

Rezistencija transformiranih sojeva kvasca s pojačanom ekspresijom odabranih gena na inhibitore rasta

Moguš, Leo

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:849682>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Leo Moguš

7198/BT

**REZISTENCIJA TRANSFORMIRANIH SOJEVA
KVASCA S POJAČANOM EKSPRESIJOM
ODABRANIH GENA NA INHIBITORE RASTA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Rezistencija transformiranih sojeva kvasca s pojačanom ekspresijom odabranih gena na inhibitore rasta

Leo Moguš, 0058207991

Sažetak: Jedan od pravaca razvoja u svrhu zadovoljavanja stalno rastućih potreba za energijom je proizvodnja biogoriva odnosno bioetanola iz otpadnih sirovina poljoprivrede, šumarstva i drvoprerađivačke industrije. Ove lignocelulozne sirovine su izvor jednostavnih šećera koji se fermentiraju u etanol. U ovim bioprocima, zbog svojih mnogobrojnih prednosti, radni mikroorganizam je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Međutim, spojevi koje kvasac može fermentirati, iz lignoceluloznih sirovina se dobivaju predobradom sirovine, tijekom koje nastaju i inhibitori rasta i fermentacije, kao što su octena i levulinska kiselina te 2-furaldehid. Budući da ovi spojevi uvelike otežavaju proizvodnju bioetanola, mnoga istraživanja su usmjerena prema konstrukciji novih sojeva kvasca, otpornijih na inhibitore rasta i fermentacije. Zbog toga je u ovom radu istražen utjecaj ekspresije osam gena na otpornost soja kvasca, izoliranog Sladorane d.o.o. Županja, prema pojedinim inhibitorima rasta. Dobiveni rezultati ukazuju na zaključak da pojačana ekspresija gena *YAP1* i *CTA1* doprinosi otpornosti kvasca na levulinsku kiselinu i 2-furaldehid te da na otpornost kvasca prema 2-furaldehidu pozitivno utječe i pojačana ekspresija gena *ATR1* i *GSH1*.

Ključne riječi: *ATR1*, *G2*, *ZWF1*, *GSH1*, *FLR1*, *YAP1*, *YML*, *YDR*, *AC*, kvasac, plazmid, rezistencija, inhibitori rasta

Rad sadrži: 21 stranica, 6 slika, 27 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Anamarija Štafa

Datum obrane: 16.7.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Resistance of transformed yeast breeds with overexpression of selected genes on growth inhibitors

Leo Moguš, 0058207991

Abstract: In order to meet the constantly growing energy needs, one of directions in the production of biofuels or bioethanol, is using waste materials of agriculture, forestry and wood processing industry. In these bioprocesses, due to its many advantages, the producer microorganism is the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Although lignocellulosic materials are the source of simple sugars that are fermented into ethanol, the compounds that the yeast can ferment are obtained by pre-treatment during which growth and fermentation inhibitors, such as acetic and levulinic acid and 2-furaldehyde, are also formed. Since these compounds greatly impede bioethanol production, different studies have focused on the construction of new yeast strains that are more resistant to growth and fermentation inhibitors. Therefore, the influence of the overexpression of eight genes on the resistance of the yeast strain isolated from Sladorana d.o.o. Županja, to individual growth inhibitors, was investigated in this paper. The obtained results suggest that overexpression of *YAP1* and *CTA1* genes contributes to yeast resistance to levulinic acid and 2-furaldehyde and that yeast resistance to 2-furaldehyde is enhanced by overexpression of *ATR1* and *GSH1* genes.

Keywords: *ATR1*, *G2*, *ZWF1*, *GSH1*, *FLR1*, *YAP1*, *YML*, *YDR*, *AC*, yeast, plasmid, resistance, grow inhibitors

Thesis contains: 21 pages, 6 figures, 27 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: professor Ivan-Krešimir Svetec, Ph.D.

Technical support and assistance: assistant professor Anamarija Štafa, Ph.D.

Thesis defended: 16.7.2018.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
Korištenje kvasaca u proizvodnji bioetanola.....	2
Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Genetičke modifikacije s pozitivnim utjecajem u proizvodnji bioetanola.....	3
Korištenje lignoceluloznih sirovina u proizvodnji bioetanola.....	4
3. MATERIJALI I METODE.....	7
Materijali.....	7
Mikroorganizmi.....	7
Plazmidi.....	7
Hranjive podloge.....	10
Otopine za određivanje utjecaja inhibitora na rast mikroorganizma.....	11
Metode.....	11
Određivanje preživljenja mikroorganizma na krutim podlogama s inhibitorima rasta.....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	12
Otpornost sojeva kvasca na inhibitore rasta.....	12
Otpornost na octenu kiselinu.....	13
Otpornost na levulinsku kiselinu.....	13
Otpornost na 2-furaldehid.....	15
5. ZAKLJUČCI.....	18
6. LITERATURA.....	19

UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jedan od najznačajnijih modelnih organizama za istraživanje gotovo svih bioloških procesa karakterističnih za eukariotsku stanicu. Zahvaljujući činjenici da DNA, koja se unese u stanicu, podliježe homolognoj rekombinaciji, razvijeni su rutinski postupci kojima se u kvašćev genom uvode ciljane genetičke promjene (Sherman, 2002). Pored ogromnog značaja u znanstvenim istraživanjima, kvasac je i jedan od najvažnijih industrijskih mikroorganizama, a tradicionalno se koristi u bioprocima u kojima nastaje etanol. Zbog svega navedenog, kvasac *S. cerevisiae* je prvi izbor i kao radni mikroorganizam u procesu proizvodnje bioetanola (Dunlop, 2011).

Zbog stalnog povećanja potrošnje energije, intenzivno se istražuju novi održivi izvori i načini proizvodnje energije, koji bi ujedno smanjili zagađenje okoliša i globalno zagrijavanje. Jedan od prioritarnih pravaca u tom smislu je istraživanje proizvodnje biogoriva, prvenstveno bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, otpadnih sirovina poljoprivrede, šumarstva i drvoprerađivačke industrije. Jedan od najvećih nedostataka ovog pristupa je nužnost predobrade lignoceluloznih sirovina u svrhu oslobađanja fermentabilnih spojeva, pri čemu nastaju i inhibitori rasta i fermentacije. Stoga se veliki naponi ulažu u razvoj radnih mikroorganizama, prvenstveno kvasaca otpornih na inhibitore rasta i fermentacije.

Zbog svega navedenog, opći cilj ovog rada jest doprinijeti istraživanjima čiji je cilj razvoj novih sojeva kvasca pogodnih za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. U tu svrhu, konkretni cilj rada je istražiti utjecaj povećane ekspresije odabranih gena (*GSH1*, *CTA1*, *FLR1*, *YAP1*, *YDR541C*, *YML131W*, *ZWF1* i *ATR1*) u soju kvasca koji je izoliran iz Sladorane d.o.o. Županja, na njegovu otpornost prema inhibitorima rasta (octena i levulinska kiselina te 2-furaldehid), koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina u postupku proizvodnje bioetanola.

TEORIJSKI DIO

Korištenje kvasaca u proizvodnji bioetanola

Jedna od najstarijih tehnologija općenito je proizvodnja alkohola, alkoholnim vrenjem pomoću kvasaca. Ova se tehnologija održala sve do danas te se kvasci primjenjuju u biotehnološkim procesima proizvodnje piva, vina, prehrambenih proizvoda i biogoriva. (Dashko i sur., 2014).

Primjena kvasaca u konverziji škrobnih sirovina, poput slatkog krumpira, palme (*Cycas revoluta*) te nefermentiranog palminog soka u etanol se provode bez poteškoća. Primjenu lignoceluloznih sirovina, u ove svrhe je potrebno detaljnije istražiti zbog prisutnosti hemiceluloze i lignina u polaznoj sirovini. Naime, razgradnja navedenih komponenata uzrokuje pojavu inhibitora rasta radnog mikroorganizma u reakcijskoj smjesi za proizvodnju bioetanola. Vrsta i koncentracija određenih inhibitora ovisi o upotrijebljenoj tehnici predobrade (Jönsson i Martín, 2016). Hidrolizati hemiceluloze i lignina sadrže spojeve poput furfurala i hidroksimetilfurfurala, koji djeluju kao inhibitori rasta, te pentoze, koje divlji tip kvasca ne može prevesti u etanol (Ruriani i sur., 2012). Nastali spojevi utječu na proces proizvodnje i sam krajnji proizvod procesa.

U proizvodnji bioetanola se koristi nekoliko vrsta, ali su najčešći sojevi kvasaca *S. cerevisiae*, *S. stipitis*, *S. pombe* (Azhar i sur., 2017). Potrebne karakteristike kvasaca korištenih u proizvodnji bioetanola su tolerancija visokih koncentracija etanola, visoki prinosi, što veća sposobnost konverzije supstrata u etanol te tolerancija na inhibitore rasta. Zbog svega navedenog se, kako bi se zadovoljila isplativost proizvodnog procesa, koriste genetički modificirani sojevi *S. cerevisiae*, najčešće korištenog kvasca u ovom procesu, s potrebnim karakteristikama.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* pripada porodici *Saccharomycetaceae* i redu *Ascomycota*. Haploidni genom kvasca *S. cerevisiae* je veličine oko 13,5 Mb, s oko 5800 gena. Ovaj nepatogeni mikroorganizam dobro raste na kompleksnim i kemijski definiranim podlogama, s generacijskim vremenom od približno 90 minuta pri 28-30 °C (Salari i Salari, 2017). Kvasac *S. cerevisiae* može postojati u haploidnom i diploidnom obliku te se kao takav može razmnožavati pupanjem, odnosno mitozom, a haploidni i diploidni stanični ciklus povezuje seksualna reprodukcija. Naime, haploidne stanice iskazuju jedan od dva tipa parenja (**a** ili **α**) pa dvije

haploidne stanice, isključivo različitog tipa parenja, mogu konjugirati, tj. fuzionirati u diploidnu stanicu (zigotu) iz koje nastaje diploidna stanica, koja ima tip parenja **a/a**. Kao i haploidna, diploidna stanica se može razmnožavati pupanjem (mitozom), ali za razliku od haploidne, može ući i u mejotičku diobu. Kao rezultat mejoze nastaje askus, koji sadrži četiri haploidne spore (dvije **a**- i dvije **a**-tipa parenja). Iz haploidnih spora se razvijaju haploidne stanice, koje se mogu razmnožavati mitozom (pupanjem) ili mogu konjugirati sa stanicom različitog tipa parenja, ponovno dajući diploidnu stanicu **a/a**-tipa parenja.

(Herskowitz, 1988).

Kvasac je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran (Goffeau i sur., 1996) i ima široku primjenu kao modelni eukariotski organizam u istraživanjima apoptoze (Owsianowski i sur., 2008; Madeo i sur., 2002), starenja (Burhans i Weinberer, 2007; Longo i sur., 2012), neurodegenerativnih bolesti (Khurana i Lindquist, 2010) te genske terapije, zbog uspješne homologne integracije transformirajuće DNA (Hinnen i sur. 1978; Orr-Weaver i sur., 1981). Osim toga, kvasac *S. cerevisiae* se koristi i u modernoj biotehnologiji za proizvodnju različitih lijekova (Menacho-Marquez i Marguia, 2007) i finih kemikalija (Chemler i sur., 2006).

Genetičke modifikacije s pozitivnim utjecajem u proizvodnji bioetanolu

Dosadašnja su istraživanja dokazala kako određeni proteini pomažu rezistenciji kvasca na inhibitore rasta. Mehanizmi djelovanja svih inhibitora još uvijek nisu poznati.

Gen *ATR1* kodira za transmembranski protein *Atr1* koji je odgovoran za pumpanje aminotriazola iz stanice i rezistenciju na štetne spojeve (Kanazawa i sur., 1988). Konstruirani sojevi s pojačanom ekspresijom gena *ATR1* su uzgajani u prisutnosti različitih inhibitora rasta (koniferil aldehid, 2-furaldehid, hidroksimetilfurfural i hidrolizat smreke) te je pojačana ekspresija pogodovala rezistenciji na inhibitore (Alriksson i sur., 2010). Slično djelovanje ima i gen *FLR1* (također kodira za transmembransku pumpu), tj. dokazano pozitivno utječe na rezistenciju stanice u prisutnosti inhibitora rasta, hidroksimetilfurfural i koniferil aldehid. (Alriksson i sur. 2010).

Gen *CTA1* kodira za enzim peroksisomalnu katalazu A koji je odgovoran za zaštitu stanica od toksičnih agenasa i H₂O₂. Gen *YDR* kodira za enzim odgovoran na kemijske agense te temperaturni šok stanica, a pripada skupini ABC (*ATP Binding Cassette*) proteina (Miyahara i sur., 2014). Gen *YML* kodira za enzim lizozim koji pripada c-tipu (*chicken-type*) vrste lizozima te hidrolizira β-1,4-glikozidne veze (Jiang i sur., 2015). Navedeni geni utječu na rezistenciju na inhibitore rasta, ali njihovi mehanizmi djelovanja nisu još u potpunosti objašnjeni.

Gen *YAP1* kodira za transkripcijski faktor *Yap1* te tako kontrolira regulon više od 32 proteina, koji sudjeluju u odgovoru stanice na oksidativni stres i H₂O₂ (Lee i sur., 1999). Istraživanja su pokazala kako pojačana ekspresija ovog gena pozitivno utječe na rezistenciju sojeva na hidrosimetilfurfural (Alriksson i sur., 2010).

Gen *ZWF1* kodira za enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenazu koji je uključen u pentoza-fosfatni put i sintezu NADPH. Pojačanom ekspresijom navedenog gena je omogućen rast na furfuralu do koncentracije, inače toksične za kvasac *S. cerevisiae*. Način djelovanja nije u potpunosti opisan, ali su istraživanja pokazala kako enzimi uključeni u pentoza-fosfatni put pomažu u zaštiti i popravku oksidativnih oštećenja uzorkovanih furfuralom (Gorisch i sur., 2005).

Gen *GSH1* kodira za γ -glutamilstein sintetazu i inducira se u prisutnosti oksidirajućih spojeva (Stephen i sur., 1995). Pojačanom ekspresijom ovog gena dolazi do nakupljanja glutationa u stanici te bolje zaštite stanice na djelovanje toksičnih metabolita, detoksikacije i antioksidativnog djelovanja (Ask i sur., 2013).

Korištenje lignoceluloznih sirovina u proizvodnji bioetanol

Lignocelulozna sirovina je održiva sirovina koju biorafinerije mogu koristiti, kako bi ispunile sve veće potrebe za energijom. Pretvorba lignoceluloznih sirovina u biogorivo ima nekoliko prednosti, poput smanjenja emisije stakleničkih plinova, smanjenja ovisnosti o fosilnim gorivima te predstavlja poboljšanje po pitanju energetske sigurnosti (integracija s industrijama kojima je ova sirovina otpad, omogućava stalnu dobavu sirovine i proizvodnju etanola). Etanol dobiven iz lignocelulozne sirovine se često naziva i etanolom druge generacije, dok se onaj dobiven iz šećerne trske, kukuruza, pšenice ili neke druge škrobne sirovine naziva etanolom prve generacije (Kumar i sur., 2016). Sve veća upotreba algi u biotehnologiji i istraživanjima, dovela je do proizvodnje etanola treće generacije, čija proizvodnja ima više prednosti od etanola prve i druge generacije (Jambo i sur., 2016). Ipak, zbog potrebe za velikom površinom za postrojenje proizvodnje etanola treće generacije, istraživanja su usmjerena prema poboljšanju procesnih parametara proizvodnje etanola druge generacije.

Upotreba lignoceluloznih sirovina u proizvodnji bioetanol je obilježena većim poteškoćama prilikom izdvajanja celuloze i fermentabilnih molekula iz prirodnih izvora, no što je to slučaj sa škrobnim sirovinama, što je povezano s problemom predobrade, koja zahtjeva utrošak energije i kemikalija. Glavne građevne jedinice lignoceluloznih sirovina su tri polimera: celuloza, hemiceluloza te lignin. Ovisno o vrsti lignocelulozne sirovine, polimeri su različito raspoređeni u prostoru, zajedno s drugim komponentama (acetilne grupe, minerali, fenolni supstituenti).

Robusnost i otežano manipuliranje ovom sirovinom su posljedica kristaličnosti celuloze, hidrofobnosti lignina te inkapsulacije celuloze lignin- hemiceluloznim matriksom (Isikgor i Becer, 2016).

Niska pretvorba enzima u količine dostatne za upotrebu, nepotpuna pretvorba šećera u goriva i kemikalije te potrebna provedba destilacije, postupak još uvijek čine neefikasnim i izrazito skupim (Kumar i sur., 2016). Stoga se provode intenzivna istraživanja na ovom polju, kako bi se optimirali uvjeti procesa te poboljšala njegova produktivnost.

Predobrada lignoceluloznih sirovina

Prije početka fermentacije i konverzije lignocelulozne sirovine u bioetanol, potrebno je provesti odgovarajuću predobradu sirovine. Kako bi se lignocelulozna sirovina rastavila na svoje osnovne komponente (celuloza, hemiceluloza i lignin), nije dovoljno upotrijebiti procese s jednim korakom predobrade (piroliza) zbog neučinkovitosti procesa. Razlikuju se mehaničke, kemijske, fizikalno-kemijske, biološke metode ili kombinacija više metoda (Isikgor i Becer, 2016).

Kiselinskom predobradom lignoceluloznih sirovina se oslobađaju oligo- i disaharidi, heksoze, pentoze te fenolne komponente. Daljnjim tretmanima dobivenih komponenti, oslobađaju se jednostavniji spojevi, među kojima su šećeri glukoza, manoz, galaktoza te ksiloza i arabinoza, koji mogu biti konvertirani u etanol. Uz šećere, nastaju i furani te alifatske karboksline kiseline (octena, levulinska kiselina i dr.), koji inhibiraju rast radnog mikroorganizma i time ometaju proces konverzije lignoceluloznih sirovina u etanol.

Istraživanja u području razvoja novih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina su od iznimnog značaja za povećanje efikasnosti i smanjenja troškova procesa proizvodnje etanola. Integracija različitih metoda predobrade s drugim procesima poput ošćerenja, detoksifikacije i fermentacije hidrolizata, mogu značajno smanjiti ukupne troškove procesa (Isikgor i Becer, 2016). Ujedno su integracije ovih procesa i metoda u skladu sa strategijama Europske unije, koje ističu potrebu za razvojem i implementacijom integriranih, ekonomski i ekološki isplativih procesa.

Inhibitori rasta nastali predobradom lignoceluloznih sirovina

Kako je ranije spomenuto, predobradom lignoceluloznih sirovina, uz oslobađanje jednostavnijih šećera potrebnih za fermentaciju u etanol, oslobađaju se i komponente koje inhibiraju rast mikroorganizama koji provode fermentaciju.

Furfural (2-furaldehid) i 5-hidroksimetilfurfural (HMF) su glavni toksični derivati furfurana, nastali kiselinskom predobradom lignoceluloznih sirovina. Prisutnost navedenih komponenata uzrokuje smanjeno preživljenje radnog mikroorganizma, smanjenje prinosa etanola te produktivnosti. Istraživanja su pokazala kako postoje zajednički metabolički putevi u razgradnji furfurala i HMF-a, a za razgradnju je potrebna prisutnost proteina kojima kodira *hmf* skupina gena (Koopman i sur., 2010)

Levulinska kiselina, poznata još kao i 4-oksopentanska kiselina, se razmatra kao obećavajući intermedijer u sintezi nekolicine važnih kemikalija, otapala, aditiva i farmaceutika (Pileidis i Titirici, 2016). Ipak, u metabolizmu je levulinska kiselina kompetitivni inhibitor δ -ALA dehidrataze, enzima koji katalizira kondenzaciju dviju molekula δ -aminolevulinske kiseline u monopirol porfobilinogen, intermedijera biosintere porfirina. (Jaenchen, 1981). Time inhibira rast radnog mikroorganizma u procesu proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina i smanjuje prinos željenog proizvoda.

Prisutnost octene kiseline uzrokuje inhibiciju enzima u metaboličkom putu sinteze metionina u stanici mikroorganizma. Octena kiselina inhibira enzim koji omogućava reakciju prevođenja homocisteina u metionin, čime dolazi do nakupljanja homocisteina u stanici. Ovaj je spoj toksičan te njegovim nakupljanjem u stanici dolazi do smrti stanice. Također, inhibicija octenom kiselinom se objašnjava i time da je mikroorganizam auksotrof na metionin, budući ga nije više u mogućnosti sam sintetizirati. (Roe i sur., 2002)

MATERIJALI I METODE

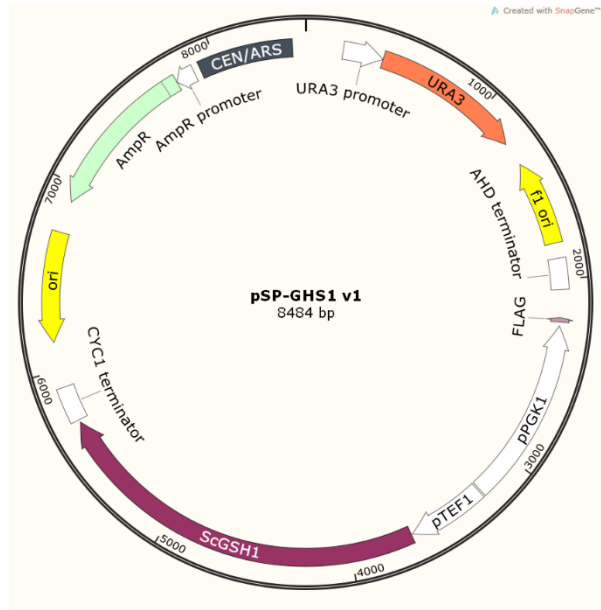
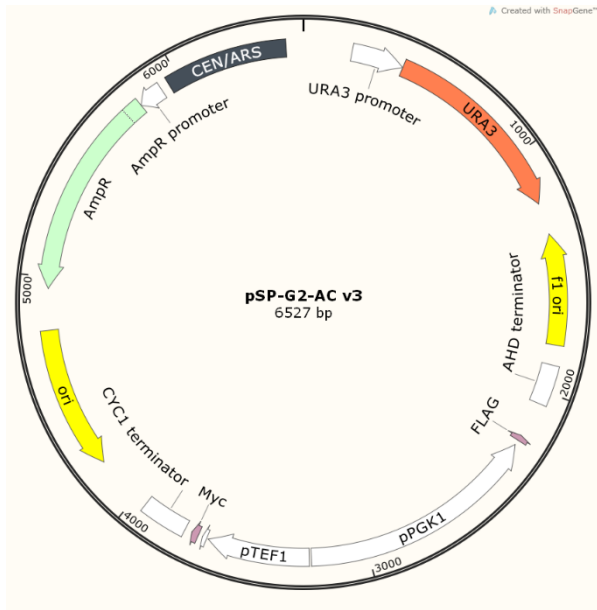
Materijali

Mikroorganizmi

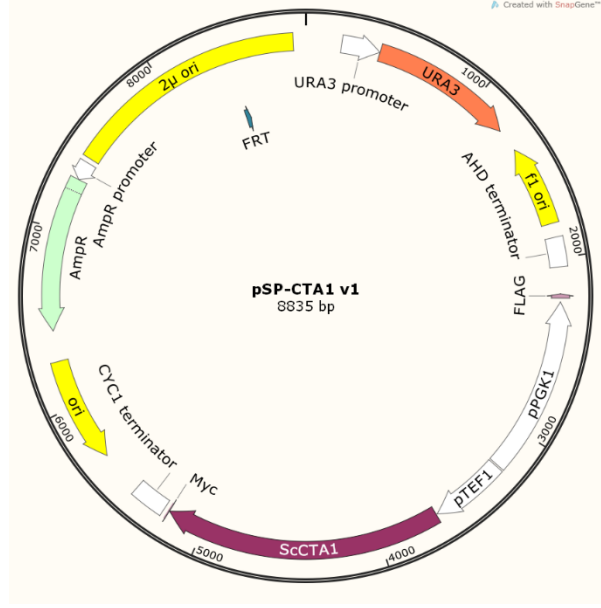
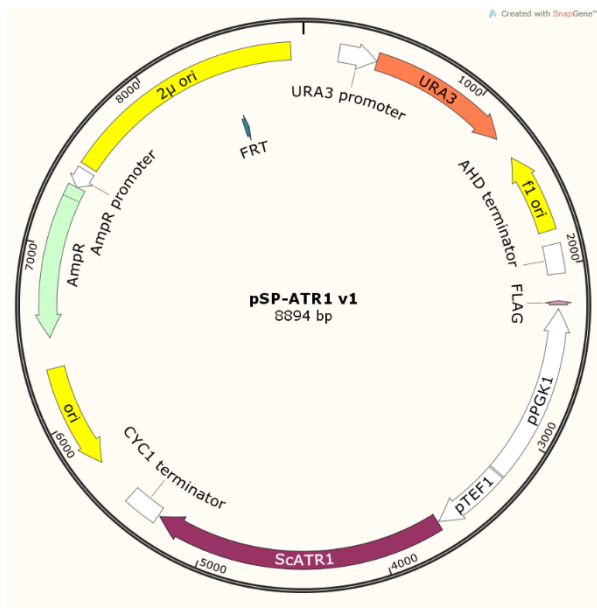
U ovom radu je korišten soj ZUPura, auksotrofni mutant ovisan o uracilu, a konstruiran je inaktivacijom svih kopija gena *URA3* u soju ZUP, metodom CRISPR-Cas9 (Žunar, usmeno priopćenje). Ishodni soj ZUP je prototrof, izoliran iz pogona Sladorana d.o.o. Županja (Šantek, usmeno priopćenje), a preliminarni rezultati molekularno genetičke analize ukazuju da je on triploid (Žunar, usmeno priopćenje).

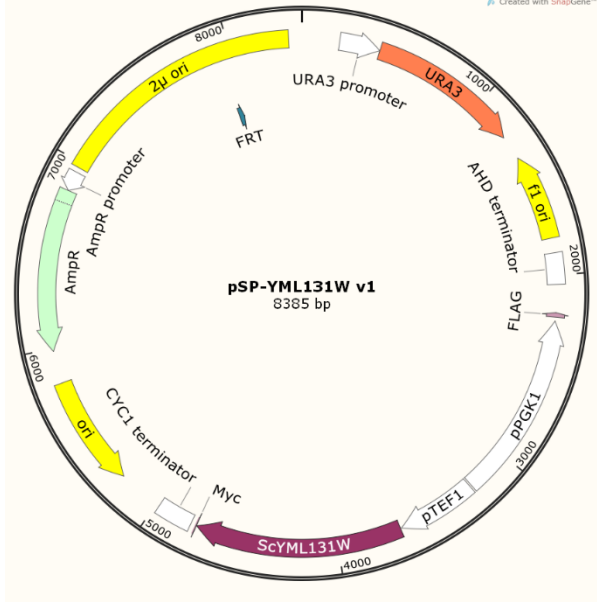
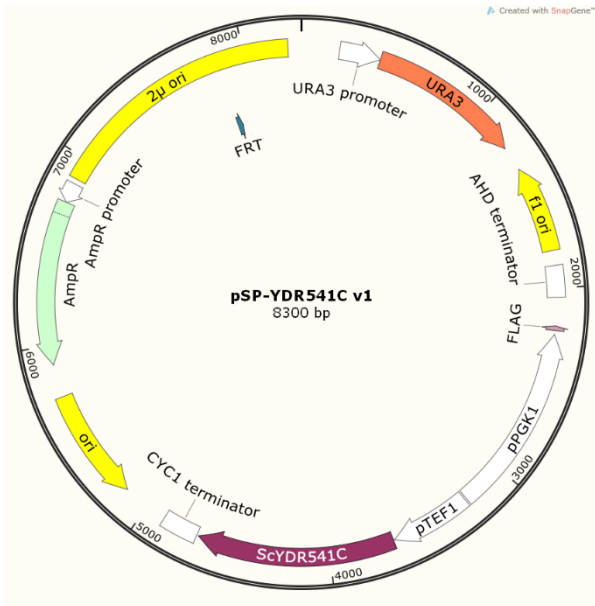
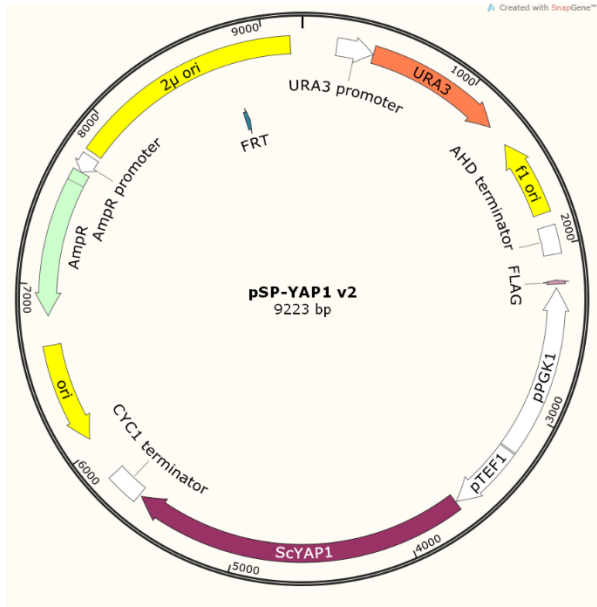
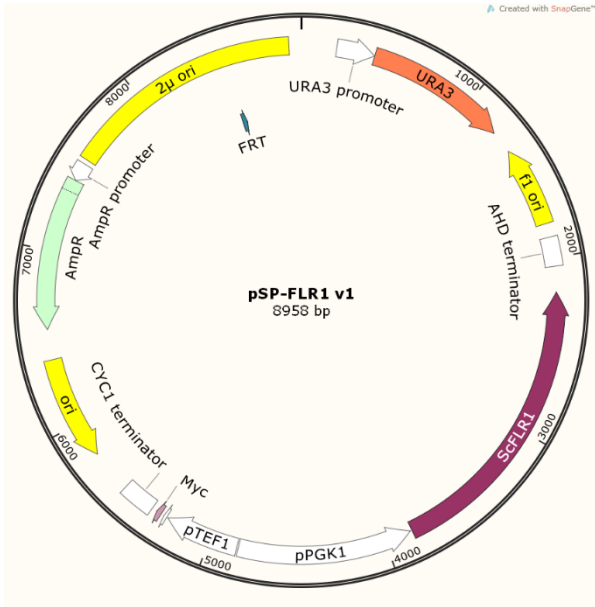
Plazmidi

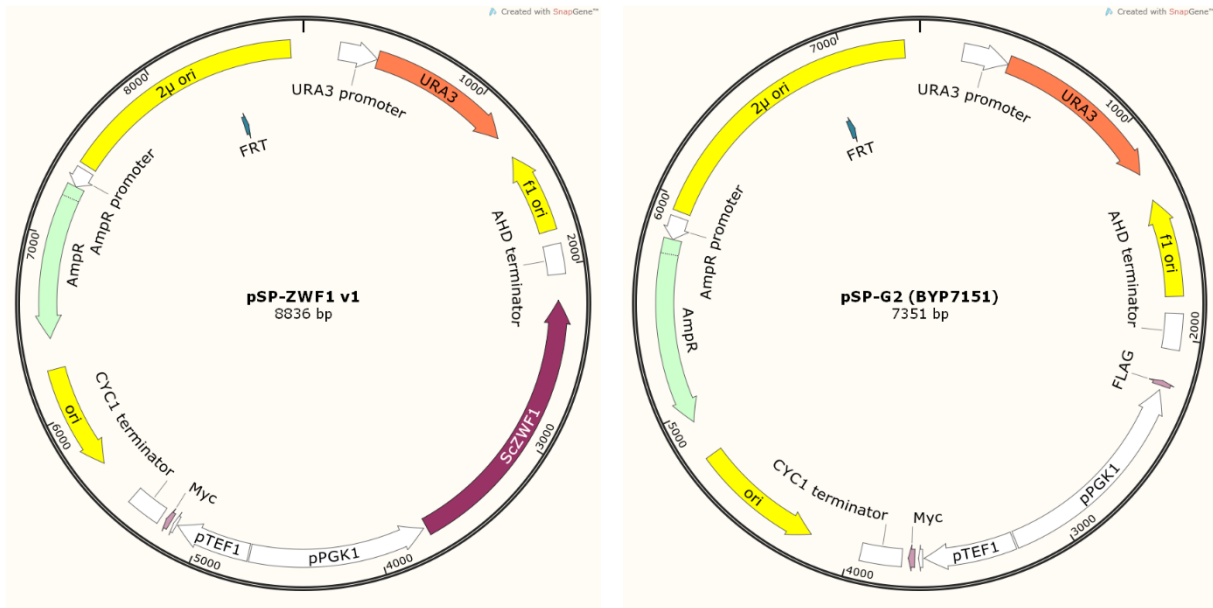
Plazmidi, čije su mape prikazane na slikama 1 i 2, su korišteni za istraživanje utjecaja pojačane ekspresije pojedinih gena na otpornost kvasca na neke inhibitore rasta. Plazmid pSP-GHS1 konstruiran je ugradnjom gena *GSH1* u plazmid pSP-G2-AC (Slika 1), a plazmid pSP-G2 je početni plazmid iz kojeg su, ugradnjom odgovarajućih gena, konstruirani ostali plazmidi prikazani na slici 2 (Štafa, žunar, usmeno priopćenje). Svi plazmidi korišteni u ovom radu (Slika 1 i 2) sadrže ishodište replikacije *ori* i gen *bla* (odgovoran za rezistenciju na antibiotik ampicilin) pa se mogu replicirati i selekcionirati u bakteriji *Escherichi coli*. Osim toga, svi plazmidi sadrže i kvašćev gen *URA3* koji omogućava selekciju kvašćevih stanica, transformanata koji sadrže ove plazmide. Plazmidi pSP-GSH1 i pSP-G2-AC (Slika 1) se u kvascu samostalno repliciraju, zahvaljujući sekvencijama *ARS* i *CEV* dok plazmidi pSP-CTA1, pSP-FLR1, pSP-YAP1, pSP-YDR541C, pSP-YML131W, pSP-ZWF1, pSP-G2 i pSP-ATR1 (Slika 2) sadrže ishodište replikacije kvašćevog plazmida 2 μ .



Slika 1. Mape plazmida pSP-G2-AC i pSP-GSH1







Slika 2. Mape plazmida pSP-G2 i njegovih derivata

Hranjive podloge

Sve hranjive podloge su sterilizirane u autoklavu kroz 20 minuta, na 121 °C te čuvane na sobnoj temperaturi. U podloge je dodano 20 gL⁻¹ agara, prije sterilizacije.

Kompletna (kompleksna) podloga (YPD)

Bacto-pepton	20 gL ⁻¹
Kvašćev ekstrakt	10 gL ⁻¹
Glukoza	20 gL ⁻¹
H ₂ O	nadopuniti do 1 L

Kemijski definirana podloga

Izvor dušika iz kvasca bez aminokiselina i amonijevog sulfata	1,7 gL ⁻¹
Amonijev sulfat	5,0 gL ⁻¹
Glukoza	20,0 gL ⁻¹
Drop out (smjesa aminokiselina, D.O.)	1,3 gL ⁻¹
H ₂ O	nadopuniti do 1 L

<u>Smjesa aminokiselina (drop-out powder; bez uracila)</u>	1,3 g
adenin (hemisulfatna sol)	2,5 g
L-arginin (HCl)	1,2 g
L-aspartatna kiselina	6,0 g
L-glutaminska kiselina	6,0 g
L-histidin	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-lizin	1,8 g
L-metionin	1,2 g
L-fenilalanin	3,0 g
L-serin	22,5 g
L-treonin	12,0 g
L-triptofan	2,4 g
L-tirozin	1,8 g
L-valin	9,0 g

Otopine za određivanje utjecaja inhibitora na rast mikroorganizma

Za određivanje utjecaja inhibitora na rast različitih sojeva kvasca, korištene su 2 M matične otopine octene i levulinske kiseline te 2-furaldehida koje su dodavane u hranjive podloge do određene koncentracije.

Metode

Određivanje preživljenja mikroorganizma na krutim podlogama s inhibitorima rasta

U ovom radu, otpornost sojeva kvasca na inhibitore rasta je određena na temelju porasta kolonija na krutim podlogama („spot metoda“). Soj kvasca se uzgoji do stacionarne faze rasta u 1,5 mL odgovarajuće tekuće hranjive podloge te se 5 µL odgovarajućeg decimalnog razrjeđenja, u obliku kapljice, nacijepi na krutu hranjivu podlogu koja sadrži inhibitor rasta.

REZULTATI I RASPRAVA

Glavni cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj pojačane ekspresije osam odabranih gena (*ATR1*, *CTA1*, *FLR1*, *GSH1*, *YAP1*, *YDR541C*, *YML131W* i *ZWF1*) na otpornost kvasca na neke inhibitore rasta, koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina u svrhu proizvodnje bioetanol. Stoga je soj kvasca ZUPura transformiran s osam plazmida koji nose odgovarajuće gene (*ATR1*, *CTA1*, *FLR1*, *GSH1*, *YAP1*, *YDR541C*, *YML131W* i *ZWF1*) i još dva kontrolna plazmida odnosno ekspresijska vektora koji ne sadrže niti jedan od istraživanih gena (pSP i pSP-G2-AC). Otpornost svih deset ovako konstruiranih sojeva kvasca na inhibitore rasta (octena i levulinska kiselina te 2-furaldehid) je određena na kompleksnoj (kompletnoj) i kemijski definiranoj hranjivoj podlozi metodom koja se naziva „spot test“.

Otpornost sojeva kvasca na inhibitore rasta

Utjecaj pojačane ekspresije pojedinih gena (*ATR1*, *CTA1*, *FLR1*, *GSH1*, *YAP1*, *YDR541C*, *YML131W* i *ZWF1*) na inhibitore rasta (octena i levulinska kiselina te 2-furaldehid) je istražen određivanjem otpornosti odabranih sojeva, odnosno transformanata soja ZUPura, odgovarajućim plazmidima koji su prikazani na slikama 1 i 2. Otpornost sojeva na inhibitore rasta je određena metodom koja se naziva „spot test“ (opisana u poglavlju *Određivanje preživljenja mikroorganizma na krutim podlogama s inhibitorima rasta*). Pri tom je netransformirani soj ZUPura uzgojen u kompletnoj kemijski definiranoj podlozi, dok su transformirani sojevi uzgojeni u kemijski definiranoj podlozi bez uracila.

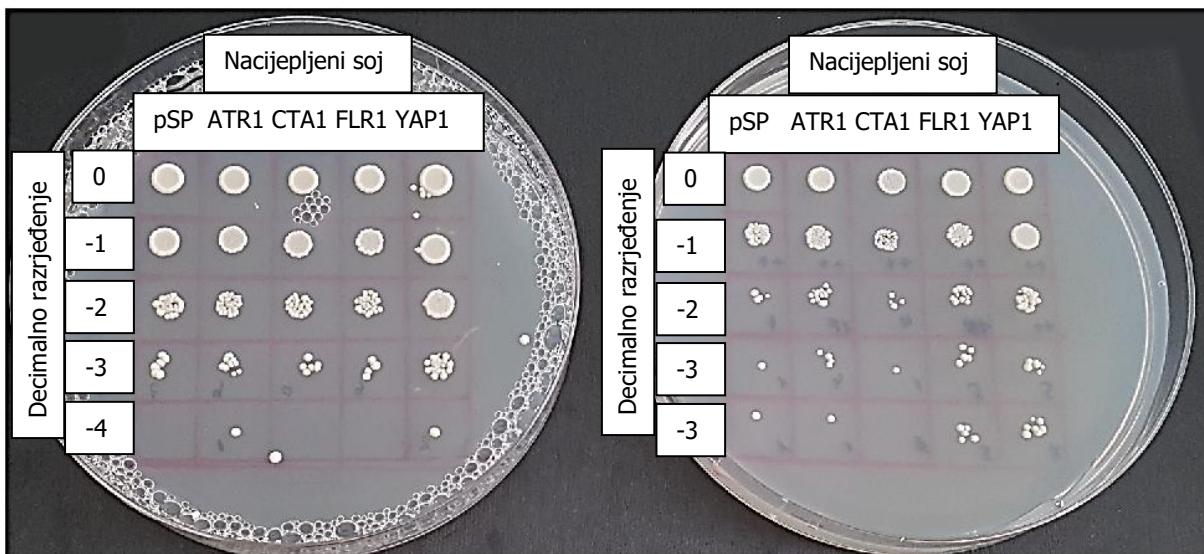
Otpornost na inhibitore rasta je određena i na kompleksnoj (kompletnoj) i na kemijski definiranoj krutoj hranjivoj podlozi. Prednost kemijski definirane podloge je u tome da na kemijski definiranoj podlozi bez uracila mogu rasti samo stanice koje sadrže plazmid (zbog gena *URA3*), čime je spriječen gubitak plazmida iz analiziranih stanica odnosno sojeva. S druge strane, stanice kvasca značajno se brže razmnožavaju na kompleksnim hranjivim podlogama, ali na njima nije moguće spriječiti gubitak plazmida.

Otpornost na octenu kiselinu

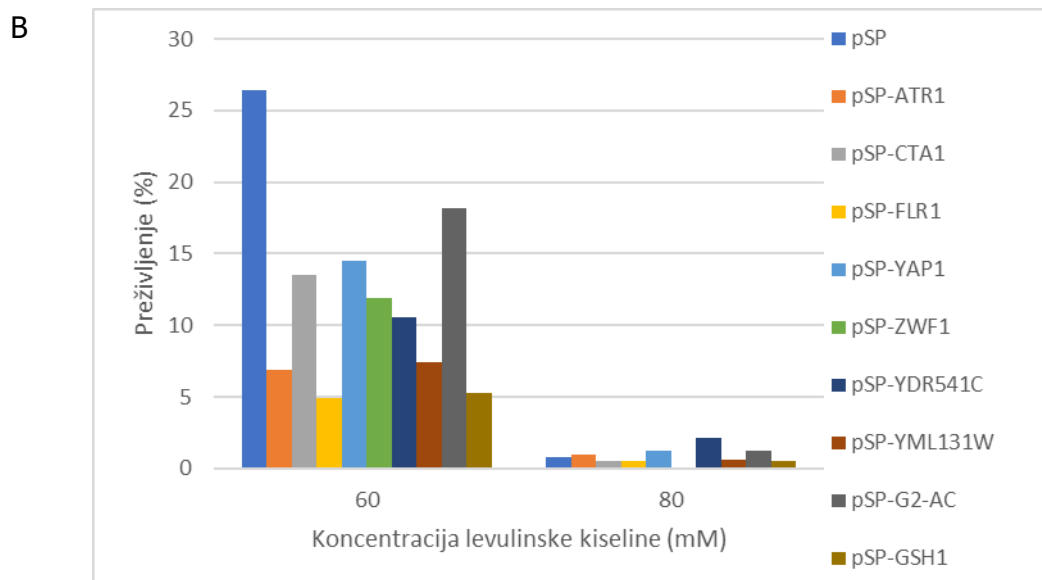
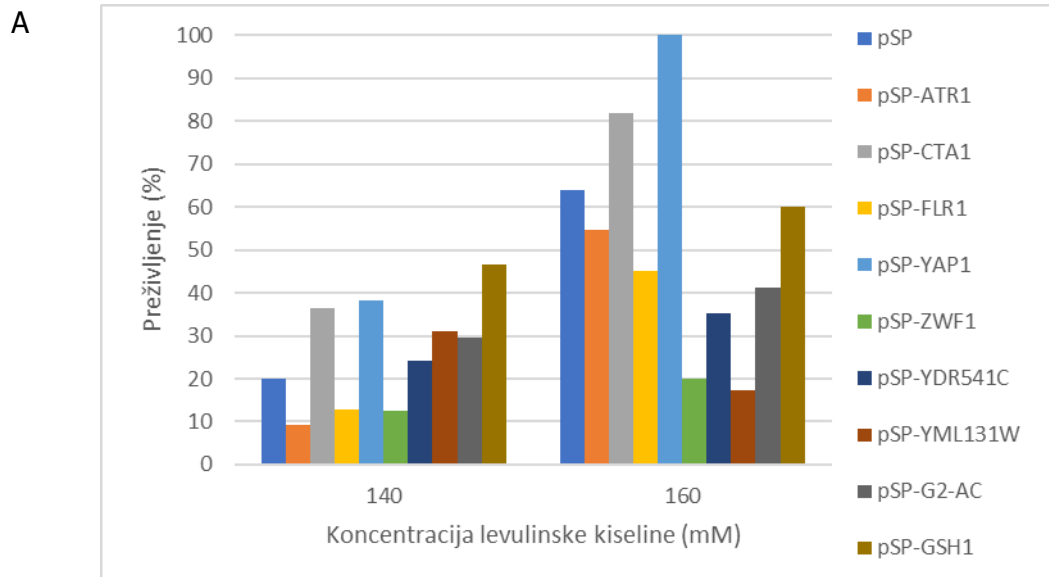
U eksperimentu određivanja otpornosti sojeva kvasca na octenu kiselinu, na krutim hranjivim podlogama nije porasla niti jedna kolonija, najvjerojatnije jer su korištene previsoke koncentracije octene kiseline (60 i 80 mM). Naime, poznato je da kvasci imaju metaboličke puteve koji im omogućavaju korištenje manjih koncentracija slabih organskih kiselina kao izvor ugljika i to ima pozitivan utjecaj na prinos etanola (Jönsson i sur., 2013). Međutim, visoke koncentracije organskih kiselina inhibiraju rast kvasaca jer prolaze kroz staničnu membranu i zakiseljavaju citoplazmu stanice (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

Otpornost na levulinsku kiselinu

Rezultat „spot testa“ za levulinsku kiselinu koncentracije 60 mM je prikazan na slici 3, a postotak preživljenja sojeva kvasca transformiranih odgovarajućim plazmidima prikazan je na slici 4.



Slika 3. Rezultat "spot testa" za levulinsku kiselinu. Prikazane su porasle kolonije na kemijski definiranoj podlozi bez uracila, u prisutnosti 60 mM levulinske kiseline. Nazivi nacijepljenih sojeva na pločama odgovaraju genima i plazmidu s pojačanom ekspresijom u soju.



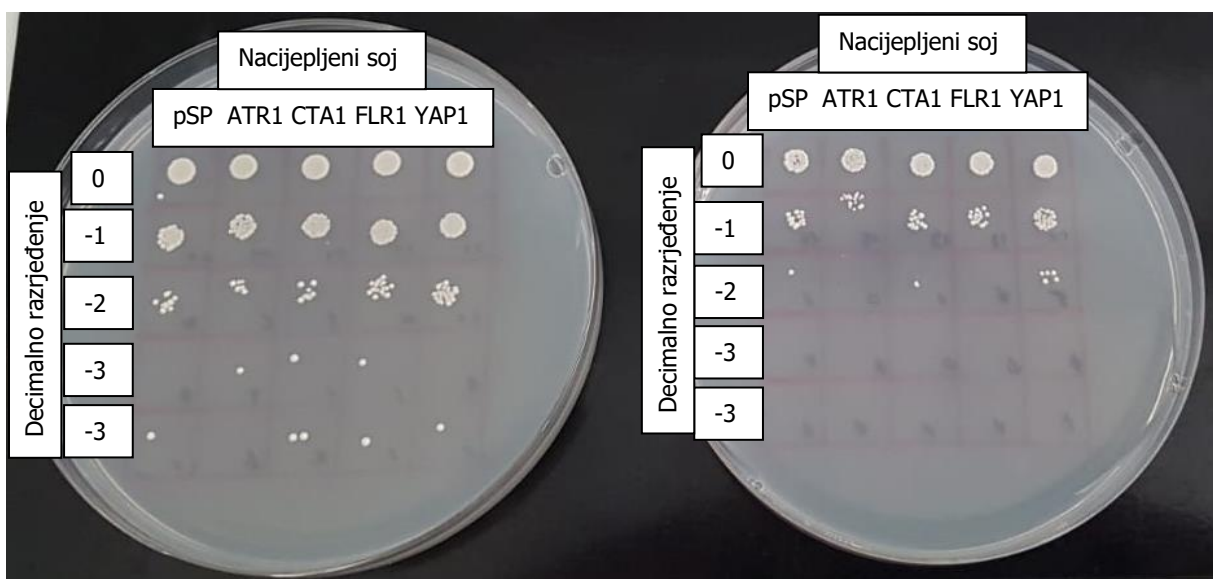
Slika 4. Otpornost sojeva kvasca na levulinsku kiselinu. Prikazan je postotak preživljenja sojeva kvasca odnosno transformanata transformiranih odgovarajućim plazmidima na levulinsku kiselinu u kompleksnoj (A) i kemijski definiranoj podlozi (B). Rezultati su prikazani u odnosu na preživljenje sojeva u odsutnosti inhibitora koje iznosi 100 %.

Iz rezultata prikazanih na slici 4 se jasno vidi kako je preživljenje sojeva kvasca veće na kompleksnoj nego na kemijski definiranoj podlozi, što može biti posljedica različite pH-vrijednosti, razlike u brzini rasta ili protektivnog djelovanja jedne ili više komponenti kompleksne hranjive podloge. S druge strane, neočekivano je da transformirani sojevi pokazuju veće relativno preživljenje pri većoj koncentraciji levulinske kiseline, ali se može

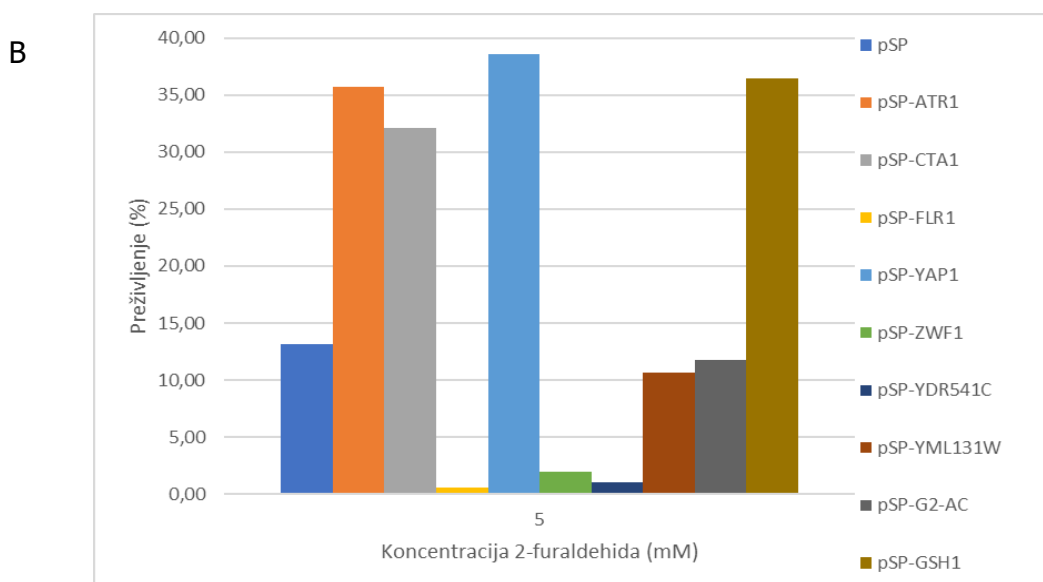
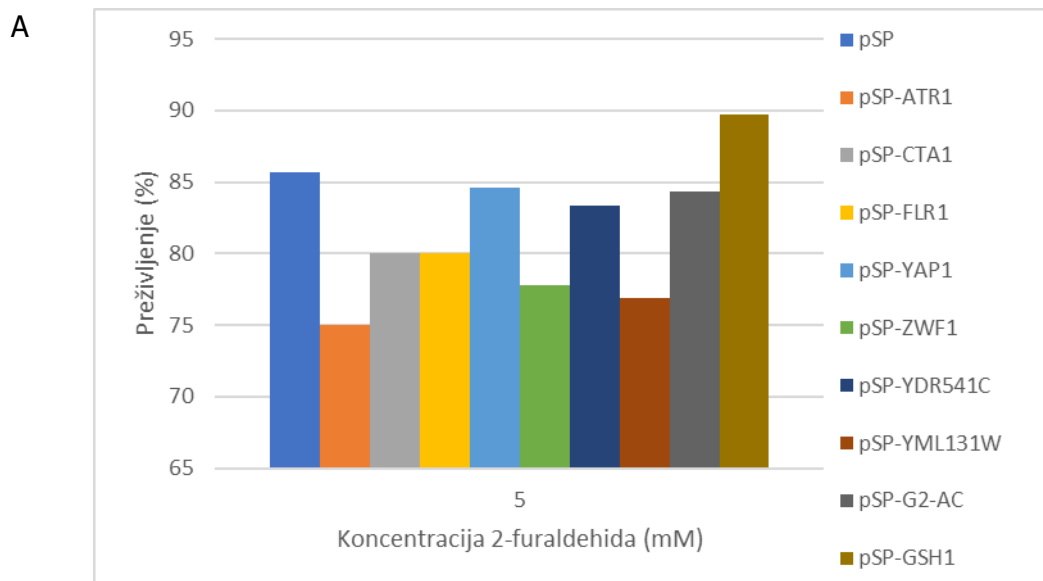
primijetiti pozitivan efekt odabranih gena. Pri tome se posebno ističe gen *YAP1*, koji u potpunosti anulira inhibitorno djelovanje 160 mM levulinske kiseline (slika 4 A). Također je neočekivano da prazni plazmidi (pSP-G2 i pSP-G2-AC) povećavaju preživljenje na inhibitoru rasta na kemijski definiranoj podlozi (Slika 4 B). Međutim, to može biti povezano s brojem kopija plazmida, koji je neophodan za preživljenje stanica na podlozi bez uracila. Naime, vrlo je vjerojatno da se prazni plazmidi uspješnije repliciraju jer su manji i nema ekspresije gena koja bi mogla interferirati s replikacijom plazmida.

Otpornost na 2-furaldehid

Rezultati „spot testa“ za 5 mM 2-furaldehid prikazani su na slici 5, a iz postotka preživljenja (slika 6) vidi se da je, kao i u slučaju levulinske kiseline (prethodno poglavlje), preživljenje na kompleksnoj podlozi značajno veće nego na kemijski definiranoj podlozi. Tako preživljenje sojeva kvasca na kompleksnoj podlozi iznosi 75 do 90 %. Na kemijski definiranoj podlozi najveće preživljenje imaju sojevi transformirani plazmidima koji nose gene *YAP1*, *GSH1*, *ATR1* i *CTA1* (od 30 do 40 %).



Slika 5. Rezultat "spot testa" za 2-furaldehid. Prikazane su porasle kolonije na kemijski definiranoj podlozi bez uracila, u prisutnosti 5 mM 2-furaldehida. Nazivi nacijepljenih sojeva na pločama odgovaraju genima i plazmidu s pojačanom ekspresijom u soju.



Slika 6. Otpornost sojeva kvasca na 2-furaldehid. Prikazan je postotak preživljenja sojeva kvasca odnosno transformanata, transformiranih odgovarajućim plazmidima na 2-furaldehid u kompleksnoj (A) i kemijski definiranoj podlozi (B). Rezultati su prikazani u odnosu na preživljenje sojeva u odsutnosti inhibitora koje iznosi 100 %.

Rezultati prethodnih istraživanja su također pokazali kompleksno djelovanje 3-furaldehida na stanice kvasca. Naime, djelovanje 2-furaldehida na stanice ovisno je o koncentraciji, gustoći stanica i uvjetima uzgoja (Palmqvist i sur., 1999), a djelovanje inhibicije se očituje se na enzimima glikolize i citratnog ciklusa, koji su uključeni u energetski metabolizam (Soccol i sur, 2001).

Ukupni rezultati ovog rada upućuju na zaključak da se djelovanje pojedinih inhibitora i pozitivan utjecaj pojedinih gena na preživljenje sojeva kvasca značajno razlikuje na kompleksnoj i kemijski definiranoj podlozi. Međutim, čini se da dva gena, *YAP1* i *CTA1*, značajno doprinose otpornosti sojeva kvasca i na levulinsku kiselinu i na 2-furaldehid, a još dva gena, *ATR1* i *GSH1*, važna su samo za otpornost na 2-furaldehid.

Također, treba primijetiti da nekonzistentnost nekih rezultata može biti posljedica greške tijekom eksperimentalnog rada, ali i mogućnosti gubitka plazmida na kompleksnoj podlozi, selektivnog pritiska na kemijski definiranoj podlozi te interferencije između ekspresije gena čiji se utjecaj istraživao i uspješnosti replikacije plazmida.

ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave, moguće je zaključiti:

1. Pojačana ekspresija gena *YAP1* i *CTA1* doprinosi otpornosti kvasca na levulinsku kiselinu i 2-furaldehid.
2. Uz gene *YAP1* i *CTA1*, na otpornost kvasca prema 2-furaldehidu pozitivno utječu i geni *ATR1* i *GSH1*.

LITERATURA

Alriksson B., Sárvári Horváth I., Jönsson, L.J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multdrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochem.* 45: 264-271.

Ask M., Mapelli V., Höck H., Olsson L., Bettiga M. (2013) Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials. *Microb. Cell. Fact.* 12: 87-96.

Dashko S., Zhou N., Compagno C., Piškur J. (2014) Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *Fems Yeast Research* 14(6): 826-832.

Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yangm L. Y., Wei P., Fengqiu C., Shihua Z., Feng Z., Yanfei M., Jian-Kang Z. (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research* **23**: 1990-2018.

Gorisch S.W., Dien B.S., Nichols N.N., Slininger P.J., Liu Z.L., Skory C.D. (2005) Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 339-349.

Herskowitz I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews.* 52(4): 536-553.

Hui-Li X., Li D., Zhi-Ping W., Hai-Yan Z., Chun-Yan H., Bing L., Xue-Chen W., Qi-Jun C. (2014) A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* **14**: 2001-2018.

Isikgor F. H., Remzi B. C. (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers, *Polymer Chemistry*, 6, 4497-4559

Jaenchen R., Diekert G., Thauer R. K. (1981) *FEBS Lett.* 130-133

- Jambo S.A., Abdulla R., Azhar S. H. M., Marbawi H., Gansau J. A., Ravindra P. (2016) A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65: 756-769
- Jiang M.F., Hu M.J., Ren H.H., Wang L. (2015) Molecular Cloning and Characterization of a New C-type Lysozyme Gene from Yak Mammary Tissue. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28(12):1774-1783.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Jönsson L. J., Martín C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199: 103-112
- Kanazawa S., Driscoll M., Struhl K. (1988) ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol. Cell. Biol.* 8(2), 664-673.
- Koopman F., Wierckx N., de Winde J.H., Ruijsenaars H.J. (2010) Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(11):4919-4924.
- Kumar R., Tabatabaei M., Karimi K., Sárvári I. H. (2016) Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol – A review. *Biofuel Research Journal*, 3(1), 347-356.
- Lee J., Gordon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040-16046
- Miyahara K., Hirata D., Miaykawa T. (2014) Functional Analysis of the Promoter of the *Saccharomyces cerevisiae* Multidrug Resistance Gene YDR1, which Encodes a Member of the ATP Binding Cassette (ABC) Superfamily, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 147-149 (1995-2018)

Noman A., Aqeel M., He S. (2016) CRISPR-Cas9: Tool for Qualitative and Quantitative Plant Genome Editing. *Frontiers in Plant Science*. 7:1740.

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Biores. Technol.* 74, 25-33.

Pileidis F. D., Titirici M.-M. (2016) Levulinic Acid Biorefineries: New Challenger for Efficient Utilization of Biomass. *ChemSusChem*, 9: 562.

Roe A., O'Byrne C., McLaggan D., Booth I. (2002) *Microbiology* 148(7): 2215-2222.

Ruriani E., Meryandini A., Sunarti T.C. (2012) Yeast isolation for bioethanol production. *Hayati J. Biosci*19: 145-149

Salari R., Salari R. (2017) Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(1):3592-3597.

Siti Hajar M. A., Rahmath A., Siti A. J., Hartinie M., Jualang A. G., Ainol Azifa M. F., Kenneth F. R. (2017) Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* **10**: 2015-2018.

Stephen D.W.S., Rivers S.L., Jamieson D.J. (1995) The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 16(3), 415-423.

Walker G.M. (2009) Yeasts. U: Desk encyclopedia of microbiology, 2. izd., (Schaechter, M., ured.) Elsevier Inc., Dundee, str. 1174-1189.

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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Leo Moguš', written over a horizontal line.

Leo Moguš