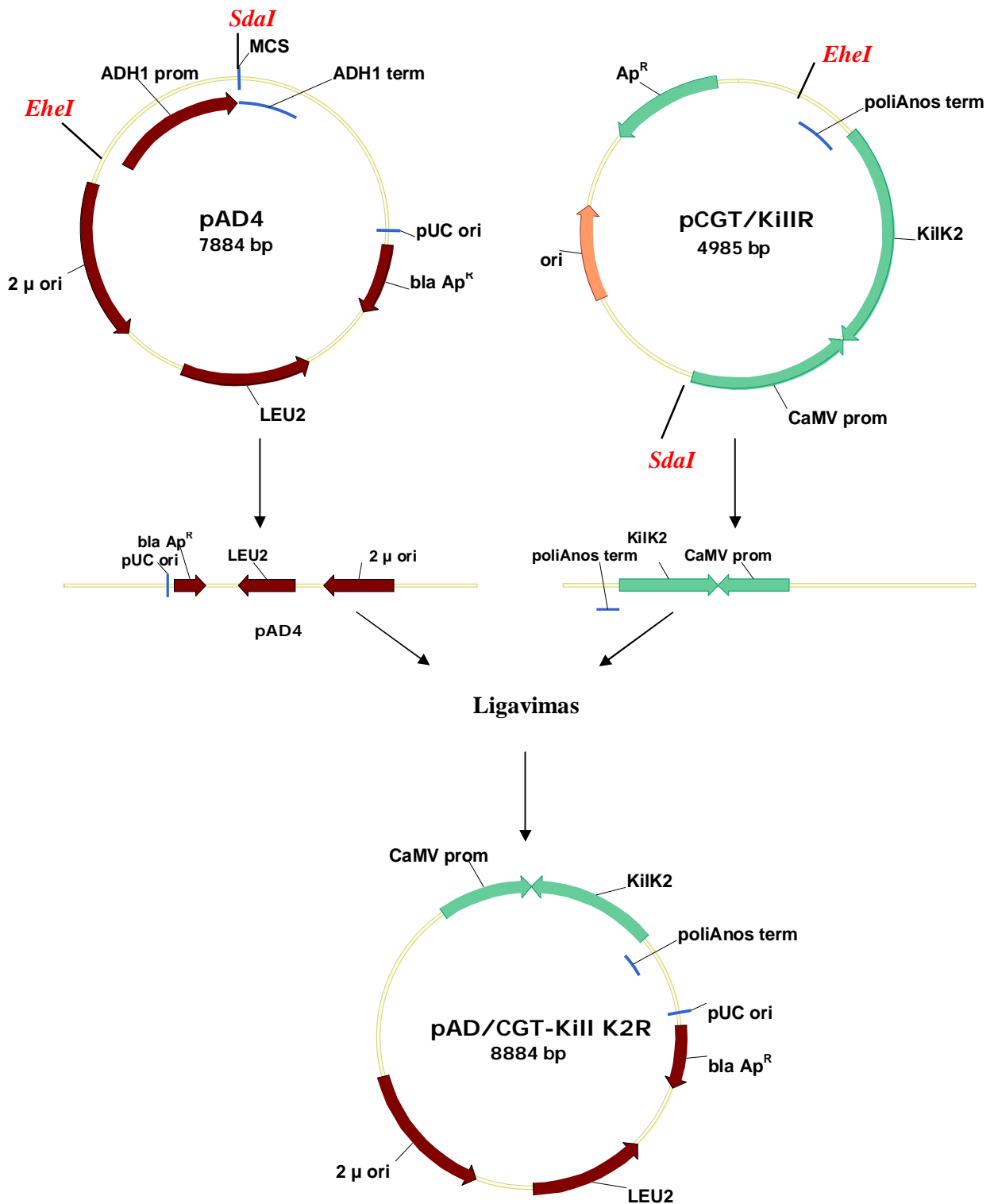
pakito, tai tikėtina, kad promotorius (ADH1 arba CaMV 35S) tiesiogiai negali atlikti geno reguliacijos. Tačiau yra žinoma, kad paties K2 geno pradinės sekos pasižymi silpnomis promotorinėmis reguliacinėmis savybėmis. Tokiu atveju toksino produkcija yra silpna. Be to, geno raišką gali sąlygoti ir nespecifinės sekos (genas funkcionuoja, net jei jis įstatytas atvirkščiai promotoriui) [Gulbinienė ir kt., 2004]. Todėl ir nesant ADH1 ar CaMV 35S promotorių, geno ekspresijos reguliaciją, manoma, gali atlikti ir kitos reguliacinės sekos, pavyzdžiui, slaptieji (kriptiniai) reguliaciniai elementai, kurie aptikti tabako ir kitų augalų genomuose, naudojant kaip vektorių T-DNR iš *Agrobacterium tumefaciens* [Rančelis, 2008]. Slaptieji reguliaciniai elementai gali veikti kaip promotoriai, transkripcijos ar translacijos enhanceriai, slaptos poliadenilinimo ar splaisingo vietos. Jie turi pakeisti vietą, nes įprastoje vietoje dažniausiai jie yra neaktyvūs. Slaptai reguliacinei nukleotidų sekai pradėti veikti gali pakakti ir mutacijos nukleotidų sekoje: vienos nukleotidų poros pakaitos į kitą arba nukleotidų poros iškritos. [Rančelis, 2008]. Taip pat šiuo metu yra žinoma, kad augaluose yra į Kex2p proteazę panašus baltymas, kuris lemia teisingą preprotoksino subrendimą, tačiau nežinoma, ar augaluose yra baltymas, pasižymintis Kex1p proteaziniu aktyvumu. Be proteazės Kex1p labai sumažėja toksino sekrecija. Gali būti, kad dėl šio netinkamo preprotoksino subrandinimo stebimas mažas kilerinio toksino aktyvumas šiame darbe transformuotuose augaluose [Choi ir kt., 2003; Hamilton ir kt., 2003].

3.3.4. Plazmidžių pAD/CGT-KillK2 konstravimas ir analizė

Gavus anksčiau minėtus rezultatus, iškilo poreikis ištirti CaMV promotoriaus veikimą mielėse *S. cerevisiae* su K2 kileriniu genu. Buvo sukonstruotos dvi plazmidės – pAD/CGT-KillK2D ir pAD/CGT-KillK2R, tinkamos mielių *S. cerevisiae* transformacijai, su kileriniu preprotoksino genu, sulietu su CaMV promotoriumi (tiesioginė-D ir atvirkštinė-R orientacija) (31, 32 pav.).



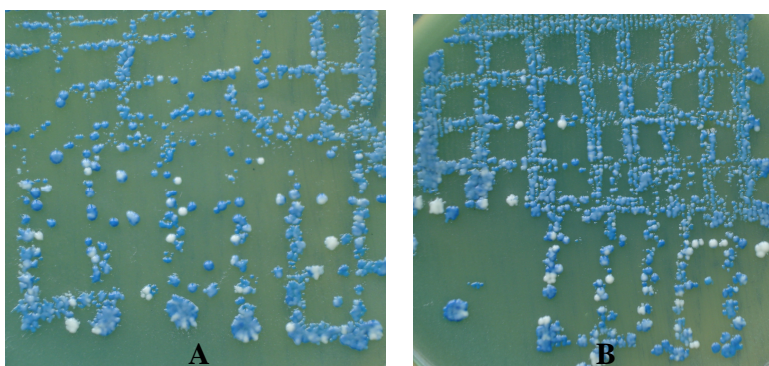
31 pav. Plazmidės pAD/CGT-KillK2D konstravimo schema: kilerinio preprotoksino genas K2, kurio veiklą užtikrina CaMV promotorius (tiesioginė orientacija), įstatytas į vektorių pAD4, kuris yra tinkamas transformacijai mielėse.



32 pav. Plazmidės pAD/CGT-KiIK2R konstravimo schema: kilerinio preprotoksino genas K2, kurio veiklą užtikrina CaMV promotorius (atvirkštinė orientacija), įstatytas į vektorių pAD4, kuris yra tinkamas transformacijai mielėse.

Vektorius, tinkamas transformacijai mielėse pAD4, linearizuotas restrikcijos endonukleazėmis EheI ir SdaI. ADH1 promotorius (1330 bp) iškirptas. Iš plazmidžių pCGT/KillD bei pCGT/KillR restriktažėmis EheI ir SdaI iškirptas 2500 bp fragmentas su K2 kileriniu genu sulietu su CaMV promotoriumi bei poliAnos terminatoriumi. Po ligavimo gautos plazmidės pAD/CGT-KillK2D ir pAD/CGT-KillK2R, kurios užtikrina K2 preprotoksino geno ekspresiją, reguliuojamą CaMV promotoriaus, tinkamos transformacijai į mieles *S. cerevisiae* (31, 32 pav.).

Išsami transformantų analizė parodė, kad jie yra padidinto savižudiškumo lygio ir pasižymi silpnomis kilerinėmis savybėmis (33 pav). Galima manyti, kad CaMV promotorius mielėse yra neveiksnus.



33 pav. Mielių *S. cerevisiae* transformantų, nešančių K2 kilerinio preprotoksino geną, sulietą su CaMV promotoriumi, analizė. Gazonas α '1, YEPD terpė, pH – 4,8: Mėlynos kolonijos rodo padidinto savižudiškumo lygį. A – K2 kilerinio geno tiesioginė-D orientacija CaMV promotoriaus atžvilgiu, B – atvirkštinė-R orientacija CaMV promotoriaus atžvilgiu.

3.3.5. CaMV promotoriaus stabilumo įvertinimas

Nors literatūroje rašoma, kad CaMV promotorius veikia efektyviai visuose augaluose, taip pat žaliuosiuose dumbliuose, mielėse bei *E. coli* bakterijose [Assaad, Signer, 1990; Lewin ir kt., 1998; Vlasak ir kt., 2003], tiriant transformantus, turinčius pAD/CGT-KillK2 plazmidės, buvo nustatytas žemas K2 kilerinio preprotoksino baltymo ekspresijos lygis. Į augalus

transformavus kilerinį geną su CaMV promotoriumi buvo aptikta, kad tabako mozaikos viruso promotoriaus nėra. Siekiant iširti pAD/CGT-KillK2D plazmidės stabilumą eukariotinėje sistemoje, atlikta minėtos plazmidės transformacija į mieles *S. cerevisiae*. Iš mielių ląstelių išskirta plazmidinė DNR ir vėl transformuota į bakterijas *E. coli*. Siekiant aptikti CaMV promotorių, panaudoti specifiniai pradmenys (pradmuo D ir pradmuo B, 27 pav.) bei atlikta PGR reakcija. Ne tik augalų, bet ir mielių ląstelėse CaMV promotorius yra „išmetamas“. Tai įrodo, kad CaMV promotorius yra nesuderinamas su mielių K2 kileriniu genu ir yra pašalinamas tiek augalinėje, tiek mielinėje sistemoje. CaMV promotoriuje yra „rekombinacijos vieta“, kurioje jis turi savybę rekombinuotis su kita DNR. Rekombinacijos vieta yra apsupta daugelio elementų, kurie dalyvauja rekombinacijoje ir panašūs į kitas rekombinacijos vietas, įskaitant ir *Agrobacterium T-DNR* vektoriaus ribas. CaMV perdavimas kitoms rūšims (horizontalus pernešimas) gali sukelti neprognozuojamą poveikį genų ekspresijai [Ho ir kt., 1999].

Remiantis laboratorijoje gautais duomenimis, galima teigti, kad K2 preprotoksino baltymo labai padidintas kiekis yra žalingas augalų ir mielių ląstelėms. Panašiai vyksta ir bakterijose, naudojant T7 RNR polimerazės sistemą, kurioje K2 preprotoksino genas įstatytas po T7 RNR polimerazės promotoriumi, gaunama labai žema geno koduojamo baltymo produkcija. Nustatyta, kad pilno ilgio kilerinį preprotoksino geną turintys konstruktai yra toksiški *E. coli* ląstelėms, o deleciniai variantai nekenkia ląstelėms (StuI delecija, 5 pav., 32 psl.). Naudojant induktorių ir šią sistemą gaunama delecinio preprotoksino produkcija, ne mažiau kaip 30 % bendro baltymo. Galima manyti, kad esant dideliui pertekliui K2 preprotoksino baltymo tiek augalų, tiek mielių ląstelėse, jo žalingumą sąlygoja ta pati sritis kaip ir *E. coli* ląstelėse.

IŠVADOS

1. Iš vaisių – uogų buvo paruošta ir išanalizuota 230 spontaninių raugų. Iš jų išskirti 17 kamienų, pasižymintys biocidiniu aktyvumu, įvertintos jų imuninės ir fungicidinės savybės, lyginant juos su mielių *S. cerevisiae* jautriais ir kileriniais kamienais.
2. Išskirtas bakterinis izoliatas, pavadintas Ux, pasižymintis neįprasta savybe – labai didele toksino produkcija esant žemoms pH reikšmėms (3,0 – 5,6), parodyta, kad izoliato toksinas gali būti panaudotas kovai su patogeniniais mikroorganizmais; išgrynintas bakterinis kamienas, pavadintas Tx, kuris pasižymi neįprasta autolize, jo toksinas pasižymi dideliu aktyvumu prieš mikromicetus, auga terpėse, kurių pH 3,0 – 7,0, todėl gali būti tinkamas biopreparatų gamybai.
3. Nustatytos išskirtų kilerinių mielių ir bakterijų izoliatų sekretuojamų toksinų geriausios raiškos temperatūros ir pH sąlygos. Parodyta, kad bakterijų bei mielių sekretuojami toksinai yra pakankamai aktyvūs terpėse, kurių pH 3,0 – 5,6, auginant jų producentus temperatūrose nuo 20 °C iki 37 °C.
4. Nustatytas rastų bakterinių izoliatų poveikis augalų, gyvūnų bei žmonių patogenams: *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Verticillium* spp., *Venturia* spp.
5. Atlikus mikrobiologinę spontaninių vaisių ir uogų raugų mikroorganizmų populiacijos analizę, atrinkti nauji mielių kileriniai kamienai (20K++, 4+, K+ob, IIx31, III-2, Spanguolė, 1M); nustatytos atskirų izoliatų kilerinės, imuninės savybės bei gamybinis perspektyvumas vyno ir etilo alkoholio pramonėje.
6. Aptiktas naujas mielių *S. cerevisiae* kilerinis kamienas 1M, kuris pasižymėjo savybėmis, reikalingomis pramoninėms vynu mielėms ir fermentuotų obuolių sulčių kokybės parametrams, ir buvo panaudotas obuolių vyno natūralaus pusgaminių gamyboje kooperatinėje bendrovėje „Vaisių sultys“.
7. Sukonstruota plazmidė pART/KillK2, nešanti mielių *S. cerevisiae* K2 kilerinį preprotoksino geną, kurio veiklą užtikrina žiedinio kopūsto mozaikos viruso rRNR 35S CaMV promotorius bei poliA nos terminatorius, yra tinkama augalų transformacijai; sukonstruota plazmidė pGA/KillK2, koduojanti K2 kilerinį preprotoksino geną, kurio veiklą užtikrina ADH1 promotorius ir ADH1 terminatorius, tinkama transformacijai į augalus.

8. Atlikus transformuoto augalo *N. tabacum*, nešančio K2 kilerinio preprotoksino geno vektorius (pART/KillK2 ir pGA/KillK2), molekulinę analizę, parodytas kilerinio geno buvimas; parodyta, kad transformuoti augalai skiriasi fenotipiškai, toksino produkcija – žemo lygio, yra pakitęs K2 kilerinio baltymo pH optimumas augaluose.
9. Sukonstruotos dvi plazmidės (pAD/CGT-KillK2D ir pAD/CGT-KillK2R), koduojančios mielių *S. cerevisiae* K2 kilerinį preprotoksino geną, kurio veiklą užtikrina žiedinio kopūsto mozaikos viruso rRNR 35S CaMV promotorius bei poliAnos terminatorius, tinkamos transformacijai į mielių ląsteles; įvertinta K2 kilerinio preprotoksino geno, reguliuojamo CaMV promotoriumi, raiška mielėse, nustatyta, kad toksino produkcija yra žemo lygio.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abdelhamid, A. M., Kelada, J. P., Ali, M. M., el-Ayouty, S. A. 1992. Influence of zearalenone on some metabolic, physiological and pathological aspects of female rabbits at two different ages. *Arch Tierernahr* 42(1): 63-70.
- Almeida, I., Martins, H. M., Marques, M. F., Magalhaes, S., Bernardo, F. 2010. Mycobiota and Ochratoxin A in laboratory mice feed: preliminary study. *Vet Res Commun* 34(4): 381-386.
- Argueso, J. L., Carazzolle, M. F., Mieczkowski, P. A., Duarte, F. M., Netto, O. V., Missawa, S. K., Galzerani, F., Costa, G. G., Vidal, R. O., Noronha, M. F., Dominska, M., Andrietta, M. G., Andrietta, S. R., Cunha, A. F., Gomes, L. H., Tavares, F. C., Alcarde, A. R., Dietrich, F. S., McCusker, J. H., Petes, T. D., Pereira, G. A. 2009. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res* 19(12): 2258-2270.
- Assaad, F. F., Signer, E. R. 1990. *Cauliflower mosaic virus* p35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 223(3): 517-520.
- Ausubel, F. M. 1999. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Baeza, M., Sanhueza, M., Cifuentes, V. 2008. Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biol Res* 41: 173-182.
- Baliukonienė, V., Bakutis, B. 2002. Kviečių ir miežių mikotoksikologinis įvertinimas sandėliavimo metu. *Veterinarija ir zootechnika* 17(39): 14-22.
- Baulcombe D. C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* 8: 1833-1844.
- Bevan, E. A., Makower, M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc XIth Int Congr Genet* 1: 518-527.
- Billiau, A. 2009. Penicillin in Belgium 1945-1952. *Verh K Acad Geneeskdg Belg* 71(4): 165-203.
- Birnboim, H. C., Doly, J. A. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Boone, C., Bussey, H., Green, D., Thomas, D. Y., Vernet, T. 1986. Yeast killer toxin: site-directed mutation implicate the precursor protein as the immunity component. *Cell Biol* 46: 105-113.

- Bostian, K. A., Elliot, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., Tipper, D. J. 1984. Sequence of the preprotoxin ds RNA gene of type 1 killer yeast: multiple processing events produce a two component toxin. *Cell Biol* 36: 741-751.
- Boyko, A., Molinier, J., Chatter, W., Laroche, A., Kovalchuk, I. 2010. Acute but not chronic exposure to abiotic stress results in transient reduction of expression levels of the transgene driven by the 35S promoter. *N Biotechnol* 27(1): 70-77.
- Breinig, F., Sendzik, T., Eisfeld, K., Schmitt, M. J. 2006. Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(10):3810-3815.
- Bussey, H. 1991. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol* 5: 2339-2343.
- Candido, R. C., Fischman, O., Zaror, L., Ito I. Y. 1995. The differentiation of *Candida albicans* strains by the killer system. *Rev Soc Bras Med Trop* 28(4): 321-324.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bacci, M., Bueno, O. C., Hebling, M. J. A., Middelhoven, W. J. 2002. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol* 47(3): 259-262.
- Ceccato–Antonini, S. R., Tosta, Ch. D., da Silva, A. C. 2004. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. *Braz Arch Biol Technol* 47(1): 13-23.
- Chandel, A. K., Narasu, M. L., Chandrasekhar, G., Manikyam, A., Rao, L. V. 2009. Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3. *Bioresour Technol* 100(8): 2404-2410.
- Chebotar, V. K., Makarova, N. M., Shaposhnikov, A. I., Kravchenko, L. V. 2009. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations. *Prikl Biokhim Microbiol* 45(4): 465-469.
- Choi, B. K., Bobrowicz, P., Davidson, R. C., Hamilton, S. 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *PNAS* 100(9): 5022-5027.
- Čitavičius, D., Inge–Večtomov, S. G. 1972. Množestvennyje mutanty u drožžej *Saccharomyces cerevisiae*. I. Polučeniye i obščaja charakteristika. *Genetika* 1: 95-102.

- Colussi, P. A., Specht, C. A., Taron, C. H. 2005. Characterization of a nucleus encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71(6): 2862-2869.
- Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 238: 235-240.
- Comitini, F., Mannazzu, I., Ciani, M. 2009. *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific beta-glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb Cell Fact* 8: 55.
- Daly, K. M., Upton, M., Sandiford, S. K., Draper, L. A., Wescombe, P. A., Jack, R. W., O'Connor, P. M., Rossney, A., Gotz, F., Hill, C., Cotter, P. D., Ross, R. P., Tagg, J. R. 2010. Production of the Bsa lantibiotic by community acquired *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 192(4): 1131-1142.
- Daw, M. A., Falkiner, F. 1996. Bacteriocins: nature, functions and structure. *Micron* 27: 467-479.
- De Ingeniis, J., Raffaelli, N., Ciani, M., Mannazzu, I. 2009. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol* 75(4): 1129-1134.
- de la Pena, P., Barros, F., Goscon, S., Lazo, P. S., Ramos. 1981. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 256(20): 10420-10425.
- de Souza, E. L., da Silva, C. A., de Sousa, C. P. 2005. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservative. *Braz arch biol technol* 48(4): 559-566.
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D., Thomas, D. J. 1991. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet* 227: 127-136.
- Donini, M., Lico, C., Baschieri, S., Conti, S., Magliani, W., Polonelli, L., Benvenuto, E. 2005. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a potato virus X expression system. *Appl Environ Microbiol* 71: 6360-6367.
- Егоров, Н. С., Баранова, И. П. 1999. Бактериоцины. Образование, свойства, применение. *Антибиотики и химиотерапия* 6: 33-40.
- El-Mehalawy, A. A., Gebreel, H. M., Rifaat, H. M., El-Kholy, I. M., Humid, A. A. 2008. Effect of antifungal compounds produced by certain bacteria on

- physiological activities of human and plant pathogenic fungi. *J Appl Sci Res* 4(4): 425-432.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A. 1998. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *Internatl Microbiol* 1: 143-148.
- Flegelova, H., Novotna, D., Vojtiskova, K. 2002. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Res* 2(1): 73-79.
- Fried, H. M., Fink, G. R. 1978. Electron microscopic heteroduplex analysis of killer double-stranded RNA species from yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(9): 4224-4228.
- Gedminienė, G. 2006. Mikrobiologijos pagrindų laboratoriniai darbai. Vilniaus Gedimino Technikos Universitetas. Fundamentinių mokslų fakultetas. Chemijos ir bioinžinerijos katedra. Technika: 88 p.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. V., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274(5287): 546, 563-567.
- Golas, T. M., Sikkema, A., Gros, J., Feron, R. M. C., van den Berg, R. G., van der Weerden, G. M., Mariani, C., Allefs, J. J. H. M. 2010. Identification of a resistance gene *Rpi-dlc* to *Phytophthora infestans* in European accessions of *Solanum dulcamara*. *Theor Appl Genet* 120(4): 797-808.
- Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, L., Vaughan-Martini, A., Buzini, P. 2009. In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol* 131(2-3): 178-182.
- Gulbinienė, G., Jokantaitė, T., Melvydas, V. 2001. Influence of yeast K2 killer preprotoxin gene mutations on phenotype of transformants. *Biologija* 4: 7-9.
- Gulbinienė, G. 2002. Characterization of the functional organization of yeast K2 killer preprotoxin gene. *Biologija* 3: 37-40.
- Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Servienė, E., Melvydas, V. 2003. Search for a novel killer strains in spontaneous fruit and berry wine fermentation. *Horticulture and Vegetable Growing* 22(3): 518-527.
- Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Melvydas, V. 2004. The dependence of K2 killer gene expression on 5'-flanking region context. *Biologija* 2 (2 priedas): 1-3.

- Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Jokantaitė, T., Servienė, E., Melvydas, V., Petkūnienė, G. 2004. Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technology and Biotechnology* 3: 159-163.
- Guyard, C., Seguy, N., Cailliez, J. C., Drobecq, H., Polonelli, L., Dei-cas, E., Mercenier, A., Menozzi, F. D. 2002. Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* 49(6): 961-971.
- Hamidimotlagh, R., Nahvi, I., et al. 2007. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianis* and their cocultures. *African Journal of Biotechnology* 6(9): 1110-1114.
- Hamilton, S. R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R. C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J. H., Rausch, S., Stadheim, T. A., Wischnewski, H., Wildt, S., Gerngross, T. U. 2003. Production of complex Human glycoproteins in yeast. *Science* 301: 1244-1246.
- Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, Ch., Hamida, J. B., Fliss, I. 2010. Bactibase second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol* 10: 22.
- Harris, D. M., Westerlaken, I., Schipper, D., van der Krogt, Z. A., Gombert, A. K., Sutherland, J., Raamsdonk, L. M., van den Berg, M. A., Bovenberg, R. A., Prienk, J. T., Daran, J. M. 2009. Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. *Metab Eng* 11(2): 125-137.
- Hernandez, A., Martin, A., Cordoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., Perez-Nevado, F. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from elaboration of seasoned green table olives. *Int J Food Microbiol* 121(2): 178-188.
- Ho, M. W., Ryan, A, Cummins, J. 1999. Cauliflower mosaic viral promoter – a recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease* 11(4): 194-197.
- Hysek, J., Vach, M., Javurek, M. 2005. Biological protection of the main cereals against fungal specific diseases. *Commun Agric Appl Biol Sci* 70(3): 169-173.
- Iglesias, M., Ballesta, J. P. 1994. Mechanism of resistance to the antibiotic trichothecin in the producing fungi. *Eur-J-Biochem* 223(2): 447-453.
- Ira, M., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T., Vainstein, A. 2010. Non – transgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol*.

- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-168.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jokantaitė, T., Laurinavičienė, D., Bistrickaitė, G. 1982. Investigation of new killer and neutral systems in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 11-th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology, Montpellier, France 47.
- Jung, K. H. 2007. Growth inhibition effect of pyroligneous acid on pathogenic fungus, *Alternaria mali*, the agent of *Alternaria* blight of apple. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12(3): 318-322.
- Kabak, B. 2009a. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment. *Food Chem Toxicol* 47(2): 348-352.
- Kabak, B., Brandon, E. F., Var, I., Blokland, M., Sips, A. J. 2009b. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B(1) and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *J Environ Sci Health B* 44(5): 472-480.
- Kekkonen, R. A., Kajasto, E., Miettinen, M., Veckman, V., Korpela, R., Julkunen, I. 2008. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN-gamma production. *World J Gastroenterol* 14(8): 1192-1203.
- Kinal, H., Park, C. M., Berry, J. O., Koltin, Y., Bruenn, J. A. 1995. Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *The Plant Cell* 7: 677-688.
- Kondratienė, L., Gulbinienė, G., Servienė, E., Melvydas, V. 2003. Search for novel killer strains in spontaneous fruit and berry wine fermentation. *Horticulture and Vegetable Growing* 3: 518-527.
- Kristoffersen, P., Jensen, G. B., Gerdes, K. 2000. Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. *Appl Environ Microbiol* 66(12): 5524-5526.
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., Adhikari, D. K. 2009. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IPE453. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(12): 1483-1489.

- Kurzawinska, H., Mazur, S. 2007. The effect of *Pythium oligandrum* and chitozan used in control of potato against late blight and the occurrence of fungal diseases on tuber peel. *Commun Agric Appl Biol Sci* 72(4): 967-971.
- Lacorte, C., Ribeiro, S. G., Lohuis, D., Goldbach, R., Prins, M. 2010. Potatovirus X and *Tobacco mosaic* virus based vectors compatible with the Gateway cloning system. *J Virol Methods* 164(1-2): 7-13.
- Lapa, S. V., Reva, O. M. 2005. Some properties of *Bacillus subtilis* strains active against rotting agents on strawberries and fruit. *Microbiol Z* 67(1): 22-31.
- Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., Lam, B. A., Harris, R. N. 2008. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal* 2: 145-157.
- Lebionka, A., Servienė, E., Melvydas, V. 2002. Isolation and purification of yeast *Saccharomyces cerevisiae* K2 killer toxin. *Biologija* 4: 7-9.
- Lee, H., Damsz, B., Woloshuk, C. P., Bressan, R. A., Narasimhan, M. L. 2010. Identification of *Fusarium oxysporum* genes that control cell wall properties using the plant defense protein, osmotin. *Eucariot cell* [epub ahead of print].
- Leibowitz, M. J., Wickner, R. B. 1976. A chromosomal gene required for killer plasmid expression, mating and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2061-2065.
- Leung, M. C., Diaz-Llano, G., Smith, T. K. 2006. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *J Agric Food Chem* 54(26): 9623-9635.
- Lewin, A., Jacob, D., Freytag, B., Appel, B. 1998. Gene expression in bacteria directed by plant-specific regulatory sequences. *Transgenic Res* 7: 403-411.
- Li, J., Yang, Q., Zhao, L., Zhang, S., Wang, Y., Zhao, X. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University – Science B* 10: 264-272.
- Li, N., Erman, M., Pangborn, W., Duax, W. L., Park, C. M., Bruenn, J., Ghosh, D. 1999. Structure of *Ustilago maydis* killer toxin KP6 alpha-subunit. A multimeric assembly with a central pore. *J Biol Chem* 274(29): 20425-20431.
- Liu, S. Q., Tsao, M. 2009. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *Saturnus*. *Int J food Microbiol* 131: 280-282.

- Liužinas, R., Paunksnytė, I. 2008. Biotechnologijos aplinkosaugoje. 11 – osios Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos „Mokslas – Lietuvos ateitis“, straipsnių rinkinys: 25-35.
- Lolle, S., Skipper, N., Bussey, H., Thomas D. Y. 1984. The expression of cDNA clones of yeast M1 double-stranded RNA in yeast confers both killer and immunity phenotypes. *EMBOJ* 3: 1383-1387.
- Lowes, K. F., Shearman, C. A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D. B., Merry, R. J., Gasson, M. J. 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl Environ Microbiol* 66(3): 1066-1076.
- Magliani, W. S., Conti, M., Gerloni, D., Berlotti, D., Polonelli, L. 1997. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 10: 369-400.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M. 2002. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol* 5(2): 65-71.
- Masteikienė, R. R. 2002. Maisto produktų mikrobiologija. Vadovėlis. 1 knyga. Leidykla „Technologija“, Kaunas.
- McLaughlin, J. E., Bin-Umer, M. A., Tortora, A., Mendez, N., McCormick, S., Tumer, N. E. 2009. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a critical role for the mitochondria in the toxicity of a trichothecene mycotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(51): 21883-21888.
- Mehlgarten, C., Zink, S., Rutter, J., Schaffrath, R. 2007. Dosage suppression of the *Kluyveromyces lactis* zymocin by *Saccharomyces cerevisiae* ISR1 and UGP1. *FEMS Yeast Res* 7(5): 722-730.
- Melvydas, V., Černyšova, O., Gedminienė, G., Bernotaitė, L. 2005. Possible new killer yeast strains and their primary analysis. *Botanica Lithuanica* 11(4): 241-246.
- Melvydas, V., Šakalytė, J., Paškevičius, A., Gedminienė, G. 2007. Search for biological control agents against *Candida* yeasts and other dermatomycetes. *Biologija* 1: 45-50.
- Melvydas, V., Servienė, E., Černyšova, O., Petkunienė, G. 2007. A novel X factor secreted by yeast inhibits *Saccharomyces cerevisiae* K1, K2 and K28 killer toxins. *Biologija* 53(2): 32-35.

- Melvydas, V., Servienė, E., Kondratienė, L., Černyšova, O. 2009. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains in Lithuania. *Botanika Lithuanica* 15(3): 209-215.
- Meškauskas, A. 1991. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* K2 tipo preprotoksino geno struktūra ir ekspresija. Disertacija gamtos mokslų daktaro laipsniui gauti.
- Meškauskas, A., Čitavičius, D. 1992. K2 type killer toxin and immunity encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene* 111: 135-139.
- Meškauskienė, V., Melvydas, V. 2007. Primary analysis of new measures against fungal diseases of woody plants. *Biologija* 53(1): 50-53.
- Mizuno, R., Ichinose, H., Maehara, T., Takabatake, K., Kaneko, S. 2009. Properties of ethanol fermentation by *Flammulina velutipes*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(10): 2240-2245.
- Murray, M., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res* 8: 4321-4325.
- Napoli, C., Marcotrigiano, V., Pagliarone, C. N., Montagna, M. T. 2009. Mycotoxins in food: legislation and thresholds. *Ig sanita Pubbl* 65(6): 607-620.
- Narbutaitė, V., Juodeikienė, G., Nielsen, P. V. 2007. Pieno rūgšties bakterijų *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus hilgardii* antipelėsinis aktyvumas. *Maisto chemija ir technologija* 41(2): 51-57.
- Naumova, T. I., Naumov, G. I. 1973. Sravnitel'naja genetika drožžej. Soobščenie XII. Izučenie antagonističeskikh otnošenij u drožžej roda *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika* 9: 85-90.
- Novotná, D., Flegelová, H., Janderová, B. 2004. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 4(8): 803-813.
- Osho, A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *African Journal of Biotechnology*. 4(7): 660-662.
- Pastor, F. J., Guarro, J. 2008. *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect*. 14(8): 734-746.
- Pestka, S., Langer, J. A., Samuel, C. E. 1987. Interferon and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-777.

- Pfeiffer, P., Radler, F. 1984. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch Microbiol* 137: 357-361.
- Philliskirk, G., Young, T. W. 1975. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leevenhoek* 41(2): 147-151.
- Pileckis, S. 1994. *Sodo kenkėjai ir ligos*. Knyga. Mokslo ir enciklopedijų leidykla, Vilnius.
- Polonelli, L., Dettori, G., Cattell, C., Morace, G. 1987. Biotyping of micelial fungus cultures by the killer system. *Eur J Epidemiol* 3(3): 237-242.
- Polonelli, L., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Morace, G., Chezzi, C. 1991. Interfaces of the yeast killer phenomenon. *Crit Rev Microbiol* 18: 47-87.
- Pretorius, I. S., du Toit, M., van Rensburg, P. 2003. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st Century. *Food Technol Biotechnol* 41: 3-10.
- Prosevičius, J., Žukas, K. 1999. Expression of gene *Taq* 1R in transgenes of tobacco *Nicotiana tabacum* L. *Biologija* 3: 70-72.
- Qazi, J. I., Qaiser, N., Bano, A. S. 2009. Isolation of antifungal bacteria from soil samples. *Mycopath* 7(1): 5-10.
- Qureshi, J. A., Michaud, J. P. 2005. Interactions among three species of cereal aphids simultaneously infesting wheat. *J Insect Sci* 5: 13.
- Riffer, F., Eisfeld, K., Breinig, F., Schmitt, M, J. 2002. Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* 148: 1317-1328.
- Rodriguez-Cousino, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., Ramirez, M. 2011. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (Klus) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol*. Epub ahead of print.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N. D., Baker, S. E., Machida, M., Yu, J., Georgianna, D. R., Dean, R. A., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Wortman, J. R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P, Denning, D. W., Nierman, W. C. 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology* 59: 11-17.
- Romano, A., Vitullo, D., Di Pietro A., Lima, G., Lanzotti, V. 2011. Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain B07. *J Nat Prod*. Epub ahead of print.

- Ross, A. C., Liu, H., Pattabiraman, V. R., Vederas, J. C. 2010. Synthesis of the lantibiotic lactocin S using peptide cyclization on solid phase. *J Am Chem Soc* 132(2): 462-463.
- Rumbold, K., van Buijsen, H. J., Overkamp, K. M., van Groenestijn, J. W., Punt, P. J., van der Werf, M. J. 2009. Microbial production host selection for converting second-generation feedstocks into bioproducts. *Microb cell Fact* 8: 64.
- Рыбчин, В. 1999. Основы генетической инженерии. 2-е издание. Издательство СПбГТУ, Санкт-Петербург.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Sanford, J. C., Johnston, S. A. 1985. The concept of parasite derived resistance. *J Theoret Biol* 113(2): 395-405.
- Sartakova, I., Gedminienė, G., Melvydas, V. 2004. K2 preprotoksino geno tandemo įtaka jo raiškiai mielėse *Saccharomyces cerevisiae*. 7-oji Lietuvos jaunujų mokslininkų konferencija: Lietuva be mokslo – Lietuva be ateities: 126-131.
- Sathe, S. J., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P. K., Kapadnis, B. P. 2007. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *J Appl Microbiol* 103: 2622-2628.
- Sangorin, M. P., Zajonskovsky, I. E., Lopes, C. A., Rodriguez, M. E., Giraudo de van Broock, M. R., Caballero, A. C. 2001. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from northwestern Patagonia (Argentina). *J. Basic Microbiol* 41(2): 105-113.
- Schmitt, M. J., Tipper D. J. 1990. K28, a unique double-stranded RNR killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 4807-4815.
- Schmitt, M. J. 1995. Cloning and expression of a cDNA of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet* 246: 236-246.
- Schmitt, M. J., Tipper, D. J. 1995. Sequence of the M28 dsRNA : preprotoxin is processed to an α/β heterodimeric protein toxin. *Virology* 213: 341-351.
- Schmitt, M. J., Einfeld, K. 1999. Killer viruses in *Saccharomyces cerevisiae* and their general importance in understanding eukaryotic cell biology. *Recent Res Devel Virol* 1: 525-545.
- Schmitt, M. J., Breinig, F. 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26(3): 257-276.

- Schmitt, M. J., Breinig, F. 2006. Yeast viral toxins: lethality and self-protection. *Nature reviews Microbiology* 4: 212-221.
- Schneider, T., Sahl, H. G. 2010. An oldie but a goodie-cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol* 300(2-3): 161-169.
- Scholthof, H. B., Scholthof, K. B., Jackson, A. O. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol* 34: 299-323.
- Selitreffnikoff, C. P. 2001. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol* 67(7): 2883-2894.
- Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., Goldstein, S. A. 2001. Immunity to K1 killer toxin : internal TOK1 blockade. *Cell* 105: 637-644.
- Servienė, E., Melvydas, V. 1999. Restriction analysis and investigation of expression of formed by recombination *in vivo* DNA plasmids pYEXBK-1 and pYEXBK-2. *Biologija* 2: 14-17.
- Servienė, E., Lebonka, A., Melvydas, V. 2002. Influence of carbon source on the expression of the *S. cerevisiae* K2 killer preprotoxin gene. *Biologija* 2: 72-75.
- Sherman, J. F., Fink, G. R., Hicks, J. B. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Silva, G. M., Silveira, F. R., Pires, M. F. 2007. Adherence to HeLa cell, typing by killer toxin and susceptibility to antifungal agents of *Candida dubliensis* strains. *Braz Oral Res* 21(1): 87-91.
- Skipper, N., Thomas, D. Y., Lau, P. 1984. Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of the yeast M1 double-stranded RNA. *EMBO J* 3: 107-111.
- Snyder, C., Seguy, N., Lafitte, S., Guyard, C., Polonelli, L., Cailliez, J. C., Grzych, J. M. 1999. Production of anti-toxin antibodies by immunization with *Pichia* killer toxin-like antiidiotypic monoclonal antibodies. *J Eukaryot Microbiol* 46(5): 138.
- Somers, J. M., Bevan, E. A. 1969. The inheritance of the killer character in yeast. *Genet Res* 13: 71-83.
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A., Phaff, H. J. 1987. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian journal of microbiology* 33(9): 783-796.

- Sutkevičius, J., Černauskas, A. 2003. Pelėsinių grybų įtaka karvių sveikatai ir kai kurioms kepenų funkcijoms. *Veterinarija ir Zootechnika* 23(45): 51-54.
- Šakalytė, J., Paškevičius, A., Ložienė, K. 2007. Eterinių aliejų įtaka patogeninėms *Candida* Berkhout gentiems mielėms. *Laboratorinė medicina* 4(36): 165-170.
- Tamura, M., Kiaura, K., Yunoki, K., Matsumoto, O., Takakuva, N., Oda, Y., Ohnishi, M. 2006. Simultaneous production of sphingolipids and ethanol by *Kluyveromyces thermotolerans*. *Folia Microbiol* 51(3): 191-195.
- Tao, J., Ginsberg, I., Banerjee, N., Koltin, Y., Held, W., Bruenn, J. A. 1990. The *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae* and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol* 10: 1373-1381.
- Tchana, A. N., Moundipa, P. F., Tchouanguep, F. M. 2010. Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. *Int. J Environ. Res. Public Health* 7: 178-188.
- Tharayil, N. 2009. To survive or to slay: Resource-foraging role of metabolites implicated in allelopathy. *Plant Signal Behav* 4(7): 580-583.
- Tipper, D. J., Bostian, K. A. 1984. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol* 5: 2331-2338.
- Trasher, J. D., Crawley, S. 2009. The biocontaminants and complexity of damp indoor spaces: more than what meets the eyes. *Toxicol Ind Health* 25(9-10): 583-615.
- Ueta, E., Kodama, M., Sumino, Y., Kurome, M., Ohta, K., Katagiri, R., Naruse, I. 2010. Gender-dependent differences in the incidence of ochratoxin A-induced neural tube defects in the Pdn/Pdn mouse. *Congenit Anom (Kyoto)* 50(1): 29-39.
- Versilovskis, A., De Saeger, S. 2010. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods an overview. *Mol Nutr Food Res* 54(1): 136-147.
- Vlasak, J., Šmahel, M., Pavlik, A., Pavingerova, D., Bliza, J. 2003. Comparison of hCMV immediate early and CaMV 35S promoters in both plant and human cell. *J Biotechnol* 103: 197-202.
- Walker, G. M., McLeod, A. H., Hodgson, V. J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett* 127(3): 213-222.
- Watanabe, K., Sakai, Y., Takezaki, T., Ogawa, A. 1988. Bacterial interference in mixed infection in the rat bladder. *Urol Int* 43: 2-6.

- Wickner, R. B. 1986. Double-stranded RNA replication in yeast: the killer system. *Annu Rev Biochem* 55: 373-395.
- Wickner, R. B. 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60: 250-265.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., Graham, M. W. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469-3478.
- Yang, Z., Chen, H., Tang, W., Hua, H., Lin, Y. 2011. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. *Pest Manag Sci*. Epub ahead of print.
- Zakharov, I. A., Kožin, S. A., Kožina, T. N., Fedorova, I. V. 1976. *Sbornik metodik po genetike drožžej - sakharomicetov*. Nauka, Leningrad.
- Zhang, H., Zhang, Z., van der Lee, T., Chen, W. Q., Xu, J., Xu, J. S., Yang, L., Yu, D., Waalwijk, C., Feng, J. 2010. Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3ADON producers in southern China. *Phytopatology* 100(4): 328-336.
- Zhu, H., Bussey, H. 1989. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol* 55: 2105-2107.
- Zhu, H., Bussey, H. 1991. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol* 11: 175-181.

Mokslinių darbų sąrašas:

Melvydas, V., Servienė, V., Čapukoitienė, B., Petkūnienė, G., Lebionka, A. 2006. Toksinus produkuojančių mikroorganizmų paieška ir jų antipatogeninių savybių pradinis tyrimas. SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ **25(2)**: 91-98.

Melvydas, V., Gedminienė, G., Jarmalaitė, I., Čapukoitienė, B., Nemceva, L. 2006. Initial analysis of highly competitive yeast strains promising for ethanol industry. BIOLOGIJA **3**: 63-66.

Čapukoitienė, B., Karalius, V., Servienė, E., Prosevičius, J., Melvydas, V. 2008. Exspression of yeast *Saccharomyces cerevisiae* K2 preprotoxin gene in transgenic plants. SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ **27(2)**: 319-327.

Melvydas, V., Gedminienė, G., Čapukoitienė, B., Pilevičienė, S., Lebionka, A. 2009. Investigation of killer and adhesive properties of new microorganisms originated from Lithuania and Polar Ural. BOTANICA LITHUANICA **15(3)**: 217-223.

Čapukoitienė, B., Gedminienė, G., Melvydas, V., Kondratienė, L., Levinskaitė, L. 2010. Influence of the temperature and pH medium on the killer features of the bacterial isolates from spontaneous fermentations of berries and fruits gathered on territory of Lithuania. Вести Национальной академии наук Беларуси **4**: 276-279.

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės:

Čapukoitienė, B., Černyšova, O., Melvydas, V. Naujas mielių sekretuojamas X faktorius. Respublikinė konferencija „Lietuvos biologinė įvairovė: būklė, struktūra, apsauga“ skirta VPU Botanikos katedros 60–mečiui, 2005.

Čapukoitienė, B., Lebionka, A., Melvydas, V. Naujų kilerinių kamienų paieška gamtinėse populiacijose bei kolekcijose. IX–asis suvažiavimas–konferencija. „Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė“. Lietuva, Tolieja (Molėtų raj.), 2006.

Čapukoitienė, B., Karalius, V., Servienė, E., Prosevičius, J., Melvydas, V. Exspression of yeast *Saccharomyces cerevisiae* K2 preprotoxin gene in transgenic plants. International scientific conference „Actualities in plant physiology“, Lithuanian Institute of Horticulture, Lithuanian University of Agriculture, Kaunas, 2008.

Melvydas, V., **Čapukoitienė, B.**, Gedminienė, G., Kurtinaitienė, B., Beniulytė, J. Ekspres metodas mielių rauginimo galimybės įvertinti. X–asis suvažiavimas–konferencija „Biochemija ir sistemų biologija“. Lietuva, Tolieja (molėtų raj.), 2008.

Čapukoitienė, B., Gedminienė, G., Melvydas, V., Kondratienė, L., Levinskaitė, L. Influence of the temperature and pH medium on the killer features of the bacterial isolates from spontaneous fermentations of berries and fruits gathered on territory of Lithuania. Молодеж в науке – 2009, международная научная конференция молодых ученых. Национальная академия наук Беларуси, Минск, 2009.

Priedai:

1 priedas



DAP-PL-3328.99

NACIONALINĖ
VETERINARIJOS LABORATORIJA

J.Kairiūkščio g.10, LT-08409 Vilnius
Tel. (370-5) 2780470 Faks. (370-5) 2780471

TYRIMŲ PROTOKOLAS Nr. 332 Ch1-3

Protokolo puslapių skaičius: 1 iš 1

Mėginių gavimo data	2007 01 15
Mėginių savininkas, adresas	Botanikos institutas, įm.k. 211953920, Žaliųjų ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius
Tyrimų trukmė	2007 01 15 - 18
Mėginių aprašymas	1-3. Vyno raugas (Nr. I, II, III), 3 mėg. po 0,5L. Pagaminta 2007 01 15, tinka vartoti 1 mėn.
Mėginių paėmimo tvarka	Aktas, 2007 01 15. Įgaliotas asmuo V.Melvydas
Mėginius pristatė	V.Melvydas

TYRIMŲ REZULTATAI

Mėginio Nr.	1	2	3	
Etilo alkoholio kiekis, tūrio %	17,39	16,96	14,97	EEB reglamentas Nr. 2676/90, p.3
Metilo alkoholio kiekis, g/l a.a.	0,228	0,246	0,487	LST EN 1536:2004 (Dujų chromatografijos metodas)
Mėginio Nr.	1	2	3	
<u>Aukštesnieji alkoholiai, g/l a.a.:</u>				LST EN 1536:2004 (Dujų chromatografijos metodas)
2-metilbutilo alkoholis	0,300	0,205	0,483	
3-metilbutilo alkoholis	2,565	1,349	2,794	
Propilo alkoholis	0,160	0,706	0,250	
Izo butilo alkoholis	0,635	0,314	0,845	
2-Butilo alkoholis	< 0,009	< 0,009	< 0,009	
n-Butilo alkoholis	0,032	0,027	0,029	
Mėginio Nr.	1	2	3	
<u>Aldehidai, g/l a.a.:</u>				LST EN 1536:2004 (Dujų chromatografijos metodas)
Etanalis (acetaldehido ir acetalio suma)	0,176	0,116	0,479	
Mėginio Nr.	1	2	3	
<u>Esteriai, g/l a.a.:</u>				LST EN 1536:2004 (Dujų chromatografijos metodas)
Metilacetatas	< 0,009	< 0,009	< 0,009	
Etilacetatas	0,615	0,529	0,407	

Paaikškinimas: Nr. ...Ch - cheminiai tyrimai.
Ženklas < nurodo, kad ieškomos analitės kiekis yra mažesnis už nustatymo ribą, t.y. už kiekį, kurį galima nustatyti naudojamu metodu.

Tyrimų rezultatai yra susiję tik su pateiktu mėginiu.
Be rašiško laboratorijos sutikimo protokolo dalys negali būti padaugintos.

Protokolo pasirašymo data 2007 01 18

Parašai:

Laboratorijos vadovas

(skyriaus vedėjas)

Atsakingas asmuo

Skyriaus vedėja

Inga Jarmalaitė

2 priedas



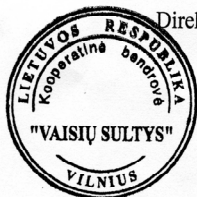
KOOPERATINĖ BENDROVĖ "VAISIŲ SULTYS"

Kodas 122224190 Arimų g. 29 LT-11114 Vilnius Tel.2 67 02 15 El. Paštas: vaisiusultys@vaisiusultys.lt
A/s LT 574010044100080134 AB bankas NORD / LB Lietuva

2007 m. gegužės 17d. Nr. 05-92

PAŽYMA

Iš Botanikos instituto Genetikos laboratorijos gautas mielių kamienas *S.cerevisiae* 1M, buvo panaudotas KB „Vaisių sultys“ specialios technologijos vaisių ir uogų vynų gamybai. Naudojant šį mielių kamieną, buvo išrauginta (paruošta, fermentuota) 558276 l obuolių vyno natūralaus pusgaminių nuo 2006 m. balandžio mėn. iki 2007 m. gegužės mėn. *S.cerevisiae* 1M kamienas pasižymėjo tinkamom gamybinėm savybėm ir davė ekonominį efektą.



Direktorius

Jonas Krunis

Laboratorijos viršininkė

Irena Žalienė

Tel. 2671519

3 priedas

LIETUVOS RESPUBLIKOS ŽEMĖS ŪKIO MINISTRAS

ĮSAKYMAS

DĖL ŽEMĖS ŪKIO MINISTRO 2003 M. BALANDŽIO 7 D. ĮSAKYMO NR. 3D-139 „DĖL SPIRITINIŲ GĖRIMŲ GAMYBOS, TVARKYMO IR PREKINIO PATEIKIMO TECHNINIO REGLAMENTO PATVIRTINIMO“ PAKEITIMO

2010 m. rugsėjo 8 d. Nr. 3D-806

Vilnius

Fizikiniai ir cheminiai rodikliai

Rodiklio pavadinimas	
Metilo alkoholio ne daugiau kaip g/l	0,15
Aldehydų, perskaičiuotų į acetaldehidą, ne daugiau kaip g/l	0,5
Aukštesniųjų alkoholių (fuzelių), ne daugiau kaip g/l	8,0
Esterių, perskaičiuotų į etilacetatą, ne daugiau kaip g/l	0,5

Padėkos:

Dėkoju visiems, kas palaikė ruošiant šį darbą:

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovui dr. Vytautui Boleslovui Melvydui už jo vadovavimą, išsamias konsultacijas, paskatinimą ruošiant šį darbą, idėjas ir tinkamus patarimus.

Dėkoju Botanikos Instituto Genetikos laboratorijos kolektyvui: dr. Elenai Servienei, Irmai Orentaitei, Laimai Kondratienei, Česei Prosevičienei, Danguolei Rastenienei, Ievai Bružauskaitei už įdomias diskusijas, komentarus, rūpestį bei nuolatinę pagalbą.

Dėkoju savo šeimai bei draugams už kantrybę ir toleranciją.

Finansinė parama:

LVMSF stipendija **2006-2009 m.**

Prioritetinių Lietuvos mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros krypčių programa **“Augalų adaptyvumas ir jo reguliavimas biotechnologinėmis priemonėmis (ABIOTECHA).” 2003–2006 m.**

Mokslininkų grupių projektas **“Naujų biologinių priemonių prieš žalingus mikromicetus charakterizavimas ir pritaikymo galimybių įvertinimas”.** **2008 m.**