

Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze na površini stanice kvasca *S. cerevisiae*

Švec, Danijel

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:736425>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Danijel Švec

6908 / BT

EKSPRESIJA REKOMBINANTNE KSILOZA REDUKTAZE
NA POVRŠINI STANICE KVASCA *S. cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biokemija

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze
na površini stanice kvasca *S. cerevisiae***

Danijel Švec, 0058204851

Sažetak: *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najčešće korištenih mikroorganizama u biotehnološkoj proizvodnji, pa se tako koristi i u proizvodnji ksilitola, prirodnog zaslađivača s velikim prehrambenim prednostima. Enzim odgovoran za mikrobiološku proizvodnju ksilitola, ksiloza reduktaza, katalizira reakciju redukcije ksiloze u ksilitol. Ksiloza reduktaza prirodno je lokalizirana u citoplazmi stanice kvasca što znači da izolacija finalnog proizvoda uključuje razbijanje stanice i više koraka pročišćavanja. Zbog relativno malog prinosa i kompleksnog pročišćavanja ksilitol na tržištu ima visoku cijenu. Tema ovog rada jest ekspresija i imobilizacija heterologne rekombinantne ksiloza reduktaze na površini stanice kvasca čime bi se izolacija proizvoda olakšala, a cijena konačnog proizvoda snizila. U tu je svrhu iskorišten protein Pir4, protein stanične stijenke kvasca, s kojim je ksiloza reduktaza fuzionirana i preko kojeg je vezana na staničnu stijenku. U radu je ispitana uspješnost ekspresije i ugradnje u stijenku te aktivnost tako imobiliziranog rekombinantnog enzima.

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, ksiloza reduktaza, Pir4, rekombinantni protein

Rad sadrži: 38 stranica, 9 slika, 2 tablice, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izvanredni profesor dr. sc. Renata Teparić

Pomoćpri izradi: Mag. ing. Mateja Lozančić

Datum obrane: 18. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Expression of the recombinant xylose reductase on the surface of yeast cell *S. cerevisiae*

Danijel Švec, 0058204851

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most used microorganisms in biotechnological production, so it's also used in production of xylitol, natural sweetener with many nutritional advantages. Enzyme responsible for microbiological production of xylitol, xylose reductase, catalyses the reduction reaction of xylose to xylitol. Xylose reductase is naturally localized in yeast cell cytoplasm meaning that the isolation of the final product includes breaking the yeast cell and several steps of purification. Because of low yield and complexity of purification, xylitol has high price on the market. Theme of this thesis is expression and immobilization of heterologous recombinant xylose reductase on the surface of yeast cell meaning that the isolation of product would be easier and the price lower. For that purpose yeast cell wall protein Pir4 is fused with xylose reductase serving as anchor through which xylose reductase binds to the yeast cell wall. In this thesis, the efficacy of expression and incorporation of the immobilized recombinant enzyme to the cell wall is examined, as well as its activity.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, xylose reductase, Pir4, recombinant protein

Thesis contains: 38 pages, 9 figures, 2 tables, 65 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Associate Professor PhD Renata Teparić

Technical support and assistance: MSc Mateja Lozančić

Defence date: 18th of September 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Stanična stijenka	2
2.1.1. Unutarnji sloj.....	3
2.1.2. Vanjski sloj.....	5
2.2. Metabolizam ksiloze	11
2.3. Svojstva kvaščeve ksiloza reduktaze.....	12
2.4. Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze.....	14
2.5. Industrijska proizvodnja ksilitola	16
2.5.1. Kemijska proizvodnja	17
2.5.2. Biotehnološka proizvodnja	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Kemikalije	20
3.2. Sastav otopina i pufera	20
3.3. Soj kvasca	21
3.4. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca.....	22
3.5. Plazmid korišten u radu.....	22
3.6. Metode	23
3.6.1. Transformacija kvasca korištenjem LiAc.....	23
3.6.2. Izolacija staničnih stijenki kvasca	24
3.6.3. SDS i NaOH tretman izoliranih stijenki – priprema uzoraka za elektroforezu	24
3.6.4. SDS elektroforeza	25
3.6.5. Western blot	25
3.6.6. Mjerenje aktivnosti sa stanicama kvasca	26
3.6.7. Mjerenje aktivnosti sa stanicama kvasca pri različitim temperaturama	26

4. REZULTATI	27
4.1. Transformacija stanice kvasca	27
4.2. Ekspresija proteina na staničnoj stijenci.....	27
4.3. Detekcija aktivnosti ksiloza reduktaze.....	28
4.4. Mjerenje aktivnosti u ovisnosti o temperaturi	29
5. RASPRAVA	30
6.ZAKLJUČCI	33
7. LITERATURA	34

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostaničan je mikroorganizam karakterističnog jajolikog oblika koji spada u carstvo *Fungi*, koljeno *Ascomycetes*. Kolokvijalno ga se često naziva pivskim ili pekarskim zbog primjene upravo u pivarskoj i pekarskoj industriji. Prvi je mikroorganizam čiji je genom potpuno sekvenciran zbog čega je do danas najkorišteniji modelni mikroorganizam za konstrukciju raznovrsnih mutanata. Prisutan je na površinama biljaka, gastrointestinalnog trakta te na površinama tijela insekata i toplokrvnih životinja, u raznovrsnim tlima diljem svijeta, pa čak i u vodenom okolišu.

Koristi se od davnina u pekarstvu i pivarstvu. Zapisi o proizvodnji piva datiraju još iz vremena drevnih sumerskih civilizacija, a u pravilu se pivarskim drevnim središtima smatraju Mezopotamija, Armenija i Egipat čija je tradicija proizvodnje piva kasnije preuzeta od strane Grka i Rimljana. Paralelno s korištenjem u pivarstvu, razvija se i korištenje u pekarstvu te vinarstvu. Temelj tih industrijskih grana jest visoka sposobnost fermentacije koju kvasac posjeduje, a prati ju vrlo brz rast i visoko iskorištenje šećera poput glukoze. Prednost kvasca je i da je tolerantan na niske razine kisika, kao i visoke koncentracije etanola.

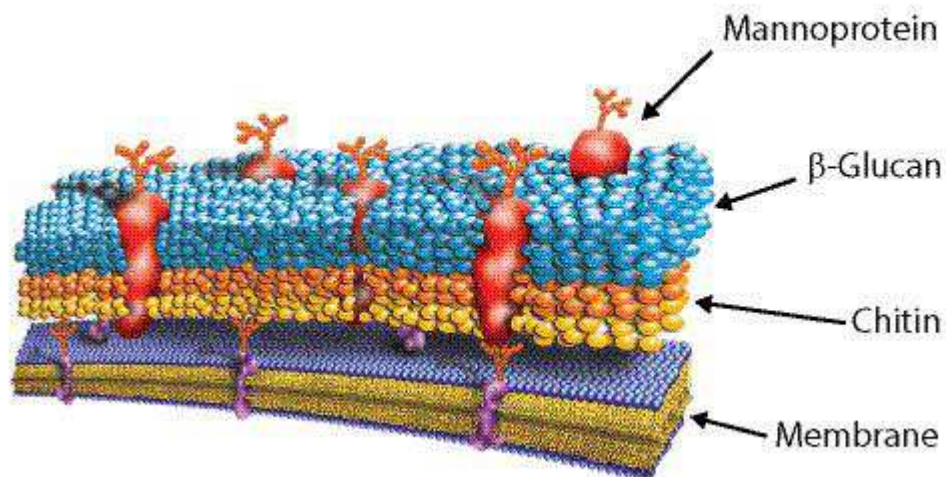
Potpunim sekvenciranjem genoma dolazi do dominacije nad ostalim kvascima u primjeni u području genetičkog inženjerstva. Uz bakteriju *E. Coli*, najkorišteniji je mikroorganizam. Potpuno poznavanje njegovog genoma dopušta konstrukciju velikog spektra mutanata koji se vrlo često koriste u biotehnoškoj svrhe.

U ovom radu ispitana je mogućnost upotrebe stanice kvasca kao nosača rekombinantnog enzima ksiloza reduktaze, koji katalizira reakciju redukcije ksiloze u ksilitol, u ovom slučaju lokaliziranog na površini stanice. Ksiloza je, uz glukozu, dominantna sastavnica celulozne biomase. Upotrebom ovog rekombinantnog enzima izloženog na površinu stanice kvasca bila bi omogućena jeftinija i jednostavnija biotehnoška proizvodnja ksilitola koji je u širokoj uporabi kao zaslađivač prirodnog porijekla. Ksiloza reduktaza jest nativno prisutna u samoj stanici kvasca, međutim, zbog premale količine ksiloze koju kvasac može apsorbirati i zahtjevnog pročišćavanja produkta, biotehnoška proizvodnja ksilitola iz ksiloze nije do sada ostvarena.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Stanična stijenka

Stanična stijenka kvasca je kompleksna struktura koju istovremeno odlikuje čvrstoća kojom podnosi visok osmotski tlak, ali i fleksibilnost potrebna za dinamičke promjene stanice tokom različitih životnih događaja (rast, parenje, sporulacija). Kompleksnost njezine strukture temeljena je na vezama između β -glukana i manoproteina, uz male količine hitina, koje formiraju dva njezina specifična sloja - unutarnji i vanjski (*Teparić, 2010.*). Na slici 1. predstavljen je pojednostavljeni prikaz strukture stanične stijenke, navedene su osnovne molekule koje ju formiraju te je prikazana membrana iznad koje se nalazi.



Slika 1. Molekularni prikaz strukture stanične stijenke kvasca.

(<http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 9. kolovoza 2017.)

Temeljem svoje kompleksne strukture stanična stijenka odgovorna je za niz funkcija. Vrlo bitno je da stanica spriječi prodor vode iz okoliša do kojeg bi došlo zbog veće osmolalnosti citoplazme stanice u usporedbi sa izvanstaničnom tekućinom. Prevelik ulazak vode u stanicu poremetio bi njezin metabolizam, a naposljetku doveo i do bubrenja koje bi stvaralo preveliku napetost plazma membrane te bi ona u jednom trenutku puknula i izazvala smrt stanice. Zato su stanice kvasca, kao i stanice ostalih gljiva, razvile dodatni zaštitni sloj, čvrstu stijenku čiji se tlak opire osmotskom tlaku i sprečava prodor vode u stanicu. Osim savladavanja osmotskog tlaka, stanična stijenka isto tako ublažava i fizički stres stanice.

Distribucijom mehaničkog pritiska na stanicu umanjuje njegov efekt, djeluje amortizacijski, te time sprečava bilo kakva oštećenja stanice. Oblik stanice izravan je rezultat djelovanja stanične stijenke. Stanica kvasca uglavnom raste u ovalnom obliku, ali zbog nedostatka određenih hranjivih sastojaka tokom uzgoja može doći do promjena u morfologiji pa se, na primjer, stanica kvasca izdužuje kad nema dovoljno dušika. Isto tako, sastav stijenke reagira i na feromone stanice partnera za razmnožavanje pa dolazi do promjena kojima se prilagođava oblik stanice. Stanična stijenka djeluje i kao zaštitni sloj. Sastavnice stanične stijenke, glikoproteini i njihovi N-glikozidno vezani bočni lanci, ograničavaju propusnost stijenke za makromolekule i time sprečavaju kontakt polisaharida u stijenci sa proteinima iz okoliša stanice i ograničavaju formirani mikrookoliš uz samu plazma membranu. Visok stupanj glikozilacije, kao i velika količina negativnog naboja fosfatnih grupa u pobočnim ograncima, pridonose i regulaciji ulaska molekula iz okoline u samu stanicu (*Klis i sur., 2006.*).

2.1.1. Unutarnji sloj

Unutarnji sloj odgovoran je za mehaničku čvrstoću stijenke. Njega čine prvenstveno β -1,3-glukan, β -1,6-glukan te hitin.

β -1,3-glukan je razgranati polimer s prosječno 1500 molekula glukoze, obično do 600 nm veličine. β -1,3-glukan spada u skupinu takozvane obitelji „šupljeg heliksa“ – skupine molekula čija je struktura nalik spiralno oblikovanoj žici. Takva je struktura iznimno fleksibilna što znači da može mijenjati svoju izduženost, a to objašnjava činjenicu čvrstoće, ali i elastičnosti stijenke (*Rees, 1971.*). Strukturu β -1,3-glukana potvrdili su Krainer i suradnici (1994.) koristeći ^{13}C - NMR na živim stanicama.

Spomenuti broj od 1500 molekula glukoze odnosi se na stanice u stacionarnoj fazi. Za sintezu β -1,3-glukana stanica koristi dva enzimska kompleksa β -1,3-glukan sintaza, a razina ekspresije jednog ili drugog ovisi o fazi rasta i izvoru ugljika korištenom u uzgoju. Stupanj polimerizacije i razgranatosti lanaca u zreloj dobi stanice je umjeren što istovremeno sprečava pretjeranu kristalizaciju β -glukana, ali omogućava i stabilne vodikove veze između samih lanaca preko slobodnih ostataka čime je ostvarena forma trodimenzionalne mreže (*Klis i sur., 2002.*). Oba kompleksa β -1,3-glukan sintaza sadrže Fks1, Gsc2/Fks2 i Fks3 proteine ovisno o fazi životnog ciklusa. Fks1 protein ekspimiran je tokom vegetativnog rasta, Fks2 protein ekspimiran je tokom sporulacije, dok je Fks3 protein neistražen. To su

transmembranski proteini esencijalni za sintezu β -1,3-glukana (*Mazur i sur., 1995.*). Pretpostavlja se da proteini Fks predstavljaju katalitičke podjedinice kompleksa, ali ne sadrže UDP-Glc specifično vezno mjesto (*K/RXGG*) nađeno kod glikogen-sintaze ili α -1,3-glukan sintaze (*Furukawa i sur., 1993.*). β -1,3-glukan sintaza aktivira se pomoću senzornog proteina Wsc1 preko Rom2 proteina, a inhibira djelovanjem Lrg1 proteina iz grupe Rho1 proteina (*Watanabe i sur., 2002.*). Uloga tih proteina jest i vođenje novosintetiziranih glukanskih lanaca kroz plazma membranu prema površini stanice. To je potvrdila elektronska mikroskopija kojom su viđena vlakna duljine 5 nm u nastajanju, a potom i agregaciji s unutarnjim slojem stanične stijenke (*Moor, 1963.*).

Nije poznato produžuju li se lanci β -1,3-glukana na reducirajućem ili nereducirajućem kraju. S obzirom da je potvrđena polimerizacija na nereducirajućem kraju supstrata procesivnih glikozil-transferaza poput hitina, celuloze ili homogalakturonana, pretpostavlja se da takav mehanizam reakcije ima i β -1,3-glukan sintaza. Osim toga, time bi reducirajući kraj bio slobodan za vezanje s PIR proteinima stijenke ili procesirajućim enzimima poput BgI2. β -1,3-glukan sintetizira se kao ravnolančana molekula pa su za razgranjenje takve molekule potrebni procesirajući enzimi. Isto tako, takvi enzimi potrebni su da bi se molekula β -1,3-glukana integrirala u već postojeću glukansku mrežu. Smatra se da u skupinu tih enzima spadaju proteini poput Gas1 (endotransglikozilaze odgovorne za produživanje i preraspodjelu lanaca) i BgI2 (endotransglikozilaze odgovorne za sintezu intralančanih β -1,6-glikozidnih veza) (*Goldman i sur., 1995.*).

Uz β -1,3-glukan, dio unutarnjeg sloja je i β -1,6-glukan, visokorazgranati, vodotopljivi polimer građen od prosječno 130 molekula glukoze. Uloga β -1,6-glukana jest povezivanje β -1,3-glukanske mreže i proteina stanične stijenke koji se u stijenku vežu preko ostatka glikozil-fosfatidil-inozitolnog (GPI) sidra. GPI je kratkolančani lipid vezan na C-terminalni kraj proteina. Javlja se kao jedna od posttranslacijskih modifikacija. Dakle, β -1,6-glukan služi kao svojevrsni posrednik u povezivanju β -1,3-glukana s drugim molekulama. Sintezu β -1,6-glukana provodi UDP-glukoza ovisni enzim β -1,6-glukan sintaza koja povezuje oko 130 monomernih jedinica glukoze (*Orlean, 2012.*). Razina β -1,6-glukana u unutarnjem sloju stijenke jako varira i ovisi o aktivnosti proteina lokaliziranih u endoplazmatskom retikulumu, u Golgijevom aparatu i na površini stijenke. Uloga pojedinih enzima u sintezi još nije potpuno razjašnjena. Neke od hipoteza pretpostavljaju da su proteini endoplazmatskog retikuluma bitni jer je to organela u kojoj započinje sinteza molekule, da je „primer“ za sintezu formiran u plazma membrani te da je uspješnost sekrecije za koju je odgovoran Golgijev aparat nužna za zauzimanje aktivnog oblika molekule (*Klis i sur., 2002.*).

Osim β -1,6-glukana, dodatna molekula zastupljena u unutarnjem sloju stijenke je hitin. Hitin se javlja u obliku dva antiparalelna lanca, uglavnom oko ožiljaka na stanici (nakon pupanja). To je polimer građen od otprilike 190 molekula N-acetilglukoamina. Hitin je strukturno vrlo sličan α -celulozi upravo zbog oblika dva antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama koji se nereducirajućim krajevima vežu za β -1,3-glukan i β -1,6-glukan.

Sinteza hitina strogo je regulirana. Temelji se na djelovanju tri hitin-sintaze, hitin sintaze I (Chs1), hitin sintaze II (Chs2) i hitin sintaze III (Chs3), aktivirane i locirane u plazma membrani, a sama razina hitina u sloju vrlo je varijabilna. Agregacija hitina u sloj, vezanje na reducirajuće krajeve ostataka β -1,3-glukanske mreže, odvija se odmah nakon citokineze. Uglavnom je količina takvog hitina mala (1-2 % suhe tvari stanične stijenke). Međutim, taj postotak raste i do 20 % u slučaju oslabljene stanične stijenke i aktivnog mehanizma spašavanja stanice.

U trenutku kad je stanica spremna za pupanje, hitin sintaza formira hitinski prsten iz kojeg, naposljetku, apikalno raste pup. Hitinski prsten, vezan na β -1,3-glukansku mrežu, posljedično definira debljinu spone između pupa i stanice majke uz stabilizaciju stijenke same stanice majke. Kad je stanica majka spremna za pupanje, hitin sintaza III producira hitin koji ocrta mjesto ožiljka. Stanična stijenka se na tom mjestu počinje stanjivati i upravo to formira takozvani ožiljak na samoj površini stijenke. Na tom mjestu dolazi do apikalnog rasta pupa. Osim inicijacije pupanja stanice, sintetizirani hitin s vremenom, širenjem centripetalno od postojećeg prstena, obilježava i početak neovisnosti pupa o stanici majci formiranjem primarnog septuma. Primarni septum počinje izvana i iznutra prekrivati sekundarni, a kad je on potpuno formiran, stanica kćer ekspirira hitinazu koja razgrađuje hitinski primarni sloj što, uz sudjelovanje drugih degradacijskih enzima, dovodi do odvajanja stanice kćeri od stanice majke ostavljajući na njoj trajni ožiljak.

2.1.2. Vanjski sloj

Bitna sastavnica stanične stijenke je, osim unutarnjeg, i vanjski sloj. Vanjski sloj odgovoran je za hidrofobnost, permeabilnost, naboj, seksualna obilježja i patogenost (na primjer, kod *Candida albicans*) stanice. Glavna kemijska sastavnica sloja su manoproteini koji u bočnim ograncima imaju vezane raznovrsne supstituente koji pridonose kemijskoj raznolikosti stanične stijenke. Manoproteini u staničnoj stijenci kvasca visoko su glikozilirani proteini. Molekula manoproteina je polipeptid koji ima vezan manan, razgranati polimer manoze. Udio

ugljikohidrata u molekuli je od 50 do 95 % (*Orlean, 1997.*). Aminokiselinski ostaci vezani su na manozu O- ili N- glikozidnim vezama preko asparaginskih, odnosno, treoninskih ili serinskih ostataka. N-glikozidni lanci prekrivaju površinu stanične stijenke i sprečavaju kontakt vanjskih molekula sa unutarnjim slojevima stijenke. O-glikozilacija je vrlo bitna za pravilno formiranje stanične stijenke. Narušavanje O-glikozilacije dovodi do pretjerane razgradnje manoproteina, kao i do smanjenja udjela β -1,6-glukana u staničnoj stijenci. Pretpostavlja se da sinteza β -1,6-glukana, njegova lokalizacija i funkcioniranje ovise o O-glikozilaciji. Poznati primjeri O-glikoziliranih proteina bitnih za pravilnu sintezu stanične stijenke jesu Kre9 te Gas1/Ggp1.

Uloga samih manoproteina u staničnoj stijenci nije potpuno razjašnjena. Neka se svojstva stanične stijenke, poput akumulacije negativnog naboja zbog obilja fosfatnih grupa koje formiraju fosfodieterske veze, pripisuju manoproteinima upravo temeljem njihove kemijske strukture. Međutim, radi se o velikoj skupini molekula čije funkcije i temelje djelovanja još uvijek treba ustanoviti.

Na osnovu načina vezanja manoproteini stijenke mogu se podijeliti u dvije skupine. Prvu koju čine proteini koji se vežu nekovalentno i drugu koju čine proteini koji se vežu kovalentno sa ugljikohidratnim komponentama stijenke.

Nekovalentno vezani proteini

Nekovalentno vezani proteini uglavnom su O-glikozilirani (*Cappellaro i sur., 1998.*) te čine 80 % manoproteina stanične stijenke. Njihova je raspodjela u staničnoj stijenci potpuno ravnomjerna, a analizama je utvrđeno da posjeduju veliki udio homologije s enzimima transglikozidazama. Zbog uloge tih enzima u intramolekularnoj pregradnji β -glukana u staničnoj stijenci tijekom životnih procesa, koji činjenično dovode do staničnih promjena, kao što su rast, pupanje, parenje i sporulacija, smatra se da i ovi proteini imaju ulogu u spomenutim promjenama (*Teparić i sur., 2010.*).

Kako bi se mogli proučavati, potrebno ih je izolirati iz stanične stijenke. Nekovalentno vezani proteini se iz stanične stijenke mogu izolirati grijanjem na 95-110 °C tokom 5-10 minuta u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptotetanolu (*Mrša i sur., 1997.*). Prvi uspješno izoliran i karakteriziran protein bio je, već spomenuti, BgI2, a analizama je utvrđeno da ima i endoglukanaznu i transglikozidaznu aktivnost pa se često naziva endotransglikozilazom. Osim njega, uspješno je izolirano još nekoliko proteina (Scw2, Scw3, Scw4, Scw6, Scw8, Scw9, Scw10, Scw11) od kojih je za neke poznata funkcija, dok za neke nije. Komparativnim

analizama BgI2 proteina i nekih proteina iz navedene skupine (Scw4, Scw10, Scw11) utvrđena je djelomična homologija koja ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u procesima pregradnje glukana u stijenci, međutim, to još uvijek nije dokazano *in vitro* (Teparić i sur., 2010.).

Kovalentno vezani proteini

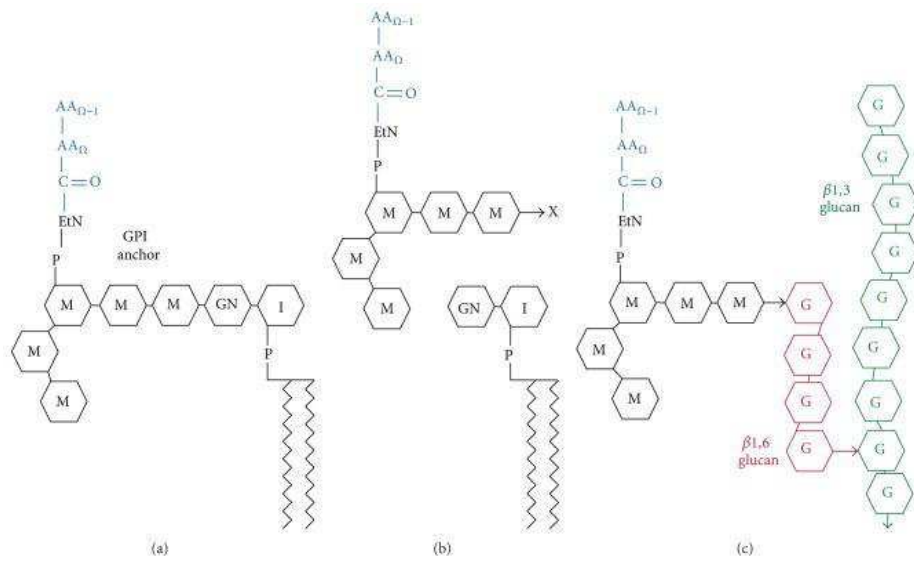
S obzirom na mehanizam kovalentnog vezanja, proteini ove skupine mogu se podijeliti u dvije podskupine. Prvu koja se u stijenku veže preko ostatka GPI sidra i drugu koju čine takozvani Pir proteini.

GPI – ovisni proteini

GPI, glikozilfosfatidilinozitol, sintetizira se u endoplazmatskom retikulumu stanice u više koraka. Fosfolipidni supstrat, fosfatidilinozitol, kao i UDP-N-acetilglukozamin, dolihol-fosfatidil-manoza i fosfatidil-etanolamin, sintetizirani su u citosolu stanice i potom transportirani u vanjsku membranu endoplazmatskog retikuluma. Analize pokazuju da su enzimi bitni za sintezu GPI, GPI-transferaze i N-acetilaze, lokalizirani u vanjskoj membrani, no njihovo je aktivno mjesto okrenuto prema lumenu endoplazmatskog retikuluma. Prvi korak u sintezi GPI sidra jest premještanje N-acetilglukozamina s UDP-N-acetilglukozamina na fosfatidilinozitol. Dobiveni N-acetilglukozamin-fosfatidilinozitol potom je deaciliran te nastaje glukozamin-fosfatidilinozitol. Ovakav deacilirani glukozamin vrlo je specifičan za sintezu GPI sidara i za sada je poznato djelovanje triju enzima uključenih u njegovu sintezu (Doering i sur., 1989.; Stevens i Raetz, 1991.), a geni koji kodiraju za ta tri enzima su *GPI1*, *GPI2* i *SPT14* (Doering i Franzot, 1999.). Potom se na njega veže dolihol-fosfatidil-manoza, a na reducirajući kraj svake treće manoze nadodaje se etanolamin-fosfat, čiji je donor fosfatidil-etanolamin. Nakon toga molekula GPI prolazi kroz modifikacije (Conzelmann i sur., 1986.).

Proteini koji za svoje funkcioniranje trebaju GPI sidro, na svom N-terminalnom kraju imaju sekvencu koja je odgovorna za transport do endoplazmatskog retikuluma, a na C-terminalnom kraju imaju sekvencu koja se uklanja proteolitički te se na taj kraj transamidacijom veže GPI sidro. Nakon vezanja sidra slijedi transport manoproteina do plazma membrane za čiju su uspješnost odgovorni sfingolipidi (Horvath i sur., 1994.). Manoprotein se potom odcjepljuje sa GPI sidra i preko β -1,6-glukana veže na β -1,3-glukansku mrežu, kako i prikazuje slika 2.

Iako vezanje većine manoproteina funkcionira na ovaj način, poznato je nekoliko primjera koji koriste GPI sidro, ali krajnja lokalizacija je drugačija. Flo1 protein, koji sudjeluje u procesu flokulacije stanica kvasca, za transport koristi GPI sidro, ali se ne veže na glukansku mrežu (*Bony i sur., 1997.*). Vezni protein cikličkog AMP-a, Gce1, inicijalno je vezan na GPI sidro, ali prije vezanja na glukansku mrežu prolazi kroz lipolitičke i proteolitičke modifikacije (*Müller i sur., 1996.*).



Slika 2. Model djelovanja GPI sidra; a) GPI sidro; AA-aminokiselinski ostatak, EtN-etanolamin, P-fosfat, M-manoza, GN-glukozamin, I-mioinozitol, dolje desno je fosfolipid koji može biti glicerol ili sfingoizin; b) model predlaže da se veza između glukozamina i manana kida te se manan veže na hipotetski proteinski kompleks ili neki drugi aktivator; c) formiranje glikozidne veze između GPI ostatka i glukanske mreže; G-glukoza (*Lipke i Ovalle, 1998.*)

GPI - proteini odgovorni su za biosintezu i dinamičke promjene stanične stijenke, ali i za njenu hidrofobnost te antigenost stanice. U skupinu GPI - proteina ubrajaju se neki proteini iz GAS obitelji, TIR obitelji, flokulini nalik lektinima (Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p) te aglutinini (Aga1p/Aga2p, Sag1p). GAS obitelj proteina ima pet članova. Poznato je da posjeduju aktivnosti remodeliranja glukana. Visoko su O- i N- glikozilirani, a na C-terminalnom kraju imaju domenu stabiliziranu disulfidnom vezom i bitnu za pravilno zauzimanje konformacije molekule. Najistraženiji predstavnik te skupine, Gas1p, pokazuje transglikozidaznu aktivnost formiranjem β -1,3-glikozidne veze između reducirajućeg kraja jednog glukanskog lanca i nereducirajućeg kraja drugog (*Hartland i sur., 1996.; Mouyna i sur., 2000.*). Isto tako,

izazivanjem mutacije u *GAS1*, primjećene su abnormalnosti u zauzimanju konformacije glukanskih molekula kao i njihova povećana sekrecija u okolni medij. Ostali proteini te skupine pokazuju visoku homologiju sa Gas1p, a poznato je da Gas2p i Gas4p imaju ulogu u sporulaciji.

TIR obitelj proteina također je slabo istražena i za sada nisu detaljno poznate njihove funkcije. Primjećeno je da su razine ekspresije gena za pojedine članove skupine različite pri anaerobnim uvjetima uzgoja. U tu skupinu spadaju proteini poput Cwp1p, Cwp2p, Dan1p, Dan2p, Tir1p, Tir2p, Tir3p, Tir4p te Tip1p. Primjećeno je da ekspresija gena za Cwp1p, Cwp2p i Tip1p varira u odnosu na trenutnu fazu staničnog ciklusa (*Smits i sur., 2006.*) te da su Dan1p, Dan3p, Dan4p i Tir4p odgovorni za apsorpciju sterola pri anaerobnim uvjetima (*Wilcox i sur., 2002.*).

Flokulini su odgovorni za flokulaciju, dok su aglutinini proteini potrebni za povezivanje α - i α -stanica tokom parenja. Detaljnije su istražene i egzoglukanaza Exg2 i transglikozidaze Crh1 i Utr2/Crh2 čija je funkcija stvaranje veze između β -1,3-glukana i hitina (*Teparić i sur., 2010.*).

PIR obitelj proteina

PIR proteini predstavljaju drugi mehanizam vezanja za staničnu stijenkku. Kratica PIR potječe od karakterističnih sekvenci koje se ponavljaju u N-terminalnom dijelu ove skupine proteina (eng. *proteins with internal repeats*), a geni koji kodiraju za njih su *PIR1*, *PIR2*, *PIR3* i *PIR4* (*Toh-e i sur., 1993.*). Obilježavaju se kraticom *Ccw* koja označava kovalentno vezanje proteina za staničnu stijenkku (eng. *covalently linked cell wall proteins*). Za sada su poznata četiri proteina s jednim do jedanaest unutarnjih ponavljanja – Pir1/Ccw6, Pir2/Ccw7, Pir3/Ccw8 i Pir4/Ccw5. Za sve PIR proteine zajedničko je da ne sadrže GPI signalnu sekvencu, da je za njihovo procesiranje odgovorna Kex2 endoproteaza te da su direktno vezani na β -1,3-glukan esterskom vezom. Većinom su O-glikozilirani s visokim udjelom serina i treonina te karakterističnom N-terminalnom signalnom sekvencom koja ih vodi u sekretorni put. Isto tako sadrže i repetitivnu sekvencu koja je odgovorna za kovalentno vezanje za staničnu stijenkku, *QIGDGQVQ*. PIR proteini se iz stanice mogu izolirati u blago lužnatim uvjetima (30 mM NaOH, 12 sati, 4 °C) ili enzimski β -1,3-glukanazom (*Mrša i sur., 1997.*).

Uloga PIR proteina u stanici još uvijek nije potpuno objašnjena. Smatra se da imaju bitnu ulogu u održavanju integriteta stanice zato što mutant s inaktiviranim svim *PIR* genima pokazuje nepravilan rast i oblik stanice. Zabilježen je slučaj visoke indukcije *PIR2* gena prilikom toplinskog šoka i nedostatka dušika (*Russo i sur., 1993.*). Protein Pir2 uzrokuje

rezistenciju na biljni antifungalni protein duhana, osmotin. Osmotin narušava strukturu stijenke, neometano ulazi u stanicu i izaziva njezinu smrt. Prva pretpostavka je da prekomjerna ekspresija Pir2 kompenzira narušavanje strukture i doprinosi rezistenciji, dok je druga da u stijenci postoji receptor za osmotin kojeg prekomjerna ekspresija Pir2 maskira i čini nedostupnim (*Yun i sur., 1997.*). Smatra se da su PIR proteini bitni i za održavanje regularnog životnog ciklusa stanice. Primjećeno je da se ekspresija *PIR1*, *PIR2* i *PIR3* gena povećava tokom odvajanja stanice kćeri od stanice majke (*Spellmann, 1998.*).

Najistraženiji protein u PIR obitelji jest Pir4/Ccw5. Rezultat sekvencijske analize Pir4 prikazan je na slici 3. Utvrđeno je da taj protein ima samo jednu potpunu repetitivnu sekvencu čijom je delecijom izazvana sekrecija proteina u okolni medij. Sličan efekt izaziva i promjena tri glutamina (Gln₆₉, Gln₇₄ i Gln₇₆) ili jedne asparaginske kiseline (Asp₇₂). Detaljnijom analizom utvrđeno je da samo Gln₇₄ prolazi kroz modifikacije te da je vjerojatno on odgovoran za vezanje proteina za staničnu stijenku (*Ecker i sur., 2006.*).

Kao što je spomenuto, protein ima samo jednu repetitivnu sekvencu - *QIGDGQ₇₄VQ*, motiv koji se javlja kod svih PIR proteina. Za vezanje za staničnu stijenku ključan je aminokiselinski ostatak glutamina na 74. mjestu. Prilikom hidrolize te veze glutamin prelazi u glutaminsku kiselinu što upućuje na to da je tip reakcije transglutaminazni. Pošto u toj vezi ne sudjeluje ni amino-šećer ni primarni amin u strukturi molekula, a također nije detektiran ni potencijalni gen koji bi kodirao za transglutaminazu, može se tvrditi da je veza esterska, temeljena na interakciji γ -karbonilne grupe glutamina te hidroksidne grupe šećera (*Ecker i sur., 2006.*).

```

PIR4 - MQFKNVALAASVAALSATASAEGYTPGEPWSTLTPTGSISCGAAEYTTTF - 50
PIR4 - GIAVQAITSSKAKRDVLSQIGDGQVQATSAATAQATDSQAQATTTATPTS - 100
      Δ -----
PIR4 - SEKISSSASKTSTNATSSSCATPSLKDSSCKNSGTLELTLKDGVLTDAGK - 150
                                     130
PIR4 - RIGSIVANRQFQFDGPPPQAGAIYAAGWSITEDGYLALGDSDFYQCLSG - 200
                                               197
PIR4 - NFYNLYDQNVAEQCSAIHLEAVSLVDC - 227
      214      227

```

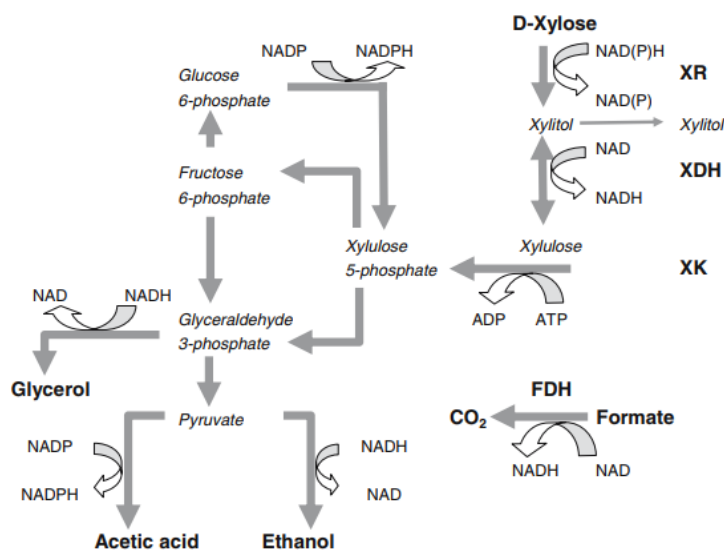
Slika 3. Sekvencijska analiza *PIR4* gena. Isprekidana linija predstavlja karakterističnu repetitivnu sekvencu za PIR proteine, puna linija označava kompletanu signalnu sekvencu, a trokut mjesto djelovanja Kex2 proteaze (*Castillo i sur., 2003.*)

2.2. Metabolizam ksiloze

D-ksiloza dominantan je pentozni šećer sadržan u biljnoj hemicelulozi, a, uz glukozu, šećer je koji prevladava u sirovinama lignocelulozne prirode. Glukoza i ksiloza predstavljaju većinski dobivene ugljikohidrate hidrolizom obnovljive biljne biomase, a njihova efikasna upotreba ključna je za razvoj proizvodnje energije temeljene na biomasi (*Schneider, 1989.*).

Metabolizam ksiloze dio je fermentirajućeg pentoznog sustava kojeg kvasac posjeduje, a temeljen je na D-ksilozno-inducibilnom enzimskom sustavu. Dva su osnovna metabolička puta u koja se ksiloza uključuje – oksidoreduktazni i izomerazni (*Webb i Lee, 1990.*).

Kvasac ne posjeduje transportni proteinski sustav specifičan samo za ksilozu. Stanica kvasca posjeduje 18 transportera heksoza (Hxt1-17 i Gal2). Temeljem afiniteta prema glukozu, razvrstani su u tri skupine – transporteri visokog afiniteta (poput Hxt6, Hxt7), transporteri srednjeg afiniteta (poput Hxt2, Hxt4) te transporteri niskog afiniteta (poput Hxt1, Hxt3) (*Diderich i sur., 1999.*). Transporteri odgovorni za unos ksiloze u stanicu su Hxt5 i Hxt7, ali jedino kada glukoza nije prisutna ili kada je prisutna u vrlo malim količinama (*Hamacher i sur., 2002.*). Pri visokim koncentracijama glukoze, geni *HXT5* i *HXT7* su reprimirani dok su pri potpunom odsustvu glukoze, visoko ekspimirani. Zabilježeno je da gen *HXT7* u tom slučaju ima najvišu razinu ekspresije. Temeljem ovisnosti transporta ksiloze u stanicu o koncentraciji glukoze, zaključeno je da biotehnoške proizvodnje temeljene na fermentaciji ksiloze moraju biti vođene pri vrlo niskim koncentracijama glukoze zato što je afinitet nosača prema glukozu puno viši, ali i zato što je glukoza represor gena koji kodiraju za proteinske nosače koji pokazuju afinitet prema ksilozi u odsustvu glukoze (*Lee i sur., 2002.*).



Slika 4. Metabolički put ksiloze u stanici kvasca. (Granstörn i sur., 2007.)

Većina gljiva koristi oksidoreduktazni metabolički put prikazan na slici 4. koji se temelji na prisustvu ksiloza reduktaze (XR) i ksiloza dehidrogenaze (XDH). U kvascu, prvi korak puta jest redukcija ksiloze u ksilitol pomoću NADPH-ovisne ksiloza reduktaze. Potom je ksilitol oksidiran u 5-ksilulozu pomoću NADP⁺-ovisne ksilitol dehidrogenaze. Nakon oksidacije, slijedi fosforilacija 5-ksiluloze ksiluloza-kinazom čime nastaje ksiluloza-5-fosfat, međuprodukt pentozna fosfatnog puta. Na ovaj je način ksiloza usmjerena u neoksidativni ogranak pentozna fosfatnog puta i posljedično u glikolizu (*Farwick i sur., 2013.*).

Izomerni metabolički put ksiloze zastupljen je u bakterijama. U bakterijskom enzimskom sustavu, umjesto ksiloza reduktaze i ksiloza dehidrogenaze, sudjeluje ksiloza izomeraza koja intramolekulskim pregradnjama izravno prevodi ksilozu u ksilulozu, koja se potom fosforilira i uključuje u pentozna fosfatni put kao i kod kvasaca.

Ksilitol je šećerni alkohol, poliol, s kosturom molekule od pet ugljikovih atoma. Posjeduje prednosti za zdravlje i posljednjih je godina upravo zbog toga predmet mnogih istraživanja, pa tako i ovog rada. Potvrđeno je da sprečava zubni karijes i akutne infekcije uha kod male djece (*Mäkinen, 1992.*). U prirodi je zastupljen uglavnom u voću i povrću, ali u relativno malim količinama.

Prvenstveno se koristi kao zaslađivač zato što ima jednaku razinu slatkoće kao i sukroza, ali puno nižu energetska vrijednost. Dok jedan gram sukroze sadrži 4 cal, jedan gram ksilitola sadrži samo 2.4 cal. Zbog toga se najviše nalazi u proizvodima poput žvakaćih guma, bombona i zubnih pastila. Od kemijskih svojstava, dobro je topljiv u vodi, a zbog negativne toplote u otopini daje osjećaj hlađenja prilikom konzumacije.

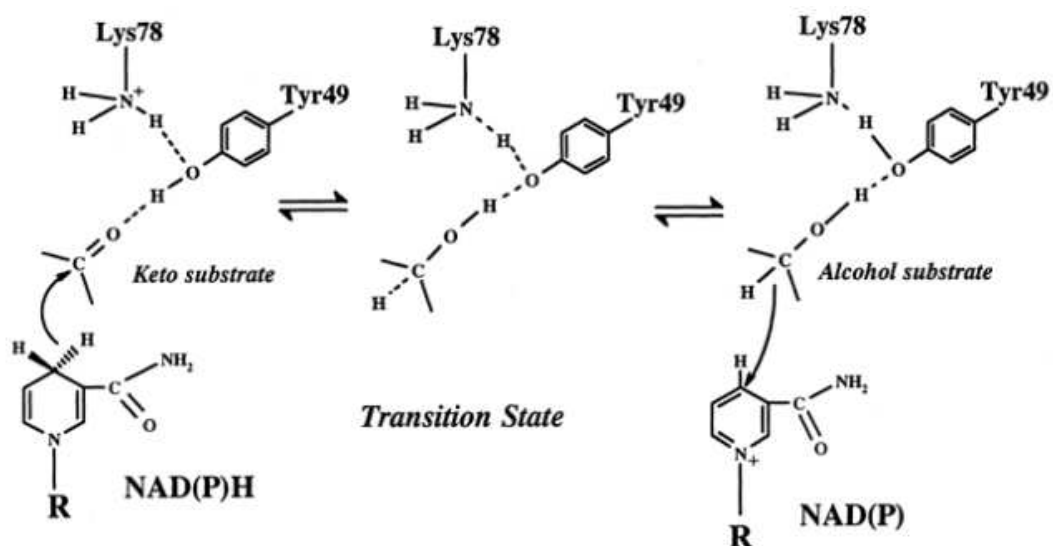
Prva istraživanja o proizvodnji ksilitola javila su se 1961. godine kada je predloženo da bi ksilitol mogle konzumirati osobe oboljele od dijabetesa tako da se 60-e godine smatraju začetkom industrijske proizvodnje ksilitola.

2.3. Svojstva kvašćeve ksiloza reduktaze

Ksiloza reduktaza je enzim odgovoran za katalizu reverzibilne reakcije redukcije ksiloze u ksilitol u citoplazmi kvasaca koji mogu fermentirati pentoze. Za redukciju enzim treba prisutnost NADPH kao kofaktora. Ksiloza reduktaza iz kvasca spada u subobitelj 2b aldo-keto reduktazne superobitelji enzima koja je široko rasprostranjena u svim vrstama organizama (sisavci, ribe, insekti, vodozemci, gmazovi), a gen kodira za enzim u *Saccharomyces cerevisiae* je gen *GRE3*.

Kroz prošlost, izolirana je nekolicina ksiloza reduktaza iz stanica kvasaca. Uglavnom se radi o monomernom proteinu molekulske mase od 33 do 40 kDa, osim u slučaju kvasaca *Pichia stipitis* (Rizzi i sur., 1984.) i *Candida tropicalis* (Yokoyama i sur., 1995.) kod kojih je protein dimer. Isto tako, zbog različitih izvora iz kojih je ksiloza reduktaza izolirana, postoji različitost i u tome zahtjeva li enzim NADPH ili NADH kao kofaktor (Lee, 1998.).

U *Saccharomyces cerevisiae* ksiloza reduktaza je relativno neistražen enzim. Vrlo je malo poznatih informacija o strukturi i detaljnijoj funkciji enzima tako da ni informacije o katalitičkom mehanizmu djelovanja enzima nisu utvrđene. Detaljnom komparacijom aldo-reduktaze izolirane iz ljudske placente i ksiloza reduktaze potvrđeno je da je i ksiloza reduktaza član aldo-keto reduktazne obitelji (ADR). Enzim sadrži sve karakteristične aminokiselinske ostatke odgovorne za vezanje i katalizu kao i ostatak obitelji (sekvence ostataka 39-56 te 155-172). Prema tome, postavljena je pretpostavka o mehanizmu djelovanja enzima kojeg prikazuje slika 5. Prvi korak jest protonacija karbonilne grupe u aldehidnom supstratu za koju je odgovoran Tyr48 ostatak. Nakon toga dolazi do stereospecifičnog transfera hidrida s C₄ atoma nikotinamidnog prstena u NADPH na karbonilnu grupu. Kako bi se snizio pH i time olakšao transfer protona, Lys77 povezuje se vodikovom vezom svojom ε-NH₂ grupom sa hidroksilnom grupom Tyr48, a sam Lys77 stabiliziran je vezom sa Asp43. Istraženo je i da je ostatak His110 odgovoran za usmjeravanje supstrata u aktivni „džep“ enzima (Bohren i sur., 1994.).



Slika 5. Mehanizam djelovanja ključna dva ostatka za vezanje kofaktora.

(Jeong i sur., 2001.)

Zbog ovakvog mehanizma ističe se i sličnost sa kratkolančanom dehidrogenazno/reduktaznom (SDR) obitelji proteina uz razliku u položaju Lys ostatka koji je četiri mjesta niže od ključnog Tyr uz karakterističan *GXXXGXG* motiv za tu obitelj (*Jörnvall i sur., 1995.*). Ksiloza reduktaza iz *Saccharomyces cerevisiae* posjeduje dva takva motiva, na mjestima 33-37 i 49-53, a ključni su ostaci Tyr49 i Lys78 što je mala razlika u odnosu na aldo-reduktazu iz ljudske placente.

Ksiloza reduktaza se zbog pripadnosti dvjema obiteljima smatra hibridom. Posjeduje motiv karakterističan za ADR obitelj, *Ile-Pro-Lys-Ser* uz Arg pet mjesta niže, odgovoran za vezanje kofaktora. Detaljnija analiza pokazala je da je Lys270 iz tog motiva odgovoran za vezanje sa 2'-fosfatnom grupom u NADPH. S druge strane, posjeduje i motiv *GXXXGXG*, tzv. Gly - motiv, odgovoran za vezanje koenzima. U kvaščevoj ksiloza reduktazi prva dva glicina su redovno sačuvana dok treći glicin u motivu varira, to jest, može biti zamijenjen nekim drugim ostatkom koji sadrži karboksi-kiselinski bočni ogranak (na primjer, Asp ili Glu). Točan razlog posjedovanja ta dva motiva iz dvije različite obitelji nije poznat.

Ksiloza reduktaza kao kofaktor može koristiti i NADH. Smatra se da je ta činjenica ključna za efikasnu anaerobnu fermentaciju ksiloze. Razlog je u tome što u drugom koraku metaboličkog puta ksiloze, oksidaciji ksilitola u ksilulozu, nastaje NADH. Zbog anaerobnosti, ključno je svojstvo korištenja i NADH kao kofaktora ksiloza reduktaze zato što u suprotnom ksiloza dehidrogenaza ne bi mogla djelovati što je povoljno za produkciju ksilitola, ali ne i bioetanola (*Bruinenber i sur., 1984.*).

2.4. Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze

Ekspresija heterolognih proteina na površini mikroorganizama u posljednjih nekoliko godina otvara novi aspekt biotehnoške proizvodnje, pa je fokus istraživanja na ekspresijskim sustavima mikrobnih stanica. Primjena heterolognih proteina u proizvodnji ima veliki potencijal za ostvarenje napretka proizvodnje kemikalija, deterdženata, hrane, kao i medicinskih dijagnostika (*Teperić i sur., 2010.*).

Imobilizacija proteina na stijenci stanice vrlo je kompleksan proces. Jedan od problema jest činjenica da proteini, zbog grubog tretmana tokom imobilizacije, gube svoju aktivnost zbog zauzimanja nepravilne konformacije. Kako bi se to spriječilo, pristupa se nekovalentnom vezanju koje nije toliko štetno za strukturu i normalno funkcioniranje proteina, ali takav tip vezanja nije čvrst te proteini vrlo lako disociraju i budu „izgubljeni“ tokom aplikacije.

Geni za takve proteine fuzioniraju se s genima koji kodiraju za sastavnice stanične stijenke. Kako bi ekspresija heterolognog proteina bila uspješna, potrebna je upotreba efikasne signalne sekvence koja će ga provesti kroz sekretorni put kao i sekvence koja će omogućiti vezanje tog proteina za stijenku. Ovisno o svojstvima proteina fuzioniranje može biti provedeno na C- ili N- terminalnom kraju proteina, a ponekad geni za heterologni protein mogu biti inserirani usred sekvence za neki protein nosač. Mjesto insercije ili fuzije vrlo je bitno jer utječe na efikasnost imobilizacije, stabilnost proteina, posttranslacijske modifikacije i aktivnost enzima. Da bi imobilizacija bila isplativa, mikrobnim ekspresijskim sustav mora biti kompatibilan s heterolognim proteinom, stanica ne smije sadržavati visoko aktivne ekstracelularne proteaze, a uzgoj stanica mora biti lak i jeftin. Najčešće se za takvu imobilizaciju koriste kvašćeve stanice zato što kvasac ima sličan sustav smatanja proteina i sekretorni aparat kao i eukariotske stanice (a vrlo često su proteini od interesa podrijetlom iz sisavaca), a uzgoj stanica kvasca nije zahtjevan.

Heterologni enzimi se imobiliziraju pomoću PIR proteina kada je aktivno mjesto enzima bliže C-terminalnom kraju. Prvu uspješnu imobilizaciju napravio je Moukadiri sa suradnicima (1999.), a radilo se o fuziji Pir4/Ccw5 sa dijelom proteina A iz *Staphylococcus aureus*. Zabilježena je i uspješna fuzija tri glikozil-transferaze (α -1,3-galaktozil-transferaza, α -1,2-manozil-transferaza i α -1,3-manozil-transferaza) sa Pir1 i Pir2. Stanice s tako imobiliziranim enzimima uspješno su iskorištene kao biokatalizatori u *in vivo* sintezi oligosaharida istovjetnih onim u stanici (*Abe i sur., 2003.*).

Potvrđena su i dva važna slučaja primjene u medicini. Upala zbog odbijanja transplantiranog organa temelji se na vezanju leukocita sa leukocitima koji sadrže selektine na endotelnim stanicama. Zbog toga je fokus protuupalne terapije na selektinima. Vezanje specifičnih oligosaharida (sLe^x) na selektine inhibira vezanje leukocita. Za sintezu sLe^x koriste se glikozil-transferaze izolirane iz humane placente. Dvije su imobilizirane na stanici kvasca te iskorištene u proizvodnji (*Salo i sur., 2005.*). Infekcije rotavirusom u nerazvijenim zemljama uzrokuju visok stupanj natalne smrtnosti. Alternativa razvoju cjepiva jest razvoj rekombinantnih antigena rotavirusa. U tu je svrhu imobiliziran antigenski fragment VP8* uz pomoć Pir4. Fuzijski protein detektiran je i na stanici kvasca, ali i u mediju. Miševi u koje je unesen pročišćeni fuzijski protein iz medija pokazali su visoku razinu titra anti-VP8* antitijela (*Andres i sur., 2006.*).

2.5. Industrijska proizvodnja ksilitola

Kao što je već spomenuto ranije, ksilitol je u zadnjih pedesetak godina postao vrlo cijenjen proizvod prvenstveno zbog njegovih povoljnih učinaka na zdravlje čovjeka. Prva istraživanja i ideje o proizvodnji javljaju se u 60-im godinama prošlog stoljeća. Kemijska i mikrobna proizvodnja zabilježena je od strane Lohmana (1957.) te Onishija i Suzukija (1966. i 1969.). U počecima je osnovni supstrat u proizvodnji bila glukoza zato što potencijal ksiloze još nije bio ostvaren zbog visoke cijene, ali i već spomenutog problema transporta u stanicu.

Uloga ksiloze raste 1970. godine kada je grupa finskih znanstvenika razvila kromatografsku metodu za separaciju šećera iz drvene biomase što je omogućilo masovnu proizvodnju ksiloze. Ksilitol se u to vrijeme proizvodio kemijski, redukcijom ksiloze uz metalne katalizatore pri vrlo visokom tlaku (*Melaja i sur., 1981.; Härkönnen i Nuojua, 1979.*). U tim je godinama otkriven i pozitivan učinak ksilitola na zube koji je istraživani u narednim godinama.

Osim problema transporta ksiloze u stanicu, u narednim je godinama proučavan i problem ravnoteže i regeneracije kofaktora NADH/NADPH. Naime, primjećeno je da se u nekim slučajevima ksilitol nagomilava u stanicama zato što ksilitol dehidrogenaza, zbog nedostatka NAD⁺ u uvjetima niske koncentracije kisika, ne radi dovoljno brzo. To je bio problem u industriji etanola i taj je korak postao usko grlo u uključivanju ksiloze u pentozni fosfatni put, glikolizu i naposljetku redukciju piruvata u etanol, ali takva je situacija bila povoljna za proizvodnju ksilitola.

Razvojem znanosti i genetičkog inženjerstva *Saccharomyces cerevisiae* postaje modelni organizam, kako u proizvodnji ksilitola, tako i u ostalim područjima. Iako su detektirani geni koji kodiraju za ksiloza reduktazu i ksiloza dehidrogenazu, primjećeno je da kvasac ne može rasti samo na ksilozi dovoljno brzo (*Toivari i sur., 2004.*). Osim toga, i dalje je postojao problem neravnoteže kofaktora što je uzrokovalo nagomilavanje ksilitola koji je ekskrecijom izlazio iz stanice, a istovremeno je asimilacija izvora ugljika bila sve manja. U industriji bioetanola zbog toga su razvijene različite strategije poput dodavanja elektron akceptora u medij (*Öhgren i sur., 2006.*), povezivanje redukcije furaldehida s metabolizmom ksiloze (*Almeida i sur., 2009.*) ili modifikacije prisutnosti kofaktora za ksiloza reduktazu i ksiloza dehidrogenazu (*Roca i sur., 2003.*).

Ksilitol se u današnje vrijeme uglavnom proizvodi kemijski ili mikrobno uz pomoć *Saccharomyces cerevisiae* kod kojeg se pokušava modificirati transport ksiloze u stanicu.

2.5.1. Kemijska proizvodnja

Kemijska proizvodnja temelji se na kemijskoj hidrogenaciji čiste ksiloze u prisustvu nikla pri visokim temperaturama i tlaku. Prinos ksilitola u takvoj proizvodnji je 50-60 % po frakciji ksilana i 8-15 % po početnoj količini materijala. Takav ksilitol je vrlo skup zato što zahtjeva kompleksnu separaciju i pročišćavanje.

Osnovna sirovina za proizvodnju su ksilani koji su u 10-35 % zastupljeni u drvnjoj i biljnoj biomasi – drvo breze, kukuruzovina, pšenična i lanena slama, sjeme pamuka, kora kokosa, olupina kikirikija. Takvi materijali prolaze kroz kiselinsku hidrolizu tokom koje se oslobađaju ksiloza, arabinoza, manozna i galaktoza, s najvišim udjelom ksiloze (80-85 %) (*Counsell, 1977.; Krull i sur., 1980.*). Ksiloza se potom pročišćava te se izaziva njena hidrogenacija čime se dobiva ksilitol koji je potrebno pročistiti i kristalizirati.

Hidroliza kukuruznih klipova izaziva se 4% -tnom sumpornom kiselinom na 100 °C. Sljedeći korak je ekstrakcija ksiloze metanolom dodanom u kristalnom obliku uz magnezijev sulfat. Dobivena ksiloza hidrogenira se s $\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ čime se postiže produkcija ksilitola od 75 kg/h (*Dieters, 1975.*). Takav ksilitol prolazi kroz intenzivno pročišćavanje koje uključuje niz koraka. Dobivena otopina ksilitola prvo se frakcionira korištenjem ionske kromatografije s umreženim polistiren-sulfatnim kationom i divinil benzenom. Količina uzorka mora biti takva da kroz kolonu prolazi 25-55 % suhe mase ksilitola uz protok od 0.2 do 1.5 m³/h po m² kolone. Prve frakcije uglavnom sadržavaju vodu, ostale poliola i vrlo male koncentracije ksilitola, dok one zadnje sadrže niski udio poliola i visoki ksilitola. Frakcije sa srednjim i visokim udjelom ksilitola prolaze kroz kristalizaciju čime većina poliola, ali i manji dio ksilitola koji nije kristalizirao, zaostaju u otopini. Taj ostatak se spaja s novim uzorkom kako bi gubitci bili što manji (*Melaja i Hamalainen, 1975.*).

Prinos takve proizvodnje je samo 50-60 % što ne može opravdati dugotrajno i skupo pročišćavanje kao ni cijeli proces proizvodnje. Zbog niskog prinosa, cijene i kompleksnosti proizvodnje većinski se pristupa mikrobnjoj, to jest, biotehnološkoj proizvodnji.

2.5.2. Biotehnoška proizvodnja

Biotehnoška proizvodnja pretpostavlja korištenje radnog mikroorganizma koji proizvodi željeni proizvod pri prilagođenim uvjetima uzgoja. U biotehnoškoj proizvodnji ksilitola zabilježeni su podaci o korištenju kvasaca (*Candida tropicalis*, *Candida pelliculosa*, *C. boidinii*, *Pachysolen tannophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* itd.), bakterija (*Enterobacter liquafaciens*, *Corynebacterium sp.*, *Myobacterium smegmatis*), gljiva (*Petromyces albertensis*) i miješanih kultura (*Candida pelliculosa* i *Methanobacterium spp.*).

Kao najbolji proizvođači ksilitola ističu se kvasci i bakterije. Pojedine vrste kvasaca daju prinose od 0,7404 g ksilitola po 1 g ksiloze, dok bakterije proizvode 0,4 g ksilitola po 1 g ksiloze (Nigam, 1995.).

Za biotehnošku proizvodnju vrlo su bitni uvjeti uzgoja mikroorganizma jer o njima ovisi sam rast biomase mikroorganizma i sinteza željenog proizvoda.

Prvi bitan faktor jest aeracija. Aerobni mikroorganizmi za rast trebaju kisik zato što je on prvenstveno odgovoran za stimulaciju transporta šećera, kao i za normalno funkcioniranje metabolizma stanice, iako neki mikroorganizmi mogu rasti i sintetizirati ksilitol i u mikroaerobnim uvjetima (*Candida guilliermondii*) (Meyrial i sur., 1991.). Međutim, da bi se smanjilo daljnje metaboliziranje ksilitola u ksilulozu, aeracija je potrebna samo za fazu rasta biomase. Nakon što biomasa postigne željenu koncentraciju, aeracija se ili prekida ili spušta na vrlo nisku razinu.

Drugi bitan faktor je koncentracija ksiloze u podlozi. Viša početna koncentracija ksiloze djeluje pozitivno na proizvodnju ksilitola. U ovom aspektu vrlo je bitno da je stanica kvasca tolerantna na visoke koncentracije šećera i visok osmotski tlak. Na primjeru *Candida guilliermondii*, pokazan je utjecaj koncentracije ksiloze na proizvodnju. Korišten je raspon koncentracija od 10 g/L do 300 g/L. Najviši udio proizvedenog ksilitola dobiven je s najvišom koncentracijom ksiloze. Međutim, pri nižim koncentracijama ksiloze, dobiveno je najviše biomase (20-50 g/L ksiloze). Rast mikroorganizma i proizvodnja ksilitola obrnuto su proporcionalni s obzirom na koncentraciju ksiloze u podlozi pa je potrebno koristiti optimalnu koncentraciju koja će pogodovati rastu biomase, ali i proizvodnji ksilitola (Meyrial i sur., 1991.). Uz koncentraciju ksiloze vrlo bitna je i prisutnost ostalih šećera u podlozi. Primarno je potrebno održavati glukozu na niskim koncentracijama zato što, kao što je već spomenuto, inhibira transport ksiloze u stanicu. Osim glukoze, kvasci će vrlo brzo fermentirati manozu, galaktozu i arabinozu.

Od ostalih faktora, proizvodnji ksilitola pogoduje metanol zato što osigurava NADPH oksidacijom do formaldehida uz pomoć alkohol-dehidrogenaze čime se ravnoteža oksidoredukcijske reakcije između ksilitola i ksiluloze pomiče prema redukciji ksiluloze u ksilitol, što je primjećeno u proizvodnji sorbitola i iditola s *Candida boidinii* (*Vongsuvanlert i sur., 1988.*). Kod *Candida guilliermondii* primjećen je pozitivan efekt biotina na proizvodnju ksilitola (*Lee, 1988.*).

Zabilježeno je da je najviše ksilitola dobiveno s kvascima, u rasponu pH od 6.0 do 7.0 te pri temperaturi od 30 °C. Efikasnost u biotehnološkoj proizvodnji može rasti i do 70 %. Međutim, problem pročišćavanja ksilitola javlja se i u ovakvom tipu proizvodnje. Iako je efikasnost procesa puno viša nego u kemijskom postupku, postupak pročišćavanja je i dalje skup. Čak štoviše, zahtjeva i dodatan korak razbijanja stanica iz kojih je potrebno pročistiti akumulirani ksilitol, a manji dio nalazi se i u mediju pa je potrebno obraditi i njega. Unatoč tome, godišnje se ovakvim tipom proizvodnje proizvodi 20 do 40 000 tona ksilitola što na tržištu vrijedi 40 do 80 milijuna eura (*Granström i sur., 2007.*).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

Kvaščev ekstrakt i kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
Aminokiseline i nukleotidi: histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

ECL-otopine za razvijanje blota – Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, USA)

D-ksilan - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

NADPH - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)

Amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β-merkaptetoetanol,

Na-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) – LKB Produkter AB (Bromma, Sweden)

Ponceau S i polietilenglikol 4000 (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)

Anti-HA antitijela – Roche Diagnostics DmbH (Mannheim, Njemačka)

3.2. Sastav otopina i pufera

Laemmlli pufer

50 mM Tris-HCl pufer pH 6.8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 5% β-merkaptetoetanol, 0,001% brom-fenol plavo

TE - pufer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5-8

Tris-HCl pufer pH 8.8 za donji gel

68,2 g Tris-a, 1,5 g SDS-a, 500 mL destilirane vode

Tris-HCl pufer pH 6.8 za gornji gel

8,4 g Tris-a, 0,55 g SDS-a, 500 mL destilirane vode

Akrilamid za elektroforezu, 30%

60 g akrilamida, 1,6 g bisakrilamida, 200 mL destilirane vode

Amonijev persulfat - APS

10 g amonijevog persulfata, 100 mL vode

Pufer za elektroforezu (10x, 1L)

30 g Tris-a, 144 g glicina, 10 g SDS-a, destilirana voda

Pufer za uzorke, 25 mL, 5x koncentriran, pH 6.8

0,75 g Tris-a, 0,095 g EDTA III, 2,5 g SDS-a. 10 mL glicerola, 6.25 mL β-merkaptetoetanol, brom-fenol plavo

Karbonatni pufer za blot

1 g NaHCO₃, 0,33 g Na₂CO₃, 200 mL tehnološkog metanola, 800 mL destilirane vode.

Ponceau S boja

0,1 g boje, 100 mL 5% octene kiseline

Blocking pufer (1 L)

6 g Tris-a, 8,8 g NaCl, 0,1% TRITONA X-100

3.3. Soj kvasca

Tablica 1. prikazuje soj i genotip kvasca korišten u radu.

Tablica 1. Soj i genotip kvasca

Soj kvasca	Genotip
Y000	Mat a <i>his3Δ, leu2Δ, met15Δ, uraΔ3</i>
Y000 + YEp351 Pir4XR	Mat a <i>his3Δ, leu2Δ, met15Δ, uraΔ3</i> + YEp351Pir4XR

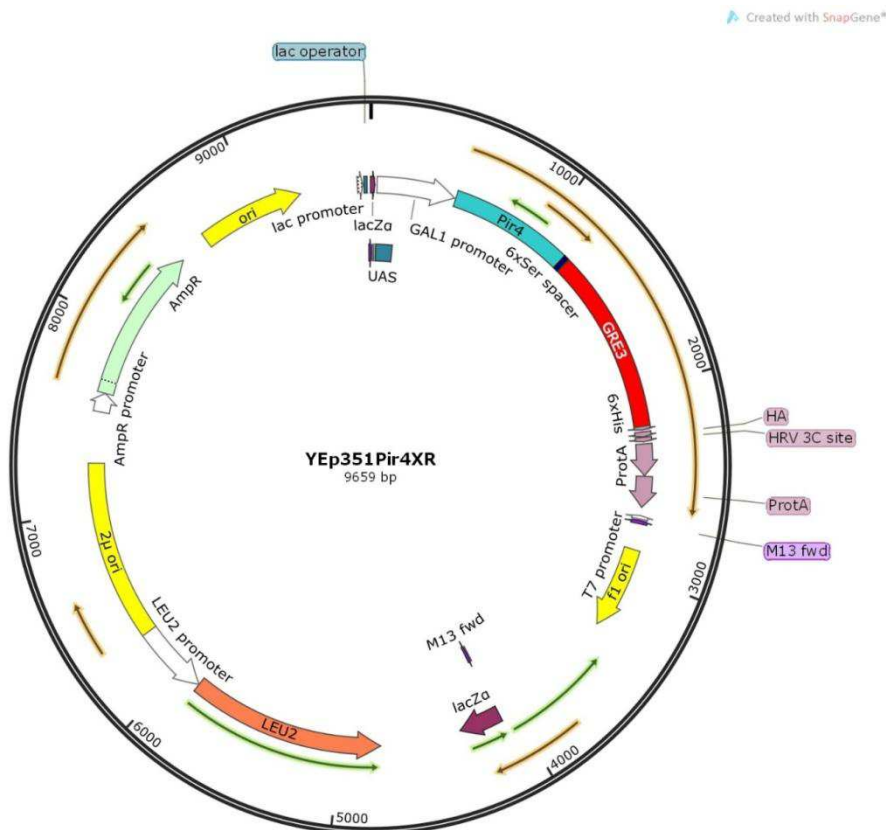
3.4. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca

Tablica 2. prikazuje sastav hranjive podloge korištene za uzgoj kvasca i sastav podloge za izradu Leu⁻ ploča za čuvanje kolonija kvasca.

Tablica 2. Sastav tekuće i hranjive Leu⁻ podloge korištene u radu

Podloga	YNB	Drop out	Glukoza	Agar	Histidin	Uracil	Leucin	Triptofan
Tekuća	3,35 g	1 g	-	-	6 g/L	2 g/L	15 g/L	5 g/L
Ploče	1,675 g	1 g	5 g	4 g	6 g/L	2 g/L	15 g/L	5 g/L

3.5. Plazmid korišten u radu



Slika 6. Plazmid YEp351Pir4XR korišten za transformaciju kvasca.

U ovom je radu uz pomoć Pir4 imobilizirana ksiloza reduktaza. Na slici 6. je prikazan plazmid korišten u radu. Prema mapi, vidljivo je da je korišten gen *GRE3* koji u kvascu kodira za ksiloza reduktazu. Gen je fuzioniran sa genom *PIR4* koji kodira za Pir4 uz razmaknicu od šest serina. Osim toga, dodani su „tagovi“ *6xHis* i *HA*, na koji reagiraju antitijela korištena u radu. Kao markeri iskorišteni su rezistencija na ampicilin (*Amp^R*) te mogućnost sinteze leucina (*LEU2*) tako da transformanti mogu biti selektirani na podlogama bez leucina. Ekspresija gena je pod *GAL1* promotorom. Vrlo je bitno da stanice kvasca ne budu uzgajane na glukozu zato što glukoza reprimira ekspresiju *GAL1* promotora čime ne bi došlo ni do ekspresije fuzioniranog proteina Pir4-XR. S druge strane, ta je činjenica pozitivna zato što omogućava negativnu kontrolu – paralelnim radom sa stanicama uzgojenim na glukozu i sa stanicama uzgojenim na rafinozi i galaktozi (koja je induktor *GAL1* promotora) provjeravaju se dobiveni rezultati te se tako povećava točnost u utvrđivanju karakteristika (u ovom radu, aktivnosti) ksiloza reduktaze. Za negativnu kontrolu nakon transformacije koristi se Y000, divlji tip kvasca bez plazmida koji ne smije narasti na Leu⁻ ploči zato što ne posjeduje gene čijom bi ekspresijom bio ostvaren metabolički put sinteze leucina. Prema navedenom, rekombinantna ksiloza reduktaza fuzionirana je s Pir4 proteinom koji je sastavni dio proteinskog sustava stanične stijenke. Takav fuzionirani protein smješten je na površini stanične stijenke kvasca. Očekivana molekulska masa proteina je 95 – 97 kDa (~ 37 kDa XR + ~ 48 kDa Pir4p + 6xHis + HA „tagovi“).

3.6. Metode

3.6.1. Transformacija stanica kvasca korištenjem LiAc

Kvasac se uzgaja u YNB podlozi koja sadrži sve aminokiseline do log faze rasta. Suspenzija stanica se potom centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja/min i odvoje se stanice (talog) od podloge (supernatant). Stanice se ispiru u 5 mL sterilnog TE pufera. Nakon ispiranja, talog se resuspendira u istom puferu na OD₆₀₀ ~ 50 – 60. Potreban volumen pufera izračuna se tako da se volumen medija u kojem se uzgajao kvasac pomnoži sa OD₆₀₀ i podijeli sa 60. Taj broj umanjuje se za otprilike 10% volumena uzgojenog kvasca. Dodaje se isti volumen TE pufera i 0.2 M LiAc. Slijedi inkubacija od 60 minuta na 30 °C uz blago miješanje. 100 µL suspenzije stanica prebacuje se u sterilnu eppendorficu te se dodaje 1-10 µL DNA. Slijedi još jedna inkubacija 30 minuta na 30 °C bez miješanja. Nakon toga, dodaje se 145 µL 60% -tnog polietilenglikola uz snažno miješanje i inkubaciju od 60 minuta na 30 °C bez miješanja.

Potom se izaziva temperaturni šok 6 minuta na 42 °C bez miješanja. Dodaje se 1 mL hladne, sterilne vode, centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja/min te se talog još jednom ispire u istom volumenu hladne vode. Talog se resuspendira u 120 µL sterilne vode te se nacijepi na selektivnu Leu⁻ ploču.

3.6.2. Izolacija staničnih stijenki kvasca

Nakon uzgoja u tekućoj podlozi stanice kvasca prvo se odvajaju od podloge centrifugiranjem, 3000 okretaja/min, 5 minuta trajanja. Nakon odvajanja podloge ispiru se dva puta u 30 mL destilirane vode (resuspendiranje taloga nakon centrifuge, centrifuga od 3000 okretaja/min trajanja 5 minuta, bacanje vode i ponovno resuspendiranje taloga u volumenu svježe destilirane vode). Tako dobiveni talog ispranih stanica resuspendira se u odgovarajućem volumenu K-fosfatnog pufera (50 mM, pH 8) tako da gustoća suspenzije bude 1 OD/µL pufera.

U eppendorfice sa suspenzijama stanica dodaju se staklene kuglice promjera 0.5 mm. Volumen staklenih kuglica odgovara 2/3 ukupnog volumena suspenzije stanica. Razbijanje se odrađuje 2-3 puta po 10 minuta na vorteksu pri maksimalnoj brzini. Bitno je da stanice budu potpuno razbijene i da se nakon razbijanja suspenzija dobro ohladi kako bi se inhibirale proteaze koje su ostale aktivne. Talog stijenki se odvajaju od staklenih kuglica centrifugom 1 minutu na 13 000 okretaja/min. Eppendorfice se buše na dnu užarenom iglom, takve se ulažu u čiste eppendorfice i tokom centrifuge se sadržaj cijedi kroz kuglice i rupu na dnu u čistu eppicu. U eppici je sadržan supernatant koji sadržava intracelularni sadržaj stanice kvasca, ali i talog u kojem su sadržane fragmentirane stijenske stanice. Potrebno je u daljnjem postupku koristiti talog tako da se supernatant pažljivo odvajaju pipetom i još jednom centrifugira 1 min na 13 000 okretaja/min kako bi bili izdvojeni i potencijalno zaostali fragmenti stijenki. Na taj je način dobiven talog sa staničnim stijenkama kvasca.

3.6.3. SDS i NaOH tretman izoliranih stijenki – priprema uzoraka za elektroforezu

Talogu stijenki dodaje se 1 mL Laemmli pufera. Takav sadržaj se kuha 10 min u vrijućoj vodenoj kupelji. Centrifugiranjem pri 13 000 okretaja/min, u trajanju od 1 minute, stijenske se odvajaju od ekstrakta. Korak se ponavlja još jednom. Čuvaju se oba ekstrakta. Nakon drugog kuhanja, talog stijenki ispire se četiri puta 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8.

Isprane stijenke se nakon tretmana Laemmlijem ispiru još jednom u 1 mL destilirane vode. Potom se resuspendiraju u otprilike 50 μ L 30 mM NaOH i slijedi inkubacija preko noći na 4 °C. Idući dan stijenke se odvajaju od ekstrakta centrifugom na 13 000 okretaja/min tokom 1 minute. Na taj način dobiven je ekstrakt koji sadrži ksiloza reduktazu i on je uzorak za elektroforezu.

3.6.4. SDS elektroforeza

Gel se sastoji od dva dijela – gornjeg i donjeg. Nakon pripreme donjeg gela i stavljanja gela između stakala, na njega se dodaje malo izopropanola koji će spriječiti kontakt kisika s gelom što je bitno jer je kisik inhibitor polimerizacije. Gornji gel služi za sabijanje proteina iz uzorka u usku frontu koja ulazi u gel za razdvajanje. Pripremljeni gel stavlja se u kadicu za elektroforezu i zalije puferom za elektroforezu, Tris-glicin-SDS puferom. Taj se pufer priprema kao 10x koncentriran pa ga je potrebno razrijediti jer mu je radna koncentracija 1x. Uzorci se pripremaju tako da se u njih dodaje 5x koncentrirani pufer za uzorke. Uzorci se nanose u jažice, pokreće se elektroforeza na 200 V i čeka se otprilike 45-60 minuta (prekida se u trenutku kad fronta dođe do kraja gela za razdvajanje).

3.6.5. Western blot

Odmah po završetku elektroforeze, gel se prebacuje u sustav za blot. Pripremaju se redom rešetka - dvije spužvice - dva filter papira - nitroceluloza - gel - dva filter papira - dvije spužvice - rešetka. Sve se priprema pod vodom i ne smije zaostati mjehurića zraka. Tako pripremljen „sendvič“ prebacuje se u kadicu s prethodno pripremljenim karbonatnim puferom tako da gel bude okrenut prema negativnoj elektrodi. Western blot se odvija pri struji od 380 mA u trajanju od 90 do 120 minuta.

Nakon transfera nitroceluloza se boji Ponceau S bojom tako dugo dok se ne pojave bendovi. Standardi se označe olovkom, nitroceluloza se potom ispiru destiliranom vodom i inkubira u 10 mL pufera za blokiranje koji sadrži 1% obranog mlijeka. Inkubacija ide preko noći na 4 °C. Idući dan, pufer za blokiranje sa mlijekom se odlije, dodaje se novih 5 mL istog pufera i 3 μ L HA-antitijela (koja će reagirati s prije spomenutim HA „tagom“). Inkubacija s antitijelima ide 90 ili više minuta na tresilici. Nakon toga nitroceluloza se ispiru tri puta po 10 minuta sa 5 mL pufera za blokiranje.

Za detekciju signala na membrani je korišten "C-digit" uređaj (*LI-COR Biosciences*, Lincoln, USA) koji snima kemiluminiscentni signal sa membrane. Membrana se natopi supstratom (200 µl supstrata A + 200 µl supstrata B) koji u interakciji sa enzimom koji je važan na anti-HA antitijela razvija kemiluminiscentni produkt.

3.6.6. Mjerenje aktivnosti sa stanicama kvasca

Kao supstrat korištena je 1 M otopina ksiloze, a kao kofaktor 2 mM otopina NADPH. NADPH je, osim kao kofaktor za ksiloza reduktazu, vrlo koristan jer olakšava praćenje aktivnosti reakcije. Naime, NADPH apsorbira svjetlost valne duljine 340 nm. To znači da će pad apsorbancije nakon nekog vremena značiti utrošak NADPH što jasno pokazuje aktivnost enzima.

U uzorak se dodaje 20 µL 1M otopine ksiloze, 10 µL uzorka suspenzije stanica koncentracije 1 OD/µL, 150 µL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 5.7. Ovakav sadržaj služi i kao slijepa proba. Reakcija se pokreće dodatkom 20 µL 0.2 mM NADPH. Prema tome, ukupni volumen reakcijske smjese je 200 µL. Radna temperatura je 35 °C. Nakon 0, 10, 20 i 30 minuta, reakcija se prekida centrifugom od 5 minuta pri 4 °C, na 3000 okretaja/min. Uzima se supernatant i mjerenje se radi spektrofotometrijski pri 340 nm.

3.6.7. Mjerenje aktivnosti sa stanicama kvasca pri različitim temperaturama

Aktivnost se mjeri na identičan način kao i u prethodno opisanom odlomku, uz razliku promjene radne temperature koja se kreće u intervalu od 20 do 60 °C i vrijeme trajanja reakcije od 10 minuta.

4. REZULTATI

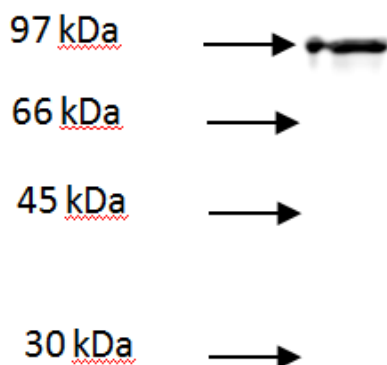
Cilj ovog rada bila je ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze te detekcija aktivnosti tako eksprimiranog proteina. U nastavku su navedeni rezultati eksperimentalnog rada.

4.1. Transformacija stanice kvasca

Transformacija kvasca provedena kao što je opisano u odjeljku 3.6.1. uz korištenje 5 μ L otopine plazmida *YEp351 Pir4XR*. Dobiven je značajan broj transformanata, dok je negativna kontrola potvrdila uspješnost postupka. Odabrano je osam kolonija koje su dodatno premještene na novu ploču na kojoj je napravljen njihov razmaz kako bi bio povećan broj stanica koje se mogu koristiti za rad. S kolonijama su odrađene analize s ciljem pronalaska kolonije koja daje najbolji rezultat. U ovom slučaju, to je najveća aktivnost.

4.2. Ekspresija proteina na staničnoj stijenci

Elektroforezom i Western blotom je ispitana uspješnost ekspresije rekombinantnog proteina. Ovaj korak bilo je nužno napraviti zato što je, prije mjerenja aktivnosti enzima, potrebno potvrditi da je enzim eksprimiran i pravilno lokaliziran. Stanice kvasca su razbijene, intracelularni sadržaj je uklonjen te su za daljnji postupak izolacije proteina korištene stanične stijenke, kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Rezultat jasno pokazuje prisutnost proteinske vrpce odgovarajuće molekulske mase (slika 7.) što potvrđuje da je ksiloza reduktaza eksprimirana i pravilno lokalizirana na stijenci stanice.

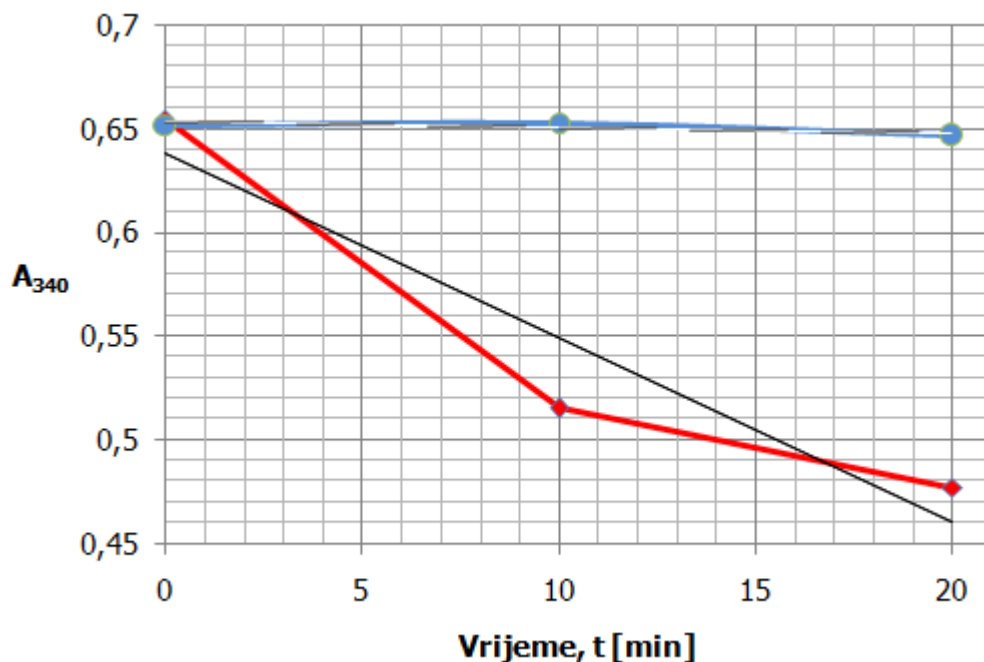


Slika 7. Prikaz rezultata Western blota snimljenih "C-digit" uređajem.

4.3. Detekcija aktivnosti ksiloza reduktaze

Kako bi se izbjegla pogreška u interpretaciji rezultata, aktivnost je mjerena paralelno sa stanicama koje su uzgajane na glukozi (bez eksprimirane ksiloza reduktaze) i sa stanicama koje su uzgajane na rafinozi i galaktozi (sa eksprimiranom ksiloza reduktazom). Na taj način eliminira se mogućnost da se neki podatak o aktivnosti pripiše ksiloza reduktazi, a zapravo je rezultat aktivnosti nekog drugog enzima. Stanice uzgojene na glukozi služe kao negativna kontrola.

Rezultati mjerenja aktivnosti prikazani su na slici 8. Prema tom grafu vidljiv je nagli pad apsorbancije što znači određenu aktivnost ksiloza reduktaze, a to je moguće tvrditi zato što nema značajnijeg pada apsorbancije sa stanicama uzgojenim na glukozi. Osim što je pravilno eksprimiran, protein je ostao i aktivan nakon imobilizacije. Enzim pokazuje aktivnost od $2,73845 \cdot 10^{-4}$ U.

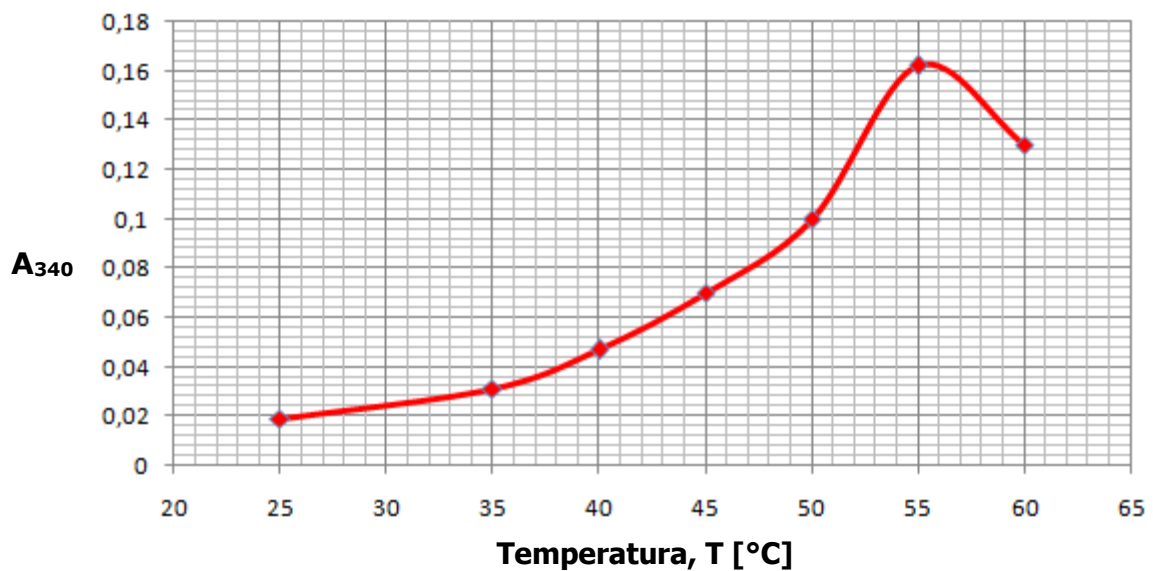


Slika 8. Aktivnost ksiloza reduktaze mjerena uz NADPH kao koenzim. Plava linija označava rezultate mjerenja aktivnosti sa stanicama uzgojenim na glukozi, a crvena sa stanicama uzgojenim na galaktozi.

4.4. Mjerenje aktivnosti u ovisnosti o temperaturi

Aktivnost je mjerena na identičan način kao prilikom detekcije aktivnosti uz razliku što je u ovom slučaju reakcijska smjesa inkubirana na temperaturama u intervalu od 20 do 60 °C s razlikama od 5 °C s trajanjem reakcije od 10 minuta.

Graf 2 na slici 9. prikazuje dobivenu ovisnost temeljem čega je vidljivo da je optimalna temperatura za aktivnost ksiloza reduktaze 55 °C.



Slika 9. Ovisnost brzine reakcije ksiloza reduktaze o temperaturi

5. RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* pripadnik je carstva *Fungi*. Morfološki ga karakterizira ovalni oblik stanice. Od davnih se vremena tradicionalno koristi u pekarstvu, pivarstvu i vinarstvu. Potpunim sekvenciranjem genoma kvasca postaje glavni modelni mikroorganizam genetičkog inženjerstva čijim se proučavanjem dobivaju saznanja o biokemijskim osnovama funkcioniranja stanice. Poznavanje genoma omogućuje modifikacije gena koje rezultiraju različitim mutiranim sojevima korištenim u istraživanjima, ali i mikrobiološkim proizvodnjama. Uzgoj biomase kvasca je vrlo jednostavan, ne zahtjeva skupe izvore energije, a istovremeno je brzina rasta vrlo visoka. Posjeduje sposobnost brze fermentacije izvora energije, a vrlo dobro tolerira i mikroaerobne uvjete.

Stanična stijenka kvasca je zbog svog raznolikog sastava i funkcija značajan predmet istraživanja čijim bi se rezultatima posljedično omogućila manipulacija koja bi pogodovala razvoju biotehnoloških, prehrambenih, farmaceutskih i drugih grana industrije. Osnovu stanične stijenke čine ugljikohidrati i proteini formirajući dva specifična sloja, unutrašnji i vanjski. Unutrašnji sloj karakterizira ugljikohidratna mreža β -1,3-glukana, β -1,6-glukana te hitina. Glavninu mreže čini β -1,3-glukan koji je odgovoran za čvrstoću i morfološki oblik stanice. β -1,6-glukan ima ulogu intermedijera između β -1,3-glukanskih lanaca i ostalih molekula, dok je hitin odgovoran za morfološke promjene tokom pupanjastanice kvasca. Vanjski sloj karakteriziran je visokim udjelom manoproteina. Manoproteini mogu za ostatak stijenke biti vezani kovaletno (GPI–proteini, PIR proteini) ili nekovalentno (Scw proteini). Odgovorni su za permeabilnost stijenke, akumulaciju negativnog naboja, selektivnost prema molekulama iz okoliša te zaštitu ostatka stijenke od tvari iz okoliša.

PIR proteini su često korišteni za ekspresiju rekombinantnih proteina. Najistraženiji predstavnik skupine je protein Pir4/Ccw5. Prvi zabilježeni slučaj ekspresije rekombinantnog proteina pomoću Pir4 bio je dio proteina A iz *Staphylococcus aureus*. Pir4 koristi se i u proizvodnji sLe^x, oligosaharidnog inhibitora leukocitnih selektina, koji olakšava prihvaćanje transplantiranog organa. Osim toga, razmatra se proizvodnja antigenskog fragmenta V8* koji djeluje protiv rotavirusa koji uzrokuje visoku smrtnost djece u nerazvijenim zemljama. U ovom radu Pir4 iskorišten je za ekspresiju rekombinantne ksiloza reduktaze.

Ksilitol je šećerni alkohol dobiven redukcijom ksiloze. Reakciju katalizira enzim ksiloza reduktaza. Enzim je nativno prisutan u citoplazmi kvasca, a za njegovu je ekspresiju odgovoran gen *GRE3*. Sekvencijske analize pokazuju da je ksiloza reduktaza hibrid koji pokazuje karakteristike aldoreduktazne i kratkolančane dehidrogenazno/reduktazne obitelji.

Ksiloza je šećer koji je obilno zastupljen u prirodi, najviše u drvnj i biljnoj biomasi. Osnovni je supstrat u proizvodnji ksilitola i bioetanola. Kvasac nema razvijen transportni sustav za unos ksiloze u stanicu već on ovisi o koncentraciji glukoze koja mora biti niska zato što transporteri prema glukozi pokazuju veći afinitet nego prema ksilozi te zato što je glukoza represor gena za transportere koji pokazuju afinitet prema ksilozi. Kad je unesena u stanicu, ksiloza je nizom reakcija uključena u pentoza fosfatni put, a posljedično i u glikolizu. Niskoafinitetni transport ksiloze u stanicu i lokalizacija ksiloza reduktaze u citoplazmi stanice otežavaju proizvodnju ksilitola i posljedično dovode do više cijene konačnog proizvoda. Ksilitol se najviše koristi u prehrani kao niskoenergetski zaslađivač koji ne djeluje negativno na zube i zubno meso kao ostali šećeri.

Cilj ovog rada jest konstrukcija sustava u kojem je stanica kvasca producent i imobilizator enzima koji se nalazi na njenoj stijenci, to jest, površini. Rekombinantna ksiloza reduktaza fuzionirana je sa Pir4 proteinom i preko njega vezana na stijenu kvasca. Imobilizacija enzima na površini stanice kvasca omogućila bi napredak u biotehnološkoj proizvodnji ksilitola koja više ne bi bila limitirana sporim transportom u stanicu i kompleksnim postupcima pročišćavanja što bi posljedično smanjilo cijenu ksilitola i učinilo ga dostupnijim. Kroz rad je istražena ekspresija ksiloza reduktaze, posjeduje li imobilizirani enzim aktivnost i kako ona ovisi o temperaturi.

Nakon transformacije kvasca plazmidom koji je nosio gen za rekombinantnu ksiloza reduktazu stanice kvasca su uzgojene na selektivnoj podlozi uz galaktozu kao izvor ugljika. Prisutnost galaktoze u podlozi pokreće ekspresiju sa *GALI* promotora pod čijom se kontrolom na plazmidu nalazi gen za rekombinantni enzim. Nakon toga su stanice kvasca izdvojene iz podloge i razbijene staklenim kuglicama kako bi se odvojila stanična stijenska, na koju bi trebao biti vezan rekombinantni enzim, od intracelularnog sadržaja. Stijenke su dodatno isprane da se uklone nekovalentno vezani proteini, nakon čega su ekstrahirane pomoću NaOH kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Ekstrahirani proteini su podvrgnuti elektroforezi i Western blotu kako bi se ustanovilo da li je enzim uspješno eksprimiran i pravilno ugrađen u staničnu stijenu. Rezultati su pokazali prisutnost proteinske vrpce odgovarajuće veličine od ≈ 96 kDa, što je očekivano jer je riječ o rekombinantnom proteinu koji sadrži Pir protein ($M_r \approx 48$ kDa) i ksiloza reduktazu ($M_r \approx 37$ kDa) uz dodatak 6xHis i HA „tagova“. Ovim je rezultatom potvrđeno da su ekspresija i lokalizacija ksiloza reduktaze uspješni.

Mjerenje enzimske aktivnosti enzima uz korištenje NADPH kao koenzima pokazalo je da imobilizirani oblik enzima posjeduje aktivnost od $2,73485 \cdot 10^{-5}$ U/OD₆₀₀ jedinici. Jedinice aktivnosti predstavljaju μ mole NADPH proizvedene po minuti odvijanja reakcije uz 10 μ l suspenzije stanica koje su korištene kao izvor enzima. Koncentracija stanica kvasca u suspenziji izražava se preko optičke gustoće suspenzije mjerene pri 600 nm valne duljine, pri čemu se optička gustoća stanica koja daje $A_{600} = 1$ naziva 1 OD₆₀₀ jedinicom i sadrži oko 10^6 stanica kvasca. Budući da nije moguće izmjeriti kolika je masa rekombinantnog enzima prisutna na staničnim stijenkama ne može se točno odrediti niti specifična aktivnost preparata, već se izražava kao broj jedinica enzimske aktivnosti po jedinici optičke gustoće suspenzije stanica. Dobiveni rezultat se iz tog razloga ne može usporediti sa literaturnim podacima o specifičnoj aktivnosti drugih ksiloza reduktaza. Mjerenjem aktivnosti kroz 20 minuta odvijanja reakcije, kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode“, dobivena je linearna ovisnost pada apsorbancije NADPH pri 340 nm o vremenu trajanja reakcije, što potvrđuje da su dobiveni rezultati posljedica enzimske aktivnosti ksiloza reduktaze. Paralelno mjerenje aktivnosti sa stanicama koje nemaju eksprimiranu ksiloza reduktazu, budući da su uzgojene na glukozi, pokazuje izostanak pada apsorbancije (slika 8.) što potvrđuje da je aktivnost izmjerena sa stanicama uzgajanim na galaktozi stvarno rezultat djelovanja rekombinantne ksiloza reduktaze.

Mjerenje aktivnosti rekombinantnog enzima pri različitim temperaturama pokazuje optimalnu aktivnost enzima pri 55 °C. Literaturni podaci o ksiloza reduktazama iz drugih kvasaca daju podatak o rasponu temperaturnog optimuma od 45 do 60 °C pa se dobiveni podatak uklapa u prosječno dobivene rezultate. Međutim, budući da pri povišenju temperature dolazi i do spontanog raspada NADPH preporučljivo je mjerenja aktivnosti provoditi pri nižoj temperaturi, kako spontani raspad NADPH ne bi utjecao na dobivene rezultate.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata eksperimentalnog rada, može se zaključiti sljedeće:

1. Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uspješno su transformirane plazmidom *YEp351Pir4XR* u kojem je gen za ksiloza reduktazu, *GRE3*, fuzioniran sa genom *PIR4*, a ekspresija fuzioniranih gena je pod kontrolom *GAL1* promotora.
2. Rekombinantna ksiloza reduktaza uspješno je eksprimirana i lokalizirana na površini stanične stijenke kvasca.
3. Rekombinantna ksiloza reduktaza pokazuje aktivnost od $2,73845 \cdot 10^{-5} \text{U/OD}_{600}$ jedinici kvasca.
4. Optimalna temperatura za aktivnost enzima je 55 °C.

7. LITERATURA

1. Abe H., Shimma Y., Jigami Y. (2003) *In vitro* oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell-wall anchored protein Pir. *Glycobiology*. 13, 87-95
2. Almeida, J.R.M., Bertilsson, M., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M.F. (2009) Carbon fluxes of xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains are affected differently by NADH and NADPH usage in HMF reduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 751-761
3. Andres L., Rodriguez-Diaz J., Buesa J., Zueco J. (2006) Yeast expression of the VP8* fragment of the rotavirus spike protein and its use as immunogen in mice. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 89-98
4. Bohren K.M., Grimshaw C.E., Lai C.J., Harrison D.H., Ringe D., Petsko G.A., Gabbay K.H. (1994) Tyrosine-48 is the proton donor and histidine-110 directs substrate stereochemical selectivity in the reduction reaction of human aldose reductase: enzyme kinetics and crystal structure of Y48H mutant enzyme. *Biochemistry*. 33, 2021-2032
5. Bony M., Thines-Sempoux D., Barre P., Blondin B. (1997) Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol.* 179, 4929-4936
6. Bruinenberg P.M., de Bot P.H.M., van Dijken J.P. and Scheffers (1984) NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *W. A. Appl. Microbiol. Biotech.* 19, 256-260
7. Capellaro C., Mrša V., Tanner W. (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* 180, 5030-5037
8. Castillo L., Martinez A.I., Garcera A., Elorza M.V., Valent E., Sentandreu R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast*. 20, 973-983
9. Conzelmann A, Spiazzi A, Hyman R, Bron C. (1986) Anchoring of membrane proteins via phosphatidylinositol is deficient in two classes of Thy-1 negative mutant lymphoma cells. *EMBO J.* 15, 3291-3296
10. Counsell J.M. (1977) Xylitol. *Papers of Int. Symp.*
11. Diderich J.A., Schepper M., Hoek P., Luttik. M.A.H., Dijken J.P., Pronk J.T., Klaassen P., Boelens H.F.M., Mattos M.J.T., Dam K., Kruckeberg A.L. (1999) Glucose Uptake Kinetics and Transcription of *HXT* Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 274, 15350-15359
12. Dieters W. (1975) Xylitol production from D-xylose. *Swiss Patent 560175*

13. Doering T.L. i Franzot S.P. (1999) Inositol acylation of glycosylphosphatidylinositols in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* and the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 1, 25-32
14. Doering T.L., Masterson W.J., Englund P.T., Hart G.W. (1989) Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J. Biol.Chem.* 11168-11173
15. Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V. Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J. Bacteriol.* 281, 11523-11529
16. Farwick A., Bruder S., Schadeweg V., Oreb M., Boles E. (2013) Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 111, 5159-5164
17. Furukawa K., Tagaya M., Tanizawa K., Fukui T. (1993) Role of the conserved Lys-X-Gly-Gly sequence at the ADP-glucose-binding site in *Escherichia coli* glycogen synthase. *J. Biolog. Chem.* 32, 23837-23842
18. Goldman R.C., Sullivan P.A., Zakula D., Capobianco J.O. (1995) Kinetics of β -1,3 Glucan Interaction at the Donor and Acceptor Sites of the Fungal Glucosyltransferase Encoded by the *BGL2* Gene. *European Journal of Biochem.* 227, 372-378
19. Granstörn T.B., Izumori K., Leisola M. (2007) A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 277-281
20. Granstörn T.B., Izumori K., Leisola M. (2007) A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 273-276
21. Hamacher T., Becker J., Gardonyi M., Hahn-Hägerdal B., Boles E. (2002) Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transport and their influence on xylose utilization. *Microbiology.* 148, 2783-2788
22. Härkönen M., Noujua P. (1979) Eri tekijöiden vaikutus ksyloosin katalyyttiseen hydraulukseen ksyliitoliksi. *Kemia-Kemi.* 6, 445-447
23. Hartland R.P., Fontaine T., Debeaupuis J.P., Simenel C., Delepierre M., Latge J.P. (1996) A novel β -(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 271, 26843-26849
24. Jeong E.Y., Sopher C., Kim I.S., Lee H. (2001) Mutational study of the role of tyrosine-49 in the *Saccharomyces cerevisiae* xylose reductase. *Yeast.* 18, 1081-1089
25. Jörnvall, H., Petersson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J, Ghosh D. (1995). Short chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry.* 34, 6003-6013
26. Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 26, 239-256

27. Krainer E., Stark R. E., Naider F., Alagramam K., Becker J. M. (1994) Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle-spinning C-13-NMR. *Biopolymers*. 34, 1627–1635
28. Krull L.N., Inglett G.E. (1980) Analysis of neutral carbohydrates in agricultural residues by GLC. *J. Agric. Food Chem.* 28, 17-19
29. Lee H. (1998) The structure and function of yeast xylose (aldose) reductases. *Yeast*. 14, 977-984
30. Lee H., Atkin A.L., Barbosa M.F., Dorscheid D.R., Schneider H. (1988) Effect of biotin limitation on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*. *Enz. Micro. Tech.* 10, 81-84
31. Lee W.J., Kim M.D., Ryu Y.W., Bisson L.F., Seo J.H. (2002) Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 186-191
32. Lipke P.N., Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and challenges. *J. Bacteriol.* 180, 3735-3740
33. Lohman R. L. (1957) Xylitol. *The Carbohydrates Chemistry, Biochemistry and Physiology*. 245
34. Mäkinen K. (1992) Dietary prevention of dental caries by xylitol-clinical effectiveness and safety. *J. Appl. Nutr.* 44, 16-28
35. Mazur P., Morin N., Baginsky W., el-Sherbeini M., Clemas J.A. i sur. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5671-5681
36. Melaja A., Hämäläinen L., Heikkilä H.O. (1981) Menetelmä ksylitolin suhteen rikastuneen polyolin vesiliuoksen valmistamiseksi. *Finnish patent 589388*
37. Melaja A.J., Hamalainen L. (1975) Process of making xylitol. *USA patent 4008285*
38. Meyrial V., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1991) Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*. Fermentation behaviour. *Biotech. Lett.* 13, 281-286
39. Moor H., Mühlethaler K. (1963) Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell. Biol.* 17, 609-628
40. Moukadiri L., Jaafar L., Zueco J. (1999) Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *saccharomyces cerevisiae mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. *J. Bacteriol.* 181, 4741-4745
41. Mouyna I., Fontaine T., Vai M., Monod M., Fonzi W.A., Diaquin M., Popolo L., Hartland R.P., Latge J.P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 275, 14882-14889
42. Mrša V., Seidl T., Gentsch M., Tanner W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13, 1145-1154

43. Müller G., Groß E., Wied S., Bandlow W. (1996) Glucose-Induced Sequential Processing of a GlycosylPhosphatidylinositol-Anchored Ectoprotein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 442–456
44. Nigam P., Singh D. (1995) Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. *Process. Biochemistry.* 30, 117-124
45. Nuoffer, C., Horvath, A. & Rietzman, H. (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem.* 268, 10558–10563
46. Öhgren K., Bentsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi G. (2006) Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in stem-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J. Biotechnol.* 126, 488-498
47. Onishy H., Suzuki T. (1966) The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 30, 1139-1144
48. Orlean P. (1997) Biogenesis of yeast wall and surface components. In J. Pringle, J. Broach and E. Jones (ed.), *Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces, Vol. 3. Cell cycle and cell biology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 229-362
49. Orlean P. (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics.* 192, 775–818
50. Rees D.A., Scott W.E. (1971) Polysaccharide conformation. Part VI. Computer model-building for linear and branched pyranoglycans. Correlations with biological function. Preliminary assessment of inter-residue forces in aqueous solution. Further interpretation of optical rotation in terms of chain conformation. *J. Chem. Soc. (B)*, 469-479
51. Rizzi M., Erlemann P., Bui-Thanh N., Dellweg H. (1984) Xylose fermentation by yeasts: 4. purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 148-154
52. Roca C., Olsson L. (2003) Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 560-3
53. Salo H., Sievi E., Suntio T., Mecklin M., Mattila P., Renkonen R., Makarow M. (2005) Co-expression of two mammalian glycosyltransferases in the yeast cell wall allows synthesis of sLex. *FEMS Yeast Res.* 5, 341-350
54. Schneider H., Lee H., Barbosa M., Kubicek C., James A.P. (1989) Physiological properties of a mutant of *Pachysolen tannophilus* deficient in NADPH-deficient D-xylose reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2877-2881
55. Smits G.J., Schenken L.R., Brul S., Pringle J.R., Klis F.M. (2006) Role of cell cycle-regulated expression in the localized incorporation of cell wall proteins in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 17, 3267-3280

56. Spellman P.T., Sherlock G., Zhang M.Q. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9, 3273-3297
57. Stevens V.L., Raetz C.R. (1991) Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. *J Biol Chem.* 266, 10039-10042
58. Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010) Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technology and Biotechnology.* 48, 317–328
59. Toh-e A., Yasunaga S., Nisogi K., Tanaka K., Oguchi T., Matsui Y. (1993.) Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast.* 9, 481-494
60. Toivari, M. H., Salusjarvi, L., Ruohonen L., Penttilä M. (2004) Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3681-3686
61. Vongsuvanlert V., Tany Y. (1988) L-Iditol production from L-sorbose by a methanol yeast *C.boidinii*. *J. Ferment. Technol.* 66, 517-523
62. Watanabe D., Utsugi T., Minemura M., Hirata A., Abe M., Ohya Y. (2002.) Movement of yeast 1,3-β-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes to Cells.* 7, 1-9
63. Webb S.R., Lee H. (1990) Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. *Biotechnol.* 9, 685-697
64. Wilcox L.J., Balderes D.A., Wharton B., Tinkelenberg A.H., Rao G., Sturley S.L. (2002) Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 32466-32472
65. Yokoyama S.I., Suzuki T., Kawai K., Horitsu H., Takamizawa K. (1995) Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. *J. Ferm. Bioeng.* 79, 217-223

Zadnja stranica završnog rada

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta