

Genetička transformacija kvasaca iz roda *Schwanniomyces*

Matanović, Angela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:166864>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Angela Matanović

1009/MB

GENETIČKA TRANSFORMACIJA
KVASACA IZ RODA
Schwanniomyces

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Svetec Miklenić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

GENETIČKA TRANSFORMACIJA KVASACA IZ RODA *Schwanniomyces*

Angela Matanović, 1009/MB

Sažetak: Zbog velikog biotehnološkog potencijala otpadne lignocelulozne biomase, intenzivno se radi na pronalasku mikroorganizama koji mogu rasti na hidrolizatu lignoceluloznih materijala i na razvoju odgovarajućih biotehnoloških procesa za proizvodnju bioetanola i različitih visokovrijednih biokemikalija. U skladu s tim, u nedavnim istraživanjima pokazano je da pojedini izolati kvasaca iz roda *Schwanniomyces*, primjerice *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, dobro rastu na kiselinskom hidrolizatu lignoceluloznog otpadnog materijala, a to ukazuje na značajan biotehnološki potencijal ovih kvasaca. Međutim, biotehnološki potencijal nekog mikroorganizma može se u cijelosti iskoristiti samo ako se on može dodatno genetički modificirati. Stoga je u ovom radu primijenjen prethodno razvijen postupak genetičke transformacije kojim su po prvi put transformirani kvasci *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *Schwanniomyces pseudopolymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* kao i prethodno uspješno transformirani kvasac *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus*. Svi navedeni kvasci uspješno su transformirani nereplikativnim fragmentima DNA, a identificirani su i replikativni plazmidi koji se u ovim vrstama mogu samostalno replicirati bez ugradnje u kvašćev genom te se mogu koristiti za konstrukciju replikativnih ekspresijskih plazmida.

Ključne riječi: genetička transformacija, *Schwanniomyces*, lignocelulozne sirovine, nekonvencionalni kvasci

Rad sadrži: 44 stranice, 8 slika, 5 tablica, 34 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
2. Doc.dr.sc. Marina Svetec Miklenić
3. Doc.dr.sc. Anamarija Štafa
4. Doc.dr.sc. Mario Novak (zamjena)

Datum obrane: 23. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical engineering
Laboratory for biology and microbial genetics
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

GENETIC TRANSFORMATION OF YEASTS OF THE GENUS *Schwanniomyces*

Angela Matanović, 1009/MB

Abstract: Due to the great biotechnological potential of lignocellulosic waste biomass, studies are intensely aimed at finding microorganisms capable of growing on hydrolysates of lignocellulosic material and developing of biotechnological processes for production of bioethanol and different high-value biochemicals. Accordingly, recent studies have shown that certain *Schwanniomyces* yeast isolates, such as *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, can grow quite good on acid hydrolysates of lignocellulosic waste material, showing significant biotechnological potential. However, biotechnological potential of some microorganism can be fully exploited only if it can additionally be genetically modified. Therefore, in this thesis, a previously developed process of genetic transformation was used and yeasts *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *Schwanniomyces pseudopolymorphus* and *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* were successfully transformed for the first time, as well as the previously successfully transformed yeast *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus*. All mentioned yeasts have been successfully transformed with non-replicative DNA fragments, and plasmids that can be replicated independently in these species, without the integration in yeast genome, have been identified and can be used to construct replicative expression plasmids.

Keywords: genetic transformation, *Schwanniomyces*, lignocellulose raw materials, non-conventional yeasts

Thesis contains: 44 pages, 8 figures, 5 tables, 34 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: assistant professor Marina Svetec Miklenić, Ph.D.

Reviewers:

1. PhD. Božidar Šantek, Full professor
2. PhD. Marina Svetec Miklenić, Assistant professor
3. PhD. Anamarija Štafa, Assistant professor
4. PhD. Mario Novak, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 23 July 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Lignocelulozna biomasa	3
2.2. Nekonvencionalni kvasci	4
2.3. Kvasci roda <i>Schwanniomyces</i>	6
2.3.1. Vrste roda <i>Schwanniomyces</i>	7
2.3.2. <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	7
2.4. Metode za transformaciju kvasaca	9
2.4.1. Transformacija protoplasta	10
2.4.2. Transformacija pomoću litijeve acetata.....	10
2.4.3. Elektroporacija	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Plazmidi.....	12
3.1.2. Oligonukleotidi.....	14
3.1.3. Mikroorganizmi.....	15
3.1.4. Hranjive podloge i otopine	15
3.1.5. Kemikalije i enzimi	20
3.2. Metode	22
3.2.1. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture.....	22
3.2.2. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture.....	22
3.2.3. Izolacija genomske DNA iz kvasca	22
3.2.4. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom	23
3.2.5. Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela.....	23
3.2.6. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima.....	23
3.2.7. Transformacija kvasaca elektroporacijom	23
3.2.8. Hibridizacija DNA po Southernu	24
3.2.9. Lančana reakcija polimerazom (PCR – Polymerase Chain Reaction).....	25
3.2.10. Filogenetska analiza kvasca <i>Schwanniomyces</i> sp. ZIM2980.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Filogenetska analiza kvasca <i>Schwanniomyces</i> sp. ZIM2980.....	27
4.2. Osjetljivost odabranih vrsta kvasaca na antibiotike	28
4.3. Provjera strukture plazmida korištenih za transformaciju	29
4.4. Transformacija kvasaca	31
4.5. Molekularna analiza metodom hibridizacije DNA po Southernu	33
4.6. Morfologija kolonija odabranih transformanata	36
4.7. Određivanje stabilnosti plazmida.....	37
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA.....	42

1. UVOD

Procjenjuje se da se na Zemlji godišnje proizvede 10 do 50 milijardi tona lignocelulozne biomase pa je upravo lignocelulozni kompleks najzastupljeniji biopolimer (Sánchez i Cardona, 2008). Stoga lignocelulozna biomasa, kao polazna industrijska sirovina, ima značajne prednosti s ekonomskog i ekološkog stanovišta. Naime, ona je jeftina polazna sirovina jer u velikim količinama zaostaje kao biljni otpad u poljoprivredi, šumarstvu i drvnoj industriji, a istovremeno je i obnovljiva sirovina pa je i ekološki prihvatljiva. Međutim, lignocelulozne sirovine se relativno rijetko koriste u industrijskoj proizvodnji jer je za to potrebno provesti energetski zahtjevnu hidrolizu biološkog materijala koja još rezultira i pojavom inhibitora rasta i fermentacije. Upravo zbog toga, intenzivno se radi na pronalasku prikladnih mikroorganizama i razvoju biotehnoloških procesa proizvodnje bioetanola i visokovrijednih kemikalija kako bi se što bolje iskoristile prednosti i premostili nedostaci primjene lignoceluloznih sirovina.

U svrhu razvoja novih biotehnoloških procesa pronalaze se, izoliraju i selekcioniraju novi sojevi i nove vrste mikroorganizama. Međutim kako bi se njihov biotehnološki potencijal u cijelosti iskoristio, neophodno je da se njihov genom može dodatno precizno modificirati metodama genetičkog inženjerstva. Prvi i neophodni korak u ovom procesu je razvoj metode za genetičku transformaciju čime se omogućava unos strane, *in vitro* modificirane ili čak sintetizirane DNA u stanicu radnog mikroorganizma. Osim toga, poželjno je na raspolaganju imati i replikativni plazmid jer to može olakšati prekomjernu ekspresiju željenog gena/proteina i povećati prinos željenih spojeva tijekom biotehnološkog procesa.

Nedavna istraživanja pokazala su da kvasac *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 ima potencijal za primjenu u biotehnologiji jer dobro raste na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Čadež i Trontel, usmeno priopćenje) te stoga postoji potreba za razvojem protokola za njegovu genetičku transformaciju. Do danas su iz roda *Schwanniomyces* uspješno transformirane samo vrste *S. occidentalis* i *S. polymorphus* var. *polymorphus*. Stoga je cilj ovog rada bilo istražiti je li prethodno razvijena metoda (Miklenić i sur., 2013; Miklenić i sur., 2015) pogodna za genetičku transformaciju ostalih vrsta kvasaca iz roda *Schwanniomyces*, kao što su *S. pseudopolymorphus* i *S. polymorphus* var. *africanus*. U ovom radu, navedeni kvasci su transformirani nereplikativnim fragmentima DNA i kružnim plazmidima s različitim ishodištima replikacije te su identificirani plazmidi koji se mogu koristiti kao polazni materijal u konstrukciji replikativnih ekspresijskih plazmida.

Zbog svega navedenog, rezultati ovog rada mogli bi doprinijeti široj primjeni kvasaca iz roda *Schwaniomyces* u različitim biotehnološkim procesima, a osobito u iskorištavanju lignocelulozne biomase.

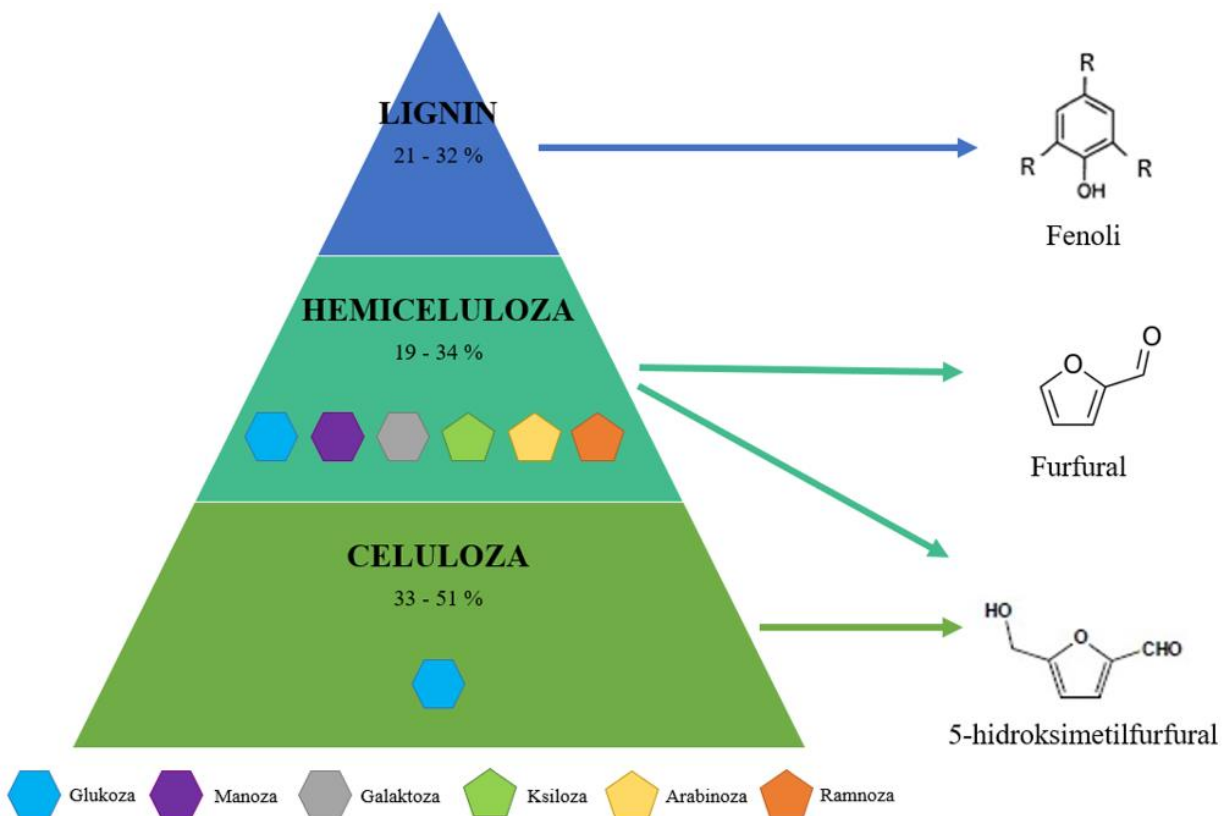
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozna biomasa je otpad biljnih sirovina, široko je dostupna i vrlo jeftina. Tri glavna polimera koja čine lignoceluloznu biomasu su celuloza, hemiceluloza i lignin, a njihov udio u biomasi varira ovisno o polaznoj biljnoj sirovini (Doğan i sur., 2014). Celuloza je polisaharid građen od jedinica glukoze povezanih β -1,4 glikozidnom vezom te čini 33-51 % lignocelulozne sirovine. Hemiceluloza čini 19-34 % lignocelulozne sirovine, a sadrži β -1,4 i β -1,3 glikozidnom vezom povezane monosaharide koji mogu biti glukoza, manoza, galaktoza, ksiloza, arabinoza i ramnoza, dok je lignin neugljikohidratni, polifenolni polimer koji biljkama daje mehaničku čvrstoću i nepropusnost te čini 21-32 % lignocelulozne biomase (slika 1). Jasno je da je struktura lignoceluloznih sirovina vrlo složena, a osim toga i vrlo čvrsta i kompaktna što je, uz strukturne karakteristike navedenih polimera, posljedica i obavijenosti lignina oko hemiceluloze i celuloze. Međutim, sastav lignoceluloznih sirovina vrlo je zanimljiv jer sadrži velik udio tvari koje mikroorganizmi mogu koristiti za rast zbog čega se sve više radi na osmišljavanju biotehnoloških procesa proizvodnje različitih kemikalija iz lignocelulozne biomase (Andlar i sur., 2018).

Kako bi mikroorganizmi mogli koristiti lignocelulozne sirovine kao izvor ugljika i energije, potrebno je polimere konvertirati u jednostavne šećere. Tim postupkom dolazi i do razgradnje lignina pri čemu se oslobađaju različiti fenolni spojevi koji vrlo često djeluju inhibitory na rast mikroorganizama. Ti spojevi uključuju eugenol, fenol, hidrokinon, katehol, vanilin te mnoge druge, i, iako se još ne zna točan mehanizam inhibicije, pretpostavlja se da je uzrok inhibicije interakcija navedenih tvari sa staničnim membranama pri čemu dolazi do gubitka funkcije membrane (Jung i Kim, 2015). Osim fenolnih spojeva, inhibitory učinak mogu imati i spojevi koji nastaju razgradnjom hemiceluloze. Poznato je da prilikom uzgoja *S. cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dolazi do inhibicije rasta kvasca zbog unutarstaničnog nakupljanja aniona slabih kiselina, npr. acetata. Acetat potječe od acetilnih skupina koje se oslobađaju hidrolizom hemiceluloze (Robak i Balcerak, 2018). Razgradnjom heksoza nastaje 5-hidroksimetil furfural koji uzrokuje nastanak mRNP nakupina i utišavanje translacije kod *S. cerevisiae* što dovodi do inhibicije rasta (Iwaki i sur., 2013). Nadalje, razgradnjom polimera lignoceluloznih sirovina, osim heksoza, nastaju i pentoze poput ksiloze (Petraović-Tominac i sur., 2017). Kvasac *S. cerevisiae* ne može prirodno koristiti ksilozu kao izvor ugljika i energije što ga dodatno čini neprikladnim za rast na lignoceluloznoj biomasi.

Osim nemogućnosti iskorištavanja ksiloze, problem čine i spojevi poput furfurala koji nastaju razgradnjom pentoza (Alriksson, 2006). Furfural na rast *S. cerevisiae* djeluje jednako kao i 5-hidroksimetil furfural, utišava translaciju te inhibira rast kvasca (Iwaki i sur., 2013). Kvasac *S. cerevisiae* je najbolje istražen kvasac, međutim zbog njegovih ograničenja neprestano se istražuju nove vrste kvasaca zanimljivih karakteristika koji bi se mogli dodatno razvijati metodama genetičkog inženjerstva. Upravo zbog potencijala lignocelulozne sirovine, intenzivno se radi na pronalasku mikroorganizama koji mogu rasti na lignocelulozi, s ciljem proizvodnje bioetanola i različitih biokemikalija iz navedene sirovine.



Slika 1. Sastav lignoceluloznog materijala i produkti hidrolize. U piramidi s lijeve strane naveden je uobičajeni sastav lignoceluloznog materijala, dok su s desne strane slike prikazani spojevi koji nastaju uslijed hidrolize lignoceluloze, a koji inhibiraju rast kvasca.

2.2. Nekonvencionalni kvasci

Kvasci *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* dva su najbolje istražena kvasca koja imaju najširu primjenu, dok se sve preostale vrste kvasaca nazivaju nekonvencionalnima (Spencer i sur., 2002). Nekonvencionalni kvasci su vrlo zanimljivi s biotehnološkog aspekta jer neki od njih imaju osobine poput halotolerantnosti, osmotolerantnosti, tolerancije na HMF i etanol, termotolerantnosti, psihrotolerantnosti, sposobnosti proizvodnje korisnih spojeva i iskorištavanja različitih izvora ugljika, odnosno specifične biokemijske puteve.

Tako su primjerice Mukherjee i sur. (2017) ispitivali tolerantnost velikog broja nekonvencionalnih kvasaca na različite stresove. Od toga su 23 kvasca pokazala značajno veću osmotolerantnost od *S. cerevisiae*, a neki od njih su *Candida bombi*, *Candida metapsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* i *Zygosaccharomyces rouxi*. Halotolerantnost je ispitivana korištenjem različitih koncentracija soli NaCl, KCl i LiCl, a rezultati pokazuju da su kvasci uglavnom različito tolerantni na različite soli što dovodi do zaključka da kod većine vrsta kvasaca ne postoji univerzalni mehanizam tolerancije za različite soli. Međutim, od ispitivanih kvasaca, tri kvasca pokazala su vrlo visoku tolerantnost na sve tri ispitivane soli, a to su *Candida metapsilosis*, *Candida parapsilosis* i *Trichomonascus ciferrii*. Od svih ispitivanih nekonvencionalnih kvasaca, samo *Zygosaccharomyces bailii* pokazuje jednaku toleranciju na etanol kao *S. cerevisiae* jer podnosi do 14 % volumnog udjela etanola.

Termotolerantnost je izuzetno poželjna u procesu proizvodnje etanola jer fermentacija pri visokoj temperaturi ima prednosti poput snižavanja troška hlađenja bioreaktora, smanjenja rizika od kontaminacije mezofilnim mikroorganizmima te povećanja stupnja konverzije šećera u etanol (Chamnipa i sur., 2018). Neki nekonvencionalni termotolerantni kvasci su *Hansenula polymorpha* i *Kluyveromyces marxianus* (Lobs i sur., 2017).

Psihrotolerantnim kvascima je maksimalna temperatura pri kojoj mogu rasti oko 20 °C (Carrasco i sur., 2016). Zbog sposobnosti rasta pri niskoj temperaturi, mogu služiti kao izvor enzima aktivnih pri niskoj temperaturi. Amilaze i celulaze su enzimi vrlo široke upotrebe, koriste se u prehrambenoj industriji, u proizvodnji detergenata, u tekstilnoj industriji i mnogim drugima, a uobičajeni zahtjev procesa u kojima se koriste jest snižavanje temperature. Carrasco i sur. (2016) ispitivali su ekstracelularnu amilaznu ili celulaznu aktivnost kvasaca izoliranih s antarktičkog područja, a rezultati su pokazali da kvasci *Rhodotorula glacialis* i *Mrakia blollopis* imaju visoku ekstracelularnu amilaznu ili celulaznu aktivnost pri temperaturi nižoj od 22 °C zbog čega su ta dva kvasca zanimljivi za primjenu u industrijskim procesima koji zahtijevaju nisku temperaturu.

Neki od nekonvencionalnih kvasaca prirodno proizvode vrlo zanimljive metabolite. *Meyerozyma guilliermondii* proizvodi riboflavin (vitamin B2), iako u manjim količinama nego plijesan *Ashbya gossypii* koja se inače koristi za industrijsku proizvodnju riboflavina (Spencer i sur., 2002). *Yarrowia lipolytica* proizvodi limunsku kiselinu i 2-ketoglutarat (Spencer i sur., 2002).

Lignocelulozni materijal zaostaje kao otpad u šumarstvu, poljoprivredi i prehrambenoj industriji te predstavlja obnovljivi izvor energije. Uzmu li se u obzir količina, cijena i sastav lignoceluloznih sirovina, jasno je da ova sirovina posjeduje veliki potencijal. Kao što je već navedeno u poglavlju 2.1., hidrolizom lignoceluloznih polimera nastaju i pentoze koje kvasci često ne mogu iskorištavati. Problem iskorištavanja pentozama može se riješiti korištenjem hibrida, korištenjem mješovitih kultura kvasaca ili genetičkim inženjerstvom (Mohd Azhar i sur., 2017). *Scheffersomyces stipitis* je zanimljiv nekonvencionalni kvasac jer ima sposobnost fermentacije ksiloze. Zbog te sposobnosti, može služiti i kao donor gena koji kodiraju za enzime potrebne za fermentaciju ksiloze pa su tako metodama genetičkog inženjerstva geni koji u *S. stipitis* kodiraju za enzime ksiloza reduktazu i ksilitol dehidrogenazu eksprimirani u *S. cerevisiae* kako bi se dobili transformanti koji imaju sposobnost iskorištavanja ksiloze (Mohd Azhar i sur., 2017). Osim pentozama, problem kod iskorištavanja lignoceluloznih sirovina su i inhibitori koji nastaju hidrolizom polimera lignoceluloze. Mukherjee i sur. (2017) ispitali su i tolerantnost različitih kvasaca na HMF koji nastaje hidrolizom heksoza, a neke od vrsta koje pokazuju višu HMF-tolerantnost nego *S. cerevisiae* su *Candida stellata*, *Pichia fermentans*, *Starmerella bacillaris* i *Zygosaccharomyces bailii*. U nedavnim istraživanjima pokazano je i da izolat kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 može vrlo dobro rasti na hidrolizatima lignocelulozne sirovine (Čadež i Trontel, usmeno priopćenje). Međutim, za razvoj i primjenu bilo kojeg kvasca, poželjno je kvasac moći genetički modificirati te moći koristiti replikativne plazmide čime se kvasci dodatno mogu poboljšavati.

2.3. Kvasci roda *Schwanniomyces*

Rod *Schwanniomyces* prvi je opisao Kloecker 1909. godine, a gotovo 70 godina kasnije otkriveno je da kvasci roda *Schwanniomyces* mogu asimilirati škrob (Ingledeew, 1987). Dotada su se kvasci koji eksprimiraju amilolitičke enzime često koristili u procesu asocijativne fermentacije za likvefakciju i saharifikaciju škroba, a tako dobivenu glukozu su ne-amilolitički kvasci poput *S. cerevisiae* prevodili u etanol (Deibel i sur., 1988). Kada je otkriveno da neki kvasci roda *Schwanniomyces* eksprimiraju enzime koji omogućavaju direktnu fermentaciju škroba u etanol, ovi kvasci su privukli pažnju brojnih znanstvenika. Međutim, otkriveno je i da ti kvasci podnose samo niske koncentracije etanola, a pokušaji njihove hibridizacije s kvascima koji su tolerantniji na etanol samo su djelomično bili uspješni zbog čega su znanstvenici zaključili da nisu u mogućnosti stvoriti soj koji bi mogao imati komercijalnu upotrebu u proizvodnji etanola (Ingledeew, 1993). No, već tada je primijećeno da kvasci roda *Schwanniomyces* imaju dobru sposobnost sekrecije velikih proteina te da bi se mogli koristiti

za heterolognu ekspresiju proteina, a o potencijalu navedenih kvasaca govori i rad iz 1987. u kojemu autor rada kvasce *Schwanniomyces* opisuje kao potencijalne "superkvasce" (Ingledeu, 1987).

2.3.1. Vrste roda *Schwanniomyces*

Rod *Schwanniomyces* pripada skupini *Saccharomycetoideae*, a vrste koje ga čine su (Suzuki i Kurtzman, 2011):

1. *Schwanniomyces capriottii*
2. *Schwanniomyces etchellsii*
3. *Schwanniomyces occidentalis*
 - a. *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*
 - b. *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*
4. *Schwanniomyces polymorphus*
 - a. *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus*
 - b. *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus*
5. *Schwanniomyces pseudopolymorphus*
6. *Schwanniomyces vanrijiae*
 - a. *Schwanniomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*
 - b. *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii*
7. *Schwanniomyces yamadae*

Nekada su rod *Schwanniomyces* činile i vrste *S. castellii*, *S. alluvius* i *S. persoonii*, međutim od 1978. su sve tri navedene vrste smještene unutar vrste *S. occidentalis*, s time da su, na temelju istraživanja homologije sekvenci, vrste *S. occidentalis*, *S. castelli* i *S. alluvius* nazvane *S. occidentalis* var. *occidentalis*, a *S. persoonii* je nazvan *S. occidentalis* var. *persoonii* (Dohmen i Hollenberg, 1996).

2.3.2. *Schwanniomyces occidentalis*

Od kvasaca iz roda *Schwanniomyces* najbolje je istražen kvasac *Schwanniomyces occidentalis*. *S. occidentalis* eksprimira velik broj ekstracelularnih enzima poput α -galaktozidaze, β -glukozidaze, inulinaze, invertaze, fitaze te dva amilolitička enzima, α -amilazu i glukoamilazu (Wang i sur., 1999). Amilolitički enzimi ovog kvasca pružaju mu mogućnost razgradnje jeftinih izvora škroba kao što su kukuruzni škrob, škrob iz krumpira te pšenice (Wang i sur., 1999). Istraživanja su pokazala da eksprimira i nepoznati enzim koji mu

omogućava rast na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina s visokim udjelom levoglukošana (Prosen i sur., 1993), a osim toga Suzuki i Kurtzman (2011) navode da može rasti na ksilozi i celobiozi što ga čini vrlo zanimljivim nekonvencionalnim kvascem s biotehnološkog aspekta.

Poznato je da su stanice kvasca *S. occidentalis* haploidne što je poželjno svojstvo prilikom provođenja genetičkih manipulacija jer je za inaktivaciju nekog gena potrebno inaktivirati samo jednu kopiju gena. Kao što je ranije navedeno, već je 80-ih godina prošlog stoljeća zaključeno da kvasci roda *Schwanniomyces* imaju dobar potencijal za proizvodnju heterolognih proteina. *S. occidentalis* ima nekoliko osobina koje idu u prilog tom zaključku. Naime, otkriveno je da može u podlogu izlučivati vrlo velike proteine (do 155 kDa), i to bez hiperglikozilacije, te da nema ekstracelularnih proteaza koje bi mogle razgraditi izlučeni protein (Deibel i sur., 1988). Postoji nekoliko radova koji govore o primjeni kvasca *S. occidentalis* kao sustava za ekspresiju heterolognih proteina. Ekspresija gena koji kodiraju za amilolitičke enzime u kvascu *S. occidentalis* je regulirana inducibilnim promotorom. Do ekspresije dolazi kada nema glukoze, a ima maltoze ili škroba. U radu autora Piontek i sur. (1998) korištene su promotorska, terminatorska i signalna sekvenca gena *GAMI* (gen koji kodira za glukoamilazu) za ekspresiju gena *celD* izoliranog iz bakterije *Clostridium thermocellum* koji kodira za termostabilnu celulazu. Na ovaj način je, na podlozi s maltozom, postignuta inducibilna ekspresija celulaze koja se izlučivala van stanice. *S. occidentalis* poslužio je i kao sustav za ekspresiju gena koji kodira za hemoglobin bakterije *Vitreoscilla* (VHb) (Suthar i Chattoo, 2006). Gen za hemoglobin bakterije *Vitreoscilla* nalazio se pod regulacijom promotora gena *AMY1* (kodira za α -amilazu), a rezultat je, na podlozi koja sadrži škrob, bio povećan rast i sekrecija proteina. Pretpostavka je da hemoglobin bakterije *Vitreoscilla* dovodi kisik do terminalne oksidaze u respiratornom sustavu što dovodi do pojačanja oksidativne fosforilacije, a to rezultira povećanim rastom i sekrecijom proteina.

Osim što je *S. occidentalis* dobar domaćin za ekspresiju heterolognih proteina, njegov proteom sadrži i neke vrlo zanimljive proteine. Neki od tih proteina su pomoću genetičkog inženjerstva eksprimirani u drugim mikroorganizmima, npr. gen *AMY1*, zajedno s odgovarajućim promotorom i terminatorom, izoliran je iz *S. occidentalis* te kloniran u *S. cerevisiae*, a rezultati su pokazali da dobiveni transformanti mogu hidrolizirati škrob (Wang i sur., 1998). Gen *GAMI* je također eksprimiran u *S. cerevisiae*, ali u ovom slučaju nije korišten promotor gena *GAMI*, nego promotori gena *GAL1*, *PDC1* i *ADHI* iz *S. cerevisiae* jer je pokazano da promotor gena *GAMI* iz *S. occidentalis* nije prepoznat u kvascu *S. cerevisiae* (Dohmen i sur., 1990).

Uzimajući u obzir prednosti kvasca *S. occidentalis* za ekspresiju heterolognih proteina, jasno je da bi navedeni kvasac mogao biti dobra zamjena za *S. cerevisiae* koji ima nedostatke poput niskog prinosa heterolognih proteina čak i s jakim promotorima, hiperglikozilacije koja može promijeniti karakteristike proteina te loše sekrecije velikih proteina (Wang i sur., 1999). Međutim, kvasac *S. cerevisiae* je najbolje istražen i zato je dobro znati sličnosti između njega i kvasca koji mu je potencijalna zamjena. Pokazano je da se vektori koji sadrže ishodište replikacije iz *S. cerevisiae* mogu koristiti za konstrukciju vektora za transformaciju *S. occidentalis*, ali je stabilnost tih vektora manja nego kod vektora koji sadrže ishodište replikacije iz *S. occidentalis*. Također, *S. occidentalis* ima vrlo dobar potencijal za razvoj sustava za kloniranje jer su navedeni vektori iz transformanata izolirani bez ikakvih promjena strukture što upućuje na to da *S. occidentalis* replicira vektore bez njihova modificiranja (Wang i sur., 1999). Vektori s ishodištem replikacije iz kvasca *S. occidentalis* replikativni su u *S. cerevisiae*, s tim da su i mitotička stabilnost i broj kopija vektora u *S. cerevisiae* jednaki mitotičkoj stabilnosti i broju kopija vektora u *S. occidentalis*. Ova saznanja upućuju na to da komponente koje su potrebne za inicijaciju replikacije DNA u *S. cerevisiae* djeluju i u *S. occidentalis* (Wang i sur., 1999).

Ostali kvasci iz roda *Schwanniomyces* su puno slabije istraženi, a dosad su samo *Schwanniomyces occidentalis* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus* genetički transformirani. Međutim, zbog karakteristika kvasaca iz roda *Schwanniomyces*, vrijedno je istražiti mogućnosti transformacije ostalih vrsta iz ovog roda te mogućnosti replikacije plazmida u njima.

2.4. Metode za transformaciju kvasaca

Transformacija je proces unošenja egzogene DNA u stanicu. Kod kvasaca egzogena DNA prilikom transformacije mora proći kroz staničnu stijenku i membranu te ući u jezgru. Nacjepeljivanje transformacijske smjese na selektivne hranjive podloge omogućava selekciju onih stanica koje su primile egzogenu DNA koja mora nositi odgovarajući selektivni marker. Kao selektivni markeri vrlo često se koriste geni koji omogućavaju rezistenciju na određene antibiotike. Neke od metoda za transformaciju kvasaca su transformacija protoplasta kvasca (stanice kvasca kojima je enzimski razgrađena stanična stijenka), transformacija pomoću litijeva acetata i elektroporacija (Gietz i Woods, 2001).

2.4.1. Transformacija protoplasta

Transformacija protoplasta uključuje enzimsku razgradnju stanične stijenke kvasca, čime se olakšava ulazak egzogene DNA u stanice, te korištenje polimera PEG (polietilen glikol) koji je nužan za vezanje DNA na stanicu (Kawai i sur., 2010). Ova metoda ne zahtijeva posebnu opremu, jeftina je i vrlo efikasna za unos velikih molekula DNA, ali zahtijeva razgradnju stanične stijenke prije transformacije te regeneraciju stijenke nakon transformacije što komplicira izvedbu. Razvojem drugih metoda, metoda transformacije protoplasta sve rjeđe se upotrebljava. Danas se uglavnom koristi za transformaciju umjetnim kvašćevim kromosomom (Gietz i Woods, 2001).

2.4.2. Transformacija pomoću litijeva acetata

Transformacija pomoću litijeva acetata koristi se za transformaciju netaknutih, cjelovitih stanica, ali se može koristiti i za transformaciju protoplasta. Ito i sur. (1983) su primijetili da neionski detergentski uzrokuju promjene na membrani kvasca te olakšavaju ulazak nukleotida u stanicu bez da utječu na vijabilnost stanica. Sličan učinak imao je tretman *E. coli* s CaCl_2 zbog čega su odlučili ispitati utjecaj različitih kationa na efikasnost transformacije kvasca. Rezultati su pokazali da je korištenjem nekih monovalentnih kationa postignuta efikasnost transformacije kvasca koja je gotovo jednaka efikasnosti koja se postiže metodom transformacije protoplasta. Najveća efikasnost postignuta je korištenjem Li^+ iona, a s vremenom je, varijacijama metode transformacije pomoću litijeva acetata, efikasnost još povećana.

Kod transformacije cjelovitih stanica metodom pomoću litijeva acetata, litijev acetat nije nužan, ali povećava efikasnost. Isti slučaj je i s toplinskim šokom koji pozitivno djeluje na efikasnost transformacije jer, kao i litijev acetat, povećava permeabilnost stanica, dok je PEG nužan za vezanje molekula DNA na stanicu (Kawai i sur., 2010).

2.4.3. Elektroporacija

Elektroporacija je metoda za transformaciju stanica koja uključuje primjenu električnog pulsa. Koristi se za transformaciju stanica biljaka, životinja, bakterija i kvasaca (Chang i sur., 1992). Specifične regije stanice privremeno se destabiliziraju izlaganjem stanice pulsu električnog polja čime stanična membrana postaje permeabilnija, a to olakšava ulazak egzogenih tvari u stanicu. Stanica postaje permeabilnija jer kratki električni puls zapravo uzrokuje nastanak pora na staničnoj membrani. Važno je napomenuti da primijenjeni kratki električni puls ne uzrokuje trajna oštećenja stanica nego su pore koje nastaju na membrani

privremene te se vrlo brzo zatvore. Elektroporacija omogućava ulazak mnogih malih molekula u stanicu (saharoza, mono- i bivalentni ioni, boje), a koristi se i za unos lijekova i molekula DNA i RNA u stanice. Prednost elektroporacije je što je vrlo efikasna, ali su početna ulaganja najveća jer je za elektroporaciju potrebno imati specijalizirani uređaj elektroporator.

Ganeva i sur. (1995) opisali su korake transformacije cjelovitih stanica kvasca kad se primjenjuje metoda elektroporacije:

- (i) Nakon dodatka molekula DNA, dolazi do njihove akumulacije na površini stanica.
- (ii) Primjena električnog polja uzrokuje prolazne promjene ovojnice kvasca (stanična stijenka, periplazmatski prostor i stanična membrana) te dolazi do ulaska molekula DNA u ovojnicu kvasca.
- (iii) Istovremeno s isključenjem električnog polja, neke molekule DNA prolaze kroz staničnu membranu i ulaze u citoplazmu, a ovojnica kvasca se vraća u nativno stanje.
- (iv) Nakon manje od 20 s završava transport DNA molekula u citoplazmu.

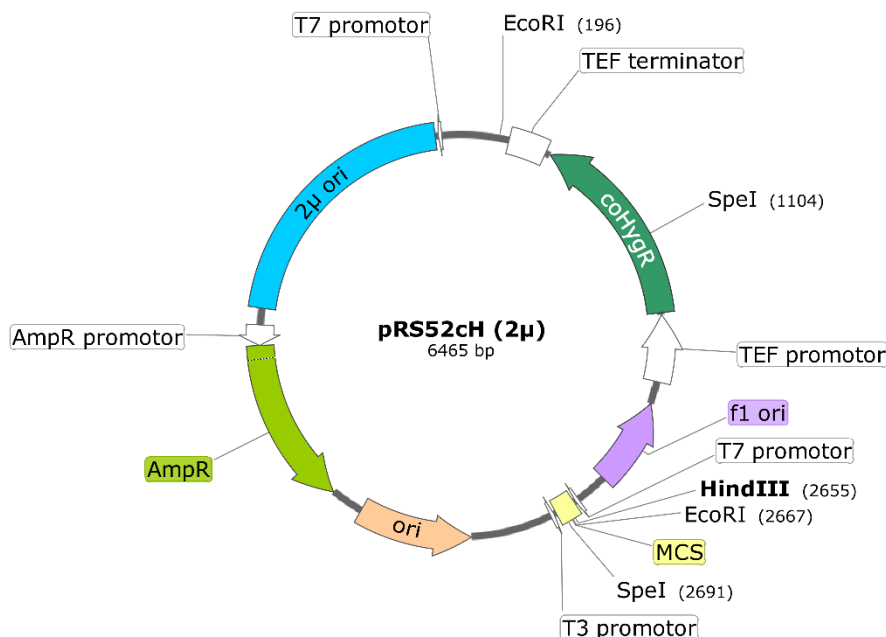
Parametri elektroporacije su jakost polja (kV cm^{-1}), kapacitet (μF) te otpor (Ω), a njihova brojčana vrijednost varira ovisno o stanicama koje se žele transformirati (Gietz i Woods, 2001).

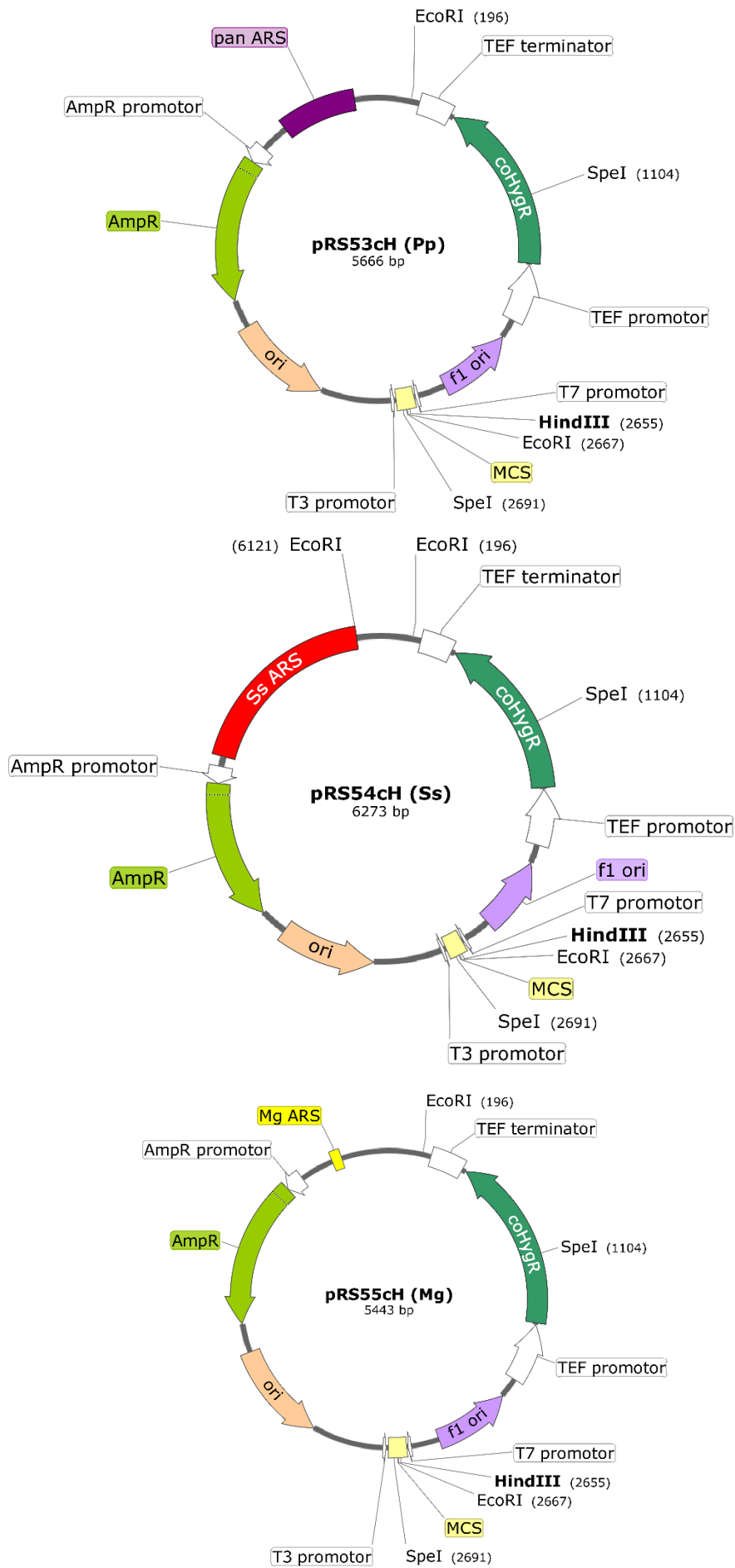
3. EKSPERIMENTALNI DIO

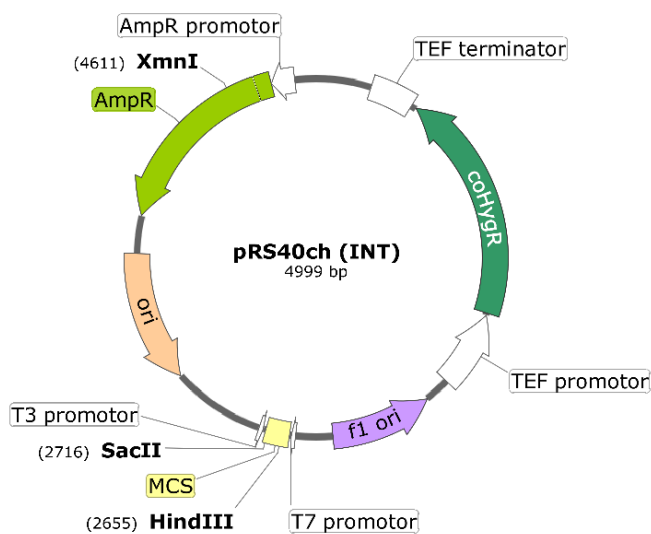
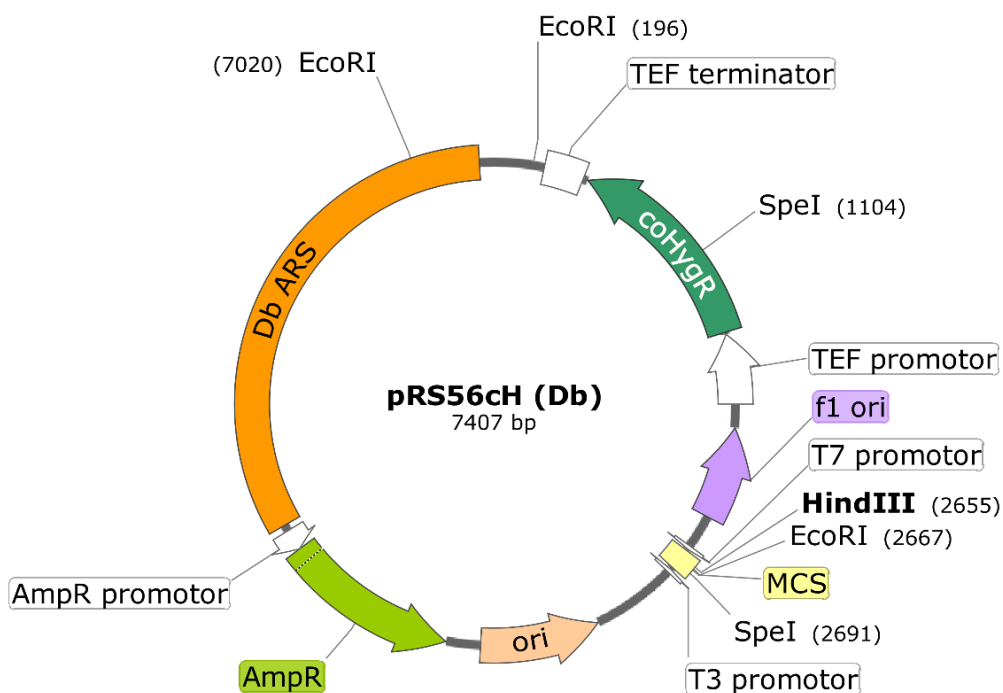
3.1. Materijali

3.1.1. Plazmidi

U ovom radu korišteno je 6 različitih plazmida. Plazmidi sadrže sekvence koje omogućavaju umnažanje i održavanje plazmida u bakteriji *Escherichia coli*, a to su bakterijsko ishodište replikacije (*ori*), gen koji kodira za enzim β -laktamazu (*bla*) koji daje rezistenciju na ampicilin te *f1 ori* koji omogućava izolaciju ovih plazmida u jednolančanom obliku. Također, svi korišteni plazmidi sadrže i gen za rezistenciju na antibiotik higromicin B (regija *coHygR*) pod TEF promotorom i terminatorom, koji omogućava selekciju transformiranih kvasaca. Prilikom konstrukcije ovih plazmida provedena je optimizacija sastava kodona gena *HygR* pri čemu su CTG tripleti koji u standardnom genetičkom kodu kodiraju za aminokiselinu leucin zamijenjeni alternativnim kodonima za ovu aminokiselinu. Naime, kod nekih vrsta kvasaca triplet CTG ne kodira za leucin nego za serin. Stoga, kako bi se ovim plazmidima mogao uspješno transformirati širi spektar nekonvencionalnih vrsta kvasaca, gen sa optimiziranim sastavom kodona je sintetiziran *de novo* i zatim kloniran (Žunar, usmeno priopćenje). Ono što je među plazmidima različito jest ishodište replikacije koje je izolirano iz različitih vrsta kvasaca. Plazmid pRS52cH (2μ) sadrži 2μ ishodište replikacije izolirano iz *Saccharomyces cerevisiae*. Plazmid pRS53cH (Pp) sadrži ishodište replikacije panARS iz *Kluyveromyces lactis*, plazmid pRS54cH (Ss) iz *Pichia stipitis* (poznat i kao *Scheffersomyces stipitis*), plazmid pRS55cH (Mg) iz *Meyerozyma guilliermondii*, a plazmid pRS56cH (Db) iz *Dekkera bruxellensis*. Plazmid pRS40cH (INT) ne sadrži niti jedno kvaščevo ishodište replikacije.







Slika 2. Mape korištenih plazmida. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.

3.1.2. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni za umnažanje regije DNA koja kodira za 26S rRNA u kvascu *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 su: NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG, $T_m=56^\circ\text{C}$ i NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG, $T_m=59^\circ\text{C}$.

3.1.3. Mikroorganizmi

U ovom radu korišten je jedan soj bakterije *Escherichia coli* i nekoliko vrsta kvasaca roda *Schwanniomyces*.

3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje dvolančanih plazmida korišten je soj *E. coli* DH5 α genotipa *F'/endA1 hsdR17(rK-, mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NalR) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)*.

3.1.2.2. Kvasci roda *Schwanniomyces*

Korištene su različite vrste kvasaca iz roda *Schwanniomyces*, a to su *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 (izolat iz mikrobiološke zbirke kvasaca Biotehničkog fakulteta u Ljubljani, točnu vrstu je potrebno pobliže odrediti, Trontel i Čadež, usmeno priopćenje), zatim *Schwanniomyces pseudopolymorphus* JCM3652^T, *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus* JCM3647^T i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* JCM7443^T. Posljednja tri soja nabavljena su iz zbirke JCM - *Japan Collection of Microorganisms*, Japan.

3.1.4. Hranjive podloge i otopine

Podloge i otopine sterilizirane su u autoklavu (20 min/121 °C) ili su pripremljene korištenjem sterilnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute podloge istog su sastava kao i tekuće, ali dodatno sadrže i 25 g L⁻¹ agara.

3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LB (Kompletna podloga)

Bacto-tripton	10 g L ⁻¹
Bacto-yeast extract	5 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹

Podloga sa ampicilinom: Ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 20 mg mL⁻¹) do konačne koncentracije od 50 μg mL⁻¹ u krutu podlogu odnosno od 100 μg mL⁻¹ u tekuću podlogu.

3.1.4.2. Kompletna hranjiva podloga za uzgoj kvasaca (YPD)

Bacto-pepton	20 g L ⁻¹
Kvaščev ekstrakt	10 g L ⁻¹

Glukoza 20 g L⁻¹

H₂O nadopuniti do 1000 mL

Za selekciju transformiranih kvasaca u kompletnu hranjivu podlogu za uzgoj kvasaca doda se određena količina antibiotika higromicina B. Koncentracija higromicina B u podlogama za selekciju kvasaca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* je 400 mg L⁻¹, a za selekciju *Schwanniomyces pseudopolymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus* 200 mg L⁻¹.

3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8 M):

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4 °C.

EDTA (0,5 M; pH 8,0):

186,1 g EDTA·2H₂O otopi se u 80 mL destilirane vode, pH se podesi dodatkom NaOH (približno 2 g peleta) i dopuni destiliranom vodom do 100 mL.

Glukoza (40 g L⁻¹):

Otopina se sterilizira na 0,5 bara nadtlaka.

GTE-pufer:

glukoza 50 mM

EDTA 10 mM

Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM

Priprema se iz sterilnih otopina neposredno prije upotrebe.

Kalijev acetat (3 M):

Korištena otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat. Priprema se na način da se u 60 mL 5 M otopine kalijeva acetata doda 11,5 mL ledene octene kiseline i 28,5 mL vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

Natrijev acetat (3 M):

24,6 g bezvodnog natrijeva acetata otopi se u destiliranoj vodi, pH se podesi dodatkom ledene octene kiseline na vrijednost 5,2. Otopina se dopuni destiliranom vodom do 100 mL, sterilizira i čuva na 4°C.

NaOH/SDS:

NaOH	0,2 mol L ⁻¹
SDS	10,0 g L ⁻¹

Otopina se ne sterilizira. Priprema se neposredno prije upotrebe.

RN-aza:

Ribonukleaza A otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM natrijevu kloridu do konačne koncentracije 10 mg mL⁻¹ te se zagrije 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se na -20 °C.

TE-pufer (pH 8,0 ili 7,4):

Tris-HCl (pH 8,0 ili 7,4)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

Priprema se iz sterilnih otopina.

Tris-HCl (1 M):

12,1 g Tris-a otopi se u 80 mL destilirane vode. Vrijednost pH podesi se dodatkom koncentrirane HCl, nakon čega se volumen otopine dopuni do 100 mL. Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti su:

pH 7,4 – 7,0 mL

pH 7,6 – 6,0 mL

pH 8,0 – 4,2 mL

SCE:

sorbitol	1,00 M
natrijev citrat	0,10 M

EDTA	0,06 M
------	--------

Otopina se ne sterilizira.

STE:

SDS	5,0 g L ⁻¹
-----	-----------------------

Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 M
-------------------	-------

EDTA (pH 8,5)	0,05 M
---------------	--------

Otopina se ne sterilizira.

Zimoliaza 20-T:

15 mg enzima zimoliaze (Zymolyase 20-T) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 g L⁻¹ i čuva na -20°C.

3.1.4.4. Otopine za gel-elektroforezu

TBE-pufer (10x):

Tris	108 g
------	-------

borna kiselina	55 g
----------------	------

EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 mL
----------------------	-------

destilirana voda	do 1000 mL
------------------	------------

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku i naknadno se razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Sterilizacija nije potrebna.

Agarozni gel:

Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze u TBE-puferu (1x), koji je pripremljen razrjeđivanjem TBE-pufera (10x). Koncentracija agaroze u gelu, ovisno o potrebi, može biti 7 – 20 g L⁻¹.

Boja za nanošenje uzorka:

brom-fenol-plavo	2,5 g L ⁻¹
------------------	-----------------------

ksilen-cijanolo	2,5 g L ⁻¹
-----------------	-----------------------

ficoll 400	250,0 g L ⁻¹
------------	-------------------------

Otopina se ne sterilizira i čuva pri 4 °C.

Etidijev bromid:

Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg mL⁻¹, ne sterilizira se i čuva na 4 °C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u 1 L destilirane vode i također čuva u tamnoj boci.

3.1.4.5. Otopine za hibridizaciju DNA

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

Amonijev acetat (1 M):

Priprema se razrjeđivanjem amonijeva acetata (8 M)

HCl (0,25 M)

NaOH (0,4 M)

NaOH/amonijev acetat:

NaOH (0,5 M)

amonijev acetat (1,0 M)

Otopina 1:

SSC (20x)	10 mL
SDS (10%)	1 mL
destilirana voda	89 mL

Otopina 2:

SSC (20x)	0,5 mL
SDS (100 g L ⁻¹)	1,0 mL
destilirana voda	98,5 mL

Otopina za prehibridizaciju:

Za 80 mL otopine:

SSC (20x)	20,0 mL
-----------	---------

smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija -

(„blocking reagent“)	0,8 g
Na-sol N-laurilosarkozina (100 g L ⁻¹)	0,8 mL
SDS (100 g L ⁻¹)	160 µL

Otopina za hibridizaciju:

Ima isti sastav kao i otopina za prehibridizaciju, ali dodatno sadrži i 20 – 50 ng obilježene DNA (DNA-probu).

Pufer 1:

Tris-HCl (0,10 M; pH 7,5)

NaCl (0,15 M)

Pufer 2:

Priprema se otapanjem smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija u puferu 1 do koncentracije od 10 g L⁻¹.

Pufer 3:

Tris (1 M; pH 9,7) 50 mL

natrijev klorid (5 M) 10 mL

magnezijev klorid (1 M) 25 mL

pH se podesi na vrijednost 9,5 dodatkom otopine HCl. Volumen otopine podesi se na 500 mL dopunjavanjem destiliranom vodom.

SSC (20x):

natrijev klorid (3,0 M)

natrijev citrat (0,3 M)

3.1.5. Kemikalije i enzimi

Agaroz: *Appligene, Strassbourg.*

Apsolutni etanol: *Kemika, Zagreb.*

DNA bakteriofaga lambda: *New England Biolabs, Beverly.*

EDTA:	<i>Kemika, Zagreb.</i>
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA:	<i>New England Biolabs, Beverly, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Amersham Biosciences, San Francisco.</i>
Etidijev bromid:	<i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.</i>
Izopropanol:	<i>Alkaloid, Skoplje.</i>
Sastojci hranjivih podloga:	<i>Difco, Detroit, Merck, Darmstadt, Sigma Chemical Co., St. Louis.</i>
Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela:	<i>New England Biolabs, Beverly.</i>
Komplet kemikalija za hibridizaciju DNA metodom po Southernu:	<i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.</i>
Ribonukleaza A:	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis.</i>
Tris: Tris Ultra Pure	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis</i>
Zimoliza (Zymolyaze 100-T i 20-T):	<i>Seikugaku Kogyo Co., Tokyo.</i>
Kemikalije za pripremu ostalih otopina:	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis, Kemika, Zagreb, Alkaloid, Skoplje.</i>

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture

Bakterijska kultura se centrifugira 1 min na $10\,000\text{ min}^{-1}$ te se tako dobiveni talog resuspendira u $120\ \mu\text{L}$ hladnog GTE pufera. Suspenziji se doda $240\ \mu\text{L}$ svježe pripremljene otopine NaOH/SDS te se promiješa okretanjem nakon čega se suspenziji doda još $360\ \mu\text{L}$ otopine NaAc (3,0 M). Suspenzija se zatim centrifugira 10 min na $10\,000\text{ min}^{-1}$ pri $4\ ^\circ\text{C}$, supernatant se otpipetira i doda mu se $390\ \mu\text{L}$ izopropanola te se promiješa okretanjem. Ovako pripremljena otopina se zatim centrifugira 1 min na $10\,000\text{ min}^{-1}$, supernatant se odlije, a talog osuši. Suhi talog se otopi u $300\ \mu\text{L}$ TE pufera u kojeg je dodan $1\ \mu\text{L}$ RN-aze. Zatim slijedi inkubacija u trajanju od 10 min pri $70\ ^\circ\text{C}$ nakon čega se otopina promiješa i ponovo inkubira na istoj temperaturi 10 min. DNA se pretaloži etanolom i amonijevim acetatom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4.

3.2.2. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture

$500\ \text{mL}$ prekonoćne bakterijske kulture centrifugira se 10 min na $4\,000\text{ min}^{-1}$ pri $4\ ^\circ\text{C}$. Supernatant se odlije, a talog se resuspendira u $10\ \text{mL}$ hladnog GTE pufera i ostavi na ledu 10 min. Nakon toga, suspenziji se doda $20\ \text{mL}$ netom pripremljene otopine NaOH/SDS, promiješa se te se ponovo inkubira na ledu 10 min, a zatim se doda $15\ \text{mL}$ 3 M NaAc i inkubira na ledu 30 min. Nakon inkubacije, suspenzija se centrifugira 30 min na $13\,000\text{ min}^{-1}$. Dobiveni supernatant se otpipetira u novu kivetu i ponovo se centrifugira 30 min na $13\,000\text{ min}^{-1}$. Zatim se supernatant ponovo otpipetira u novu kivetu, odredi mu se volumen i doda mu se 0,6 volumena izopropanola te se otopina inkubira 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, otopina se centrifugira 20 min na $15\,000\text{ min}^{-1}$, supernatant se odbaci, talog se osuši i otopi u TE puferu (pH 8), a nakon toga slijedi postupak taloženja DNA amonijevim acetatom i etanolom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4.

3.2.3. Izolacija genomske DNA iz kvasca

U ovom radu je za izolaciju kvaščeve DNA korištena metoda koju su opisali Winston i sur. (1983). Stanice kvasca uzgoje se u $4\ \text{mL}$ tekuće podloge do stacionarne faze, centrifugiraju se 5 min pri $3000\text{ okretaja min}^{-1}$, isperu se dva puta u vodi, zatim jednom u otopini SCE, a nakon toga se resuspendiraju u $180\ \mu\text{L}$ otopine SCE. U suspenziju se zatim doda $20\ \mu\text{L}$ enzima zimolijaze nakon čega se suspenzija inkubira 1 h na $37\ ^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije, doda se $800\ \mu\text{L}$ otopine STE, suspenzija se promiješa okretanjem, inkubira 20 min na $70\ ^\circ\text{C}$, ohladi se na $4\ ^\circ\text{C}$, a potom se doda $200\ \mu\text{L}$ KAc (5,0 M; pH 4,8). Ovako pripremljena otopina inkubira se u ledu

najmanje 2 sata nakon čega se centrifugira 20 min na $12\ 000\ \text{min}^{-1}$ pri $4\ ^\circ\text{C}$. Supernatantu volumena $970\ \mu\text{L}$ doda se $630\ \mu\text{L}$ izopropanola, promiješa se i opet centrifugira 20 min na $12\ 000\ \text{min}^{-1}$ pri $4\ ^\circ\text{C}$. Dobiveni talog se osuši te otopi u $300\ \mu\text{L}$ TE pufera, uz dodatak $1\ \mu\text{L}$ RN-aze, nakon čega se provede postupak taloženja DNA amonijevim acetatom i etanolom.

3.2.4. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

Određenom volumenu otopine DNA doda se $1/3$ volumena amonijeva acetata ($8,0\ \text{M}$) i $8/3$ volumena apsolutnog etanola. Ovako pripremljena otopina inkubira se 15 min pri -20°C nakon čega se centrifugira 20 min na $11000\ \text{min}^{-1}$ pri 4°C . Supernatant se odlije, a dobiveni talog se prvo osuši vakuum sisaljkom, a zatim na zraku uz plamenik. Osušeni talog se otopi u $50\ \mu\text{L}$ sterilne deionizirane vode ili TE pufera.

3.2.5. Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela

Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela provedena je prema uputama proizvođača (*New England Biolabs*, SAD) kompleta kemikalija Monarch DNA Gel Extraction Kit. Iz gela se izreže dio agaroznog gela koji sadrži željeni fragment DNA, izvaže se, otopi u 4 volumena pufera za otapanje gela te se inkubira pri $50\ ^\circ\text{C}$ i povremeno promiješa dok se gel potpuno ne otopi. Uzorak se nanese na kolonu te centrifugira 1 min na $16\ 000\ \text{g}$. Dio koji je prošao kroz kolonu se baci, a na kolonu se doda $200\ \mu\text{L}$ pufera za ispiranje DNA te se centrifugira 1 min na $16\ 000\ \text{g}$. Prethodni korak se zatim ponovi još jednom, a nakon toga se na matriks kolone doda minimalno $6\ \mu\text{L}$ pufera za eluciju DNA te se opet centrifugira 1 min na $16\ 000\ \text{g}$ čime se s kolone eluira DNA.

3.2.6. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcijski enzimi korišteni su prema uputama proizvođača (*New England Biolabs*, Beverly, *Boehringer Mannheim GmbH*, Mannheim i *GE Healthcare Biosciences*, New Jersey).

3.2.7. Transformacija kvasaca elektroporacijom

Kvasci korišteni u ovom radu transformirani su elektroporacijom prema protokolu za transformaciju *B. bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Kvasci se uzgoje do otprilike 10^7 stanica mL^{-1} , a zatim se centrifugiraju 4 min na $1\ 500\ \text{g}$ pri sobnoj temperaturi. Supernatant se pažljivo odlije, a talog se ispire dvaput u $100\ \text{mL}$ sterilne deionizirane vode centrifugiranjem na $1\ 500\ \text{g}$ u trajanju od 4 min. Nakon toga, stanice se resuspendiraju u svježe pripremljenoj otopini koja sadrži $35\ \text{mM}$ DTT i $100\ \text{mM}$ LiAc te se inkubiraju na tresilici ($80\ \text{okretaja}\ \text{min}^{-1}$) 45 min pri $28\ ^\circ\text{C}$. Suspenzija se zatim ponovo centrifugira 4 min na $1\ 500\ \text{g}$, ali pri $4\ ^\circ\text{C}$, a supernatant se

odlije. Stanice moraju biti u ledu od ovog koraka pa sve do završetka elektroporacije. Stanice se zatim ispiru s 20 mL hladne sterilne deionizirane vode te dvaput s 20 mL sorbitola (1 M). Dobiveni talog se resuspendira u hladnom sorbitolu (1 M) tako da ukupni volumen iznosi 350 μ L. Ovako pripremljena suspenzija podijeli se na 7 jednakih uzoraka. U svaki uzorak doda se 1 μ L DNA za transformaciju otopljene u deioniziranoj vodi, uzorak se promiješa te inkubira u ledu 5 min. Uzorak se prenese u prethodno ohlađene kivete za elektroporaciju te se izloži pulsu struje. Parametri elektroporacije iznose 1.8 kV i 5 ms. Odmah nakon pulsa, doda se 1 mL otopine hladnog sorbitola (1 M) i YPD podloge (1:1) te se suspenzija inkubira na sobnoj temperaturi 20 min. Zatim se suspenziji doda 1 mL YPD tekuće podloge i inkubira se 6 h na 28 °C pri 180 okretaja min^{-1} . Nakon inokulacije, uzorci se nacijepe na ploče i inkubiraju pri 28 °C 3 dana.

3.2.8. Hibridizacija DNA po Southernu

Cilj metode hibridizacije DNA po Southernu je, nakon što se izvrši prijenos fragmenata DNA s gela na membranu, detektirati fragmente komplementarne označenoj DNA-probi. DNA-probu čine molekule DNA koje sadrže dioksigeninom obilježen deoksiuridin-trifosfat (dUTP). Sama detekcija se ostvaruje enzimskom aktivnošću alkalne fosfataze fuzionirane s dUTP-antitijelom.

Metoda je provedena korištenjem kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA prema uputama proizvođača uz manje modifikacije (Štafa i sur, 2014). Količine pufera za posthibridizacijsko ispiranje i vizualizaciju, koje su navedene u radu, primjenjive su za membrane površine 100 cm^2 . Ispiranja se, osim ako je u radu navedeno drugačije, odvijaju pri sobnoj temperaturi i uz lagano protresanje.

3.2.8.1. Prijenos DNA na membranu

Nakon gel-elektroforeze, agarozni gel se inkubira 20 min u otopini HCl (0,25 M), ispiru u destiliranoj vodi i inkubira u otopini NaOH/amonijev acetat 20 min. Prijenos na membranu traje 1-2 h u uređaju za prijenos vakuumom (*GE Healthcare Biosciences*, New Jersey) uz podtlak od 15 kPa. Tijekom prijenosa na membranu, gel je uronjen u otopinu NaOH (0,4 M). Nakon prijenosa, membrana se ispiru u amonijevu acetatu (1 M) i inkubira 20 min pri 120 °C.

3.2.8.2. Predhibridizacija i hibridizacija

Inkubacijom u trajanju od 2 do 3 sata pri 68 °C i uz lagano protresanje u zataljenoj plastičnoj vrećici provodi se predhibridizacija (0,5 mL otopine za predhibridizaciju po 1 cm^2 membrane). Hibridizacija se provodi inkubacijom u otopini za hibridizaciju u trajanju od 18 h,

a koriste se isti uvjeti kao i u postupku predhibridizacije. Volumen ove otopine iznosi 10 – 20 % korištenog volumena otopine za predhibridizaciju.

3.2.8.3. Posthibridizacijsko ispiranje

Membrana se, nakon hibridizacije, ispire dva puta s po 50 mL otopine A u trajanju od 10 min, a zatim još dva puta s po 25 mL otopine B u trajanju od 15 min pri temperaturi od 68 °C.

3.2.8.4. Detekcija

U postupku detekcije provodi se više ispiranja, a to su redom: kratko u 100 mL pufera 1, 1 h u 100 mL pufera 2, 30 min u zataljenoj plastičnoj vrećici sa 20 mL pufera 2 (pufer 2 sadržava 4 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze), dva puta po 15 min u 100 mL pufera 1 i kratko u puferu 3. Nakon ovih ispiranja, membrana se zatali u plastičnu vrećicu s 10 mL pufera 3 uz dodatak 35 µL X-fosfata (5-brom-4-klor-indolil-fosfat) i 45 µL NBT-a (nitrozo-plavi-tetrazolij) te se inkubira u mraku pri temperaturi od 37 °C do pojave tamno obojenih vrpca. Reakcija se zaustavlja ispiranjem membrane u destiliranoj vodi i zatim se membrana osuši na zraku.

3.2.9. Lančana reakcija polimerazom (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Lančana reakcija polimerazom korištena je za umnažanje dijela DNA kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 koji kodira za 26S rRNA. Za PCR je korištena polimeraza Q5 prema uputama proizvođača *New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA*. Uvjeti provođenja PCR-a prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti provođenja PCR-a

Polimeraza	NEB Q5
Početna denaturacija kalupa i aktivacija polimeraze Q5	98 °C, 120 s
Denaturacija kalupa DNA	98 °C, 10 s
Sparivanje početnica s kalupom	58 °C, 30 s
Sinteza DNA (72 °C)	72 °C, 90 s
Završna sinteza	72 °C, 120 s

3.2.10. Filogenetska analiza kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980

Lančanom reakcijom polimeraze umnožen je dio genoma kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 koji kodira za 26S rRNA. Dobiveni produkt je sekvencioniran te je kreirano

filogenetsko stablo u programu MEGA-X korištenjem metode najveće vjerojatnosti te Kimura 2-parametarskog modela. Prilikom kreiranja filogenetskog stabla, u obzir su uzete i sekvence koje kodiraju za 26S rRNA kvasaca iz roda *Schwanniomyces* te kvasca *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

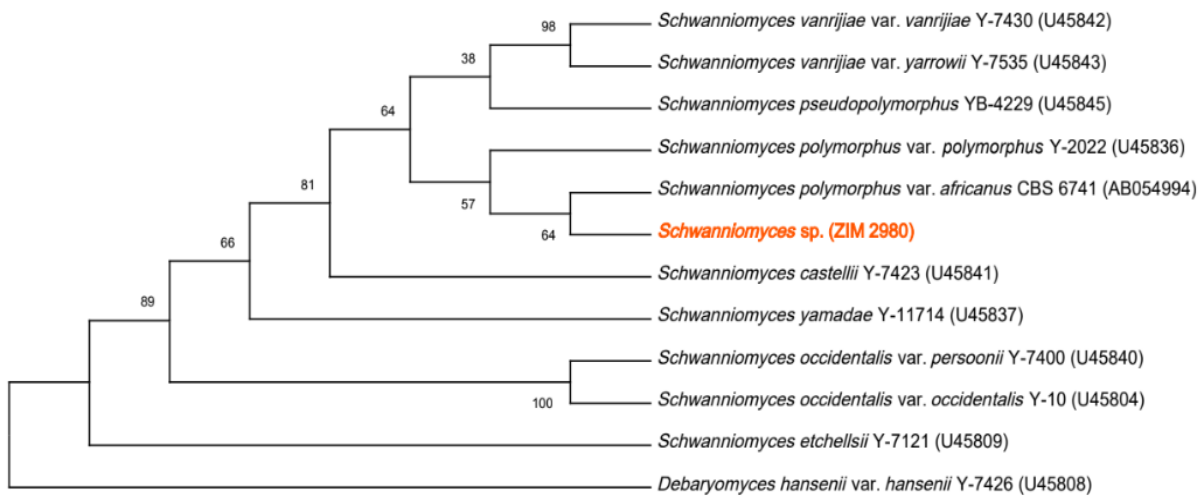
U ovom radu pokazano je da je metoda, prethodno razvijena za genetičku transformaciju kvasca *Dekkera bruxellensis* (Miklenić i sur., 2013; Miklenić i sur., 2015), pogodna i za transformaciju kvasaca iz roda *Schwanniomyces*. Naime, u ovom su radu, osim izolata kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 (Čadež i Trontel, usmeno priopćenje), uspješno transformirani i kvasci *Schwanniomyces pseudopolymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus*, za koje u literaturi ne postoji podatak da su do sada bili genetički transformirani. U svrhu ostvarenja ovih ciljeva bilo je potrebno provesti odgovarajuću karakterizaciju navedenih kvasaca. Tako je provedena filogenetska analiza kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 (poglavlje 4.1.), a za sve navedene kvasce određena je koncentracija odabranih antibiotika koja bi mogla biti pogodna za selekcioniranje transformanata (poglavlje 4.2.). Struktura svih plazmida koji su korišteni za transformaciju kvasaca provjerena je restrikcijom analizom (poglavlje 4.3.), kvasci su transformirani modificiranom metodom elektroporacije (poglavlje 4.4.), a uspješnost transformacije provjerena je molekularnom analizom transformanata, metodom hibridizacije DNA po Southernu (poglavlje 4.5.). Osim toga, proučavana je i morfologija kolonija odabranih transformanata (poglavlje 4.6.) te je određena stabilnost nasljeđivanja kružnih plazmida, s različitim ishodištima replikacije, na selektivnim i neselektivnim podlogama (poglavlje 4.7.), čime su identificirani oni plazmidi koji bi se mogli koristiti za konstrukciju replikativnih ekspresijskih vektora.

4.1. Filogenetska analiza kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980

U ranijim istraživanjima pokazano je da izolat kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 izuzetno dobro raste na lignoceluloznim hidrolizatima te stoga pokazuje značajan biotehnološki potencijal (Čadež i Trontel, usmeno priopćenje). Kako bi se поблиže odredilo o kojoj vrsti iz roda *Schwanniomyces* se radi, provedena je filogenetska analiza.

U filogenetskim istraživanjima često se koriste geni za rRNA jer su pojedine sekvence unutar tih gena vrlo konzervirane, a druge su veoma varijabilne, što olakšava istraživanja evolucijske povijesti. Lančanom reakcijom polimeraze umnožen je dio genoma kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 koji kodira za 26S rRNA. Nastali produkt je sekvencioniran te je kreirano filogenetsko stablo u programu MEGA-X korištenjem metode najveće vjerojatnosti te Kimura 2-parametarskog modela. Prilikom kreiranja filogenetskog stabla, u obzir su uzete i

sekvence koje kodiraju za 26S rRNA kvasaca iz roda *Schwanniomyces* te kvasca *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. Na slici 3 prikazano je stablo s najvećim logaritmom vjerojatnosti.



Slika 3. Rezultat filogenetske analize kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 na temelju sekvence 26S rDNA. Postotak stabala kod kojih su pridruženi taksonomi grupirani zajedno naveden je uz grane.

Dobiveno filogenetsko stablo pokazuje da je, od analiziranih kvasaca, kvasac *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 evolucijski najbliži kvascu *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus*. Međutim, dobiveno filogenetsko stablo ne potvrđuje sa sigurnošću da se radi o kvascu *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* zato što je ta povezanost prisutna tek u 64 % generiranih stabala. Stoga je potrebno sekvencionirati i analizirati dodatne regije u genomu kako bi se postigla zadovoljavajuća sigurnost u ove rezultate.

4.2. Osjetljivost odabranih vrsta kvasaca na antibiotike

Kako bi se transformanti (stanice koje su primile egzogenu DNA) mogli selekcionirati na podlogama s antibiotikom, potrebno je ispitati osjetljivost odabranih kvasaca na antibiotike. U ovom radu ispitana je osjetljivost kvasaca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *Schwanniomyces pseudopolymorphus*, *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus* na različite koncentracije antibiotika geneticina (G418), higromicina B i nurseotricina u tekućoj i na krutoj podlozi te kvasca *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* na različite koncentracije antibiotika higromicina B u tekućoj i na krutoj podlozi. Koncentracije antibiotika koje su korištene u ovom eksperimentu u tekućim podlogama su za geneticin 200 i 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, za higromicin B 200, 400 i 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a za nurseotricin 50 i 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kod krutih podloga, ispitivane koncentracije bile su 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ geneticina, 200 i 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ higromicina B te 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nurseotricina. Koncentracija antibiotika koja za pojedini kvasac onemogućava rast u tekućoj ili na krutoj kompleksnoj hranjivoj podlozi prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati ispitivanja osjetljivosti kvasaca na antibiotike u tekućoj i na krutoj podlozi

ANTIBIOTIK	PODLOGA	KONCENTRACIJA ANTIBIOTIKA KOJA ONEMOGUĆAVA RAST KVASCA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		<i>Schwanniomyces</i> sp. ZIM2980	<i>S. pseudopolymorphus</i>	<i>S. polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i>	<i>S. polymorphus</i> var. <i>africanus</i>
Geneticin	Tekuća	> 800	> 800	> 800	Nije određeno
	Kruta	> 800	800	Nije određeno	Nije određeno
Higromicin B	Tekuća	200	600	600	400
	Kruta	400	200	200	400
Nurseotricin	Tekuća	50	50	50	Nije određeno
	Kruta	100	100	Nije određeno	Nije određeno

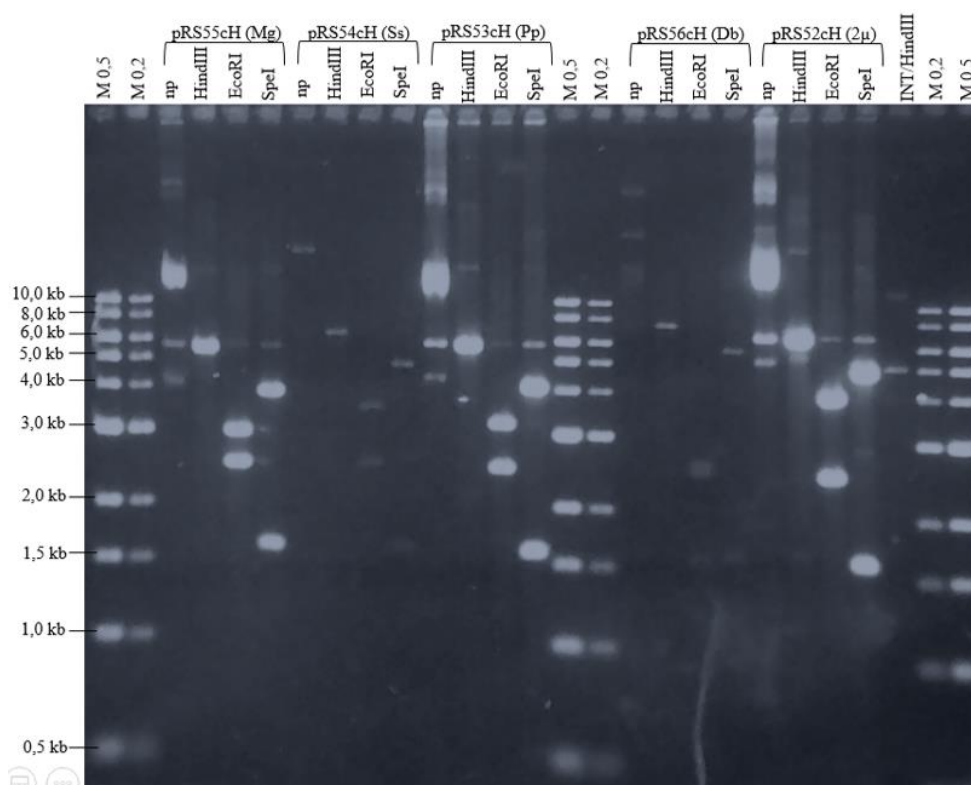
Geneticin ne inhibira rast kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 ni pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, dok higromicin B i nurseotricin pri navedenim koncentracijama djeluju inhibitorno na rast svih odabranih kvasaca. Zbog niže cijene, za daljnji rad odabran je higromicin B, a koncentracije higromicina B koje su korištene za selekciju transformanata prikazane su u tablici 2.

4.3. Provjera strukture plazmida korištenih za transformaciju

Za transformaciju kvasaca u ovom radu korišten je plazmid pRS52cH (2 μ) koji sadrži ishodište replikacije iz *S. cerevisiae*, pRS56cH (Db) s ishodištem replikacije iz *D. bruxellensis*, pRS54cH (Ss) s ishodištem replikacije iz *S. stipitis*, pRS53cH (Pp) s ishodištem replikacije iz *K. lactis*, pRS55cH (Mg) s ishodištem replikacije iz *M. guilliermondii* te plazmid pRS40cH (INT) koji ne sadrži kvaščevo ishodište replikacije. Ovi plazmidi detaljno su opisani u poglavlju 3.1.1, a njihove restriksijske mape sa svim relevantnim regijama i restriksijskim mjestima prikazana su na slici 2. Navedeni plazmidi su izolirani iz bakterije *E. coli* te je njihova struktura provjerena restriksijskom analizom odgovarajućim restriksijskim enzimima (HindIII, EcoRI, SpeI). Endonukleaza HindIII sve korištene plazmide cijepa na samo jednom mjestu i stoga omogućava lineariziranje plazmida te olakšava određivanje njihove veličine i procjenu mase transformirajuće DNA, dok endonukleaze EcoRI i SpeI cijepaju korištene plazmide na dva mjesta, osim plazmida pRS54cH (Ss) i pRS56cH (Db) koji sadrže tri restriksijska mjesta koje prepoznaje EcoRI. Očekivane veličine vrpce nakon cijepanja plazmida odgovarajućim restriksijskim enzimima navedene su u tablici 3. Na slici 4 mogu se vidjeti rezultati elektroforeze nepocijepanih plazmida i plazmida pocijepanih odgovarajućim endonukleazama.

Tablica 3. Očekivane veličine vrpci nakon cijepanja plazmida odgovarajućim restrikcijskim enzimima

PLAZMID	OČEKIVANA VELIČINA VRPCI (pb)		
	HindIII	EcoRI	SpeI
pRS55cH (Mg)	5443	2972, 2471	3856, 1587
pRS54cH (Ss)	6273	3454, 2471, 348	4686, 1587
pRS53cH (Pp)	5666	3195, 2471	4079, 1587
pRS56cH (Db)	7407	4353, 2471, 583	5820, 1587
pRS52cH (2μ)	6465	3994, 2471	4878, 1587
pRS40cH (INT)	4999	/	/

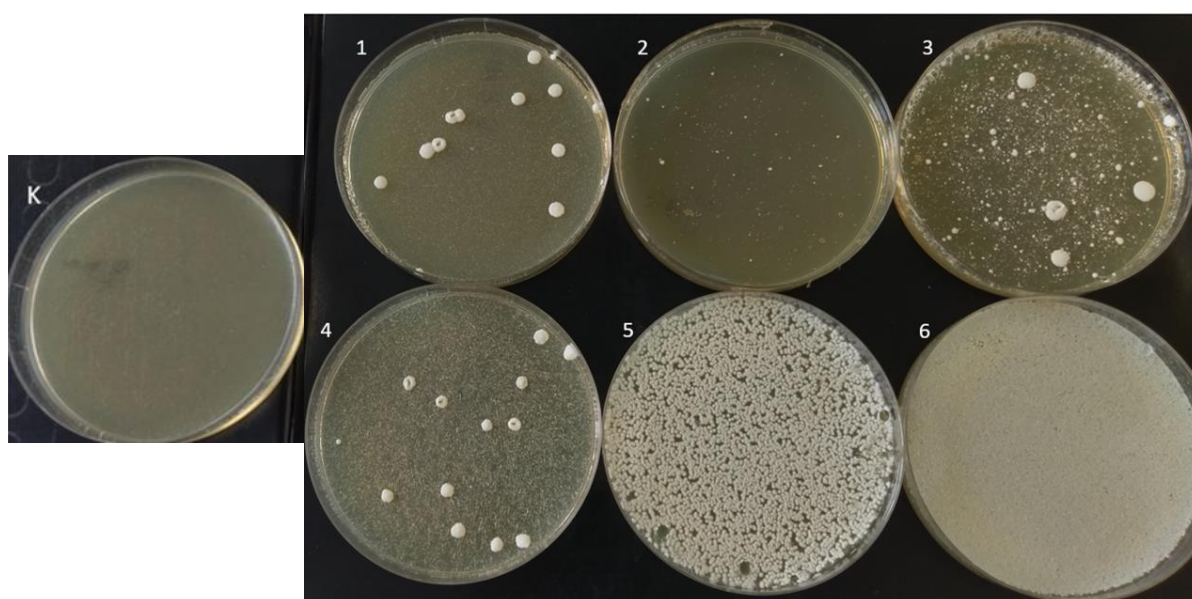


Slika 4. Restrikcijska analiza plazmidne DNA. M 0,5 – 0,25 μg standarda za gel-elektroforezu (1kb standard tvrtke NEB); M 0,2 – 0,1 μg standarda za gel-elektroforezu (1kb standard tvrtke NEB); np – nepocijepana plazmidna DNA; HindIII – plazmidna DNA pocijepana s restrikcijskim enzimom HindIII; EcoRI – plazmidna DNA pocijepana s restrikcijskim enzimom EcoRI; SpeI – plazmidna DNA pocijepana s restrikcijskim enzimom SpeI; INT – nereplikativni plazmid pRS40cH (INT) pocijepana s endonukleazom HindIII.

Vrpce dobivene digestijom s restriksijskim enzimom HindIII odgovaraju očekivanim vrpčama, odnosno veličinama plazmida koje su navedene u tablici 3, međutim kod nekih plazmida se mogu vidjeti i vrpce slabog intenziteta koje odgovaraju nepocijepanim plazmidima. Vrpce dobivene digestijom s restriksijskim enzimima EcoRI i SpeI također odgovaraju očekivanim vrpčama. Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti da je restriksijskom analizom potvrđena struktura plazmida prikazanih u poglavlju 3.1.1.

4.4. Transformacija kvasaca

Kvasci *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *Schwanniomyces pseudopolymorphus*, *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* transformirani su prema protokolu za transformaciju kvasca *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* metodom elektroporacije (Miklenić i sur., 2015). Stanice kvasaca transformirane su nereplikativnim plazmidom pRS40cH (INT) koji je prethodno bio lineariziran pomoću restriksijske endonukleaze SacII te kružnim plazmidima pRS52cH (2 μ), pRS56cH (Db), pRS54cH (Ss), pRS53cH (Pp) i pRS55cH (Mg) kako bi se provjerilo mogu li se ovi plazmidi replicirati i održavati u kružnom obliku u genomu transformiranih kvasaca. Prilikom transformacije kontrole umjesto plazmidne DNA korišten je jednak volumen destilirane vode. Tipičan rezultat transformacija na primjeru kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 prikazan je na slici 5, a dobiveni brojevi transformanata i postignute efikasnosti transformacije navedene su u tablici 4. Transformacija kvasaca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 i *S. pseudopolymorphus* provedena je dva puta, a broj dobivenih transformanata i postignute efikasnosti su u tablici 4 odvojeni točkom sa zarezom.



Slika 5. Transformanti *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 porasli na selektivnim podlogama sa higromicinom B. K – negativna kontrola; 1 – transformanti koji sadrže plazmid pRS40cH (INT); 2 –

transformanti koji sadrže plazmid pRS56cH (Db); 3 – transformanti koji sadrže plazmid pRS53cH (Pp); 4 – transformanti koji sadrže plazmid pRS52cH (2 μ); 5 – transformanti koji sadrže plazmid pRS54cH (Ss); 6 – transformanti koji sadrže plazmid pRS55cH (Mg).

Tablica 4. Rezultati transformacije kvasaca metodom elektroporacije

PLAZMID	VRSTA				VRSTA			
	<i>Schwanniomyces</i> sp. ZIM2980	<i>S. pseudopolymorphus</i>	<i>S. polymorphus</i> var. <i>africanus</i>	<i>S. polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i>	<i>Schwanniomyces</i> sp. ZIM2980	<i>S. pseudopolymorphus</i>	<i>S. polymorphus</i> var. <i>africanus</i>	<i>S. polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i>
	BROJ DOBIVENIH TRANSFORMANATA				EFIKASNOST TRANSFORMACIJE (broj transformanata μg^{-1} DNA)			
KONTROLA	0	3;0	0	0	0	0	0	0
pRS40cH (INT)	47;7	34;1	4	2	1,12x10 ⁴ ;1,67x10 ³	8,10x10 ³ ;238	952	476
pRS52cH (2 μ)	110;24	53;4	45	11	880;192	424;32	360	88
pRS56cH (Db)	2;0	3;0	2	0	714;0	1,10x10 ³ ;0	714	0
pRS54cH (Ss)	>1000	786;72	619	454	>5,95x10 ⁵	4,68x10 ⁵ ;4,29x10 ⁴	3,68x10 ⁵	2,70x10 ⁵
pRS53cH (Pp)	52;24	2	11	14	555;256	21	117	149
pRS55cH (Mg)	>1000	2;6	>1000	>1000	>1,60x10 ⁴	32/96	>1,60x10 ⁴	>1,60x10 ⁴

Kao što je vidljivo iz slike 5 i tablice 4, postupak razvijen za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* može se koristiti i za transformaciju odabranih vrsta iz roda *Schwanniomyces*. Pritom je ovo za kvasce *Schwanniomyces pseudopolymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* prva poznata uspješna transformacija stranom DNA.

Transformanti su dobiveni i lineariziranim integrativnim plazmidom i plazmidima pRS55cH (Mg), pRS54cH (Ss), pRS53cH (Pp), pRS56cH (Db), pRS52cH (2 μ) u kružnom obliku. Obzirom na postignute efikasnosti transformacije i dobivene brojeve kolonija prilikom transformacije s plazmidom pRS55cH (Mg) koji nosi ishodište replikacije iz *M. guilliermondii*, može se pretpostaviti da se on u stanicama kvasaca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980,

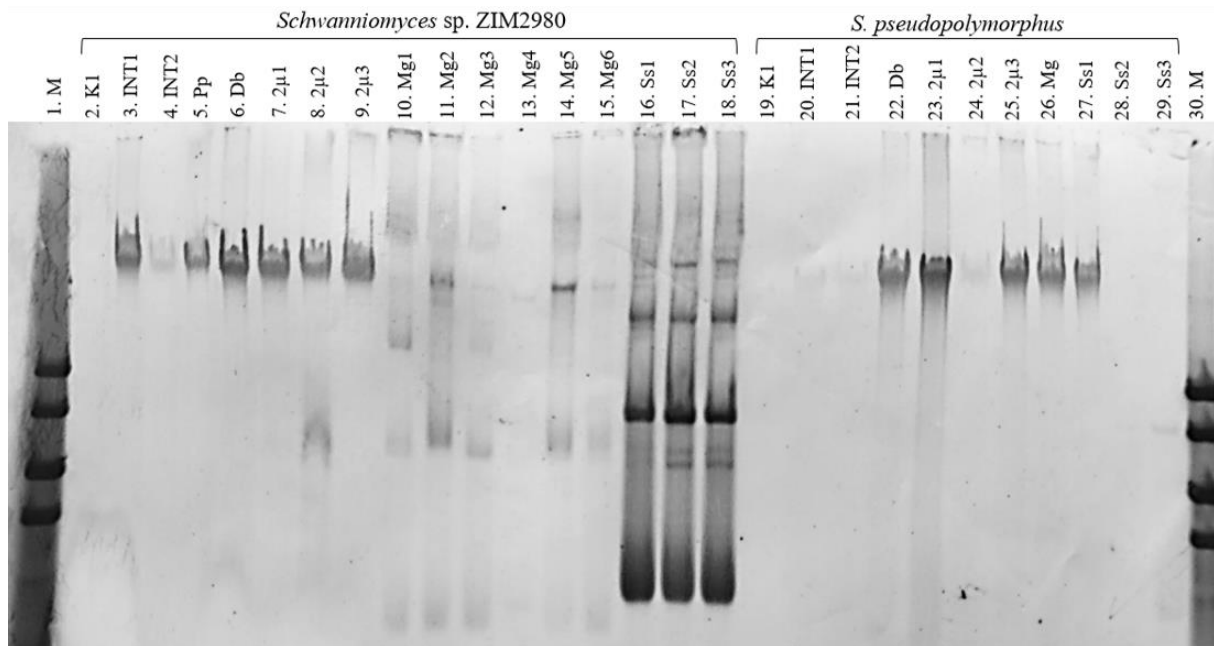
Schwanniomyces polymorphus var. *polymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* održava u kružnom obliku, dok se plazmid pRS54cH (Ss) koji nosi ishodište replikacije iz *S. stipitis* u stanicama svih transformiranih vrsta kvasaca najvjerojatnije održava u kružnom obliku. U vrstama kvasaca u kojima se plazmidi održavaju u kružnom obliku, postignuta je visoka efikasnost transformacije koja iznosi oko $1,60 \times 10^4$ transformanata μg^{-1} DNA prilikom transformacije plazmidom pRS55cH (Mg) i $2,7 - 5,9 \times 10^5$ transformanata μg^{-1} DNA prilikom transformacije kvasaca plazmidom pRS54cH (Ss). Transformacijom s lineariziranim integrativnim plazmidom pRS40cH (INT) postignute su također zadovoljavajuće efikasnosti $238 - 1,12 \times 10^4$ transformanata μg^{-1} DNA.

Kako bi se potvrdila uspješnost transformacije te provjerilo mogu li se plazmidi u dobivenim transformantima uspješno samostalno replicirati, tj. održavati u kružnom obliku, ili su integrirani u genom kvasca, provedena je molekularna analiza odabranih transformanata metodom hibridizacije DNA po Southernu.

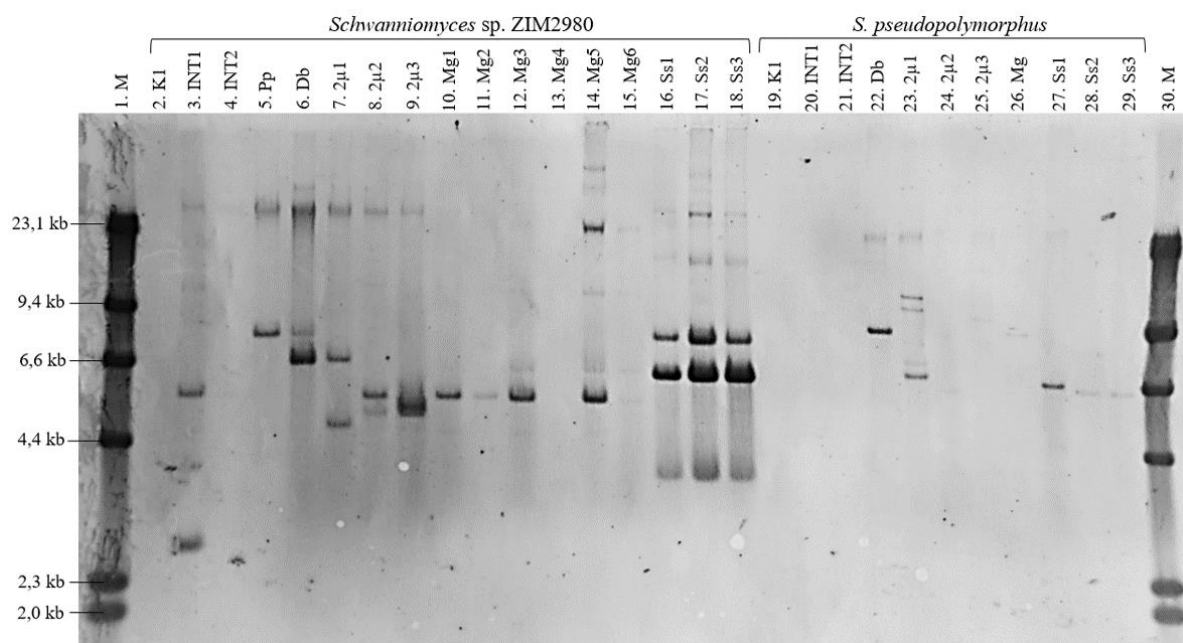
4.5. Molekularna analiza metodom hibridizacije DNA po Southernu

Uspješnost transformacije provjerena je metodom hibridizacije DNA po Southernu u odabranim transformantima vrsta *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 i *Schwanniomyces pseudopolymorphus*.

Hibridizacija je provedena na dvjema membranama, na jednu membranu transferirana je nepocijepana DNA (slika 6), a na drugu DNA pocijepana restrikcijom enzimom XmnI (samo za analizu transformanata dobivenih pomoću plazmida pRS40cH (INT)) ili HindIII (za analizu transformanata dobivenih pomoću ostalih plazmida, slika 7). Kao proba za hibridizaciju korištena je DIG-om obilježena okosnica plazmida koja sadrži regije *bla*, *ori* i *fl*. Stoga se ova proba komplementarno sparuje s okosnicom svih 6 plazmida korištenih za transformaciju.



Slika 6. Rezultat hibridizacije nepocijepane DNA metodom po Southernu. K1 – negativna kontrola; INT1 i INT2 – DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS40cH (INT); Pp - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS53cH (Pp); Db - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS56cH (Db); 2 μ 1-2 μ 3 - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS52cH (2 μ); Mg, Mg1-Mg6 - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS55cH (Mg); Ss1-Ss3 - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS54cH (Ss).



Slika 7. Rezultat hibridizacije DNA pocijepane restrikcijom endonukleazom HindIII ili XmnI metodom po Southernu. U jažicama 3, 4, 20 i 21 je DNA pocijepana s XmnI, a u svim ostalim jažicama s HindIII. M - standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana s HindIII); K1 – negativna kontrola; INT1 i INT2 – DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS40cH (INT); Pp -

DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS53cH (Pp); Db - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS56cH (Db); 2 μ 1-2 μ 3 - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS52cH (2 μ); Mg, Mg1-Mg6 - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS55cH (Mg); Ss1-Ss3 - DNA izolirana iz transformanata koji sadrže plazmid pRS54cH (Ss).

Kod svih transformanata dobiven je signal što potvrđuje da su stanice kvasca zaista transformirane korištenim plazmidima, dok kod negativnih kontrola nema signala. Na slici 6 može se vidjeti da je kod kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 prilikom transformacije s plazmidima pRS40cH (INT), pRS53cH (Pp), pRS56cH (Db) i pRS52cH (2 μ) došlo do integracije plazmida u genom (nepocijepana kromosomska DNA vidljiva je kao jedna intenzivna vrpca pri vrhu membrane) i može se zaključiti da ishodišta replikacije iz kvasaca *K. lactis* i *D. bruxellensis* te ishodište replikacije 2 μ iz kvasca *S. cerevisiae* nisu aktivna u tom kvascu. Plazmid pRS55cH (Mg) koji sadrži ishodište replikacije iz *M. guilliermondii* i plazmid pRS54cH (Ss) koji sadrži ishodište replikacije iz *S. stipitis* replikativni su u kvascu *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 što se može zaključiti iz membrane na kojoj je hibridizirana nepocijepana DNA gdje su vidljive različite konformacije kružnog plazmida. Također, jasno se vidi razlika u intenzitetu vrpca između replikativnih plazmida pRS55cH (Mg) i pRS54cH (Ss) što može biti posljedica različitog broja kopija plazmida u stanicama.

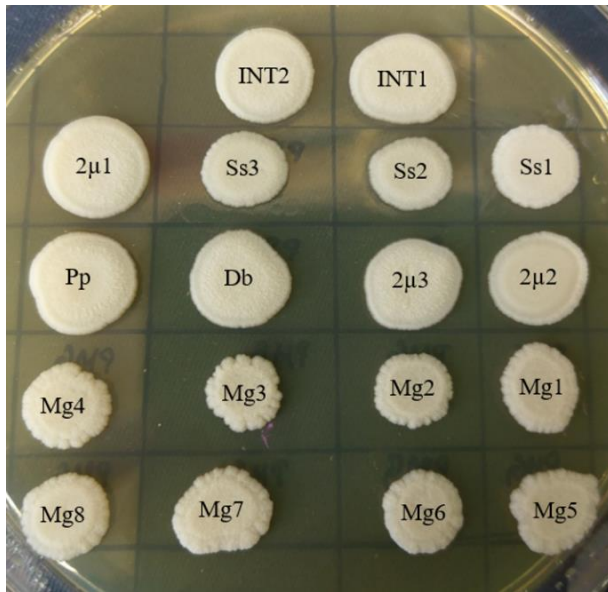
Kod kvasca *S. pseudopolymorphus* došlo je do integracije plazmida prilikom transformacije s plazmidima pRS40cH (INT), pRS53cH (Pp), pRS56cH (Db), pRS52cH (2 μ) i pRS55cH (Mg) što dovodi do zaključka da u ovom kvascu također nisu aktivna ishodišta replikacije iz kvasaca *K. lactis* i *D. bruxellensis*, ishodište replikacije 2 μ iz kvasca *S. cerevisiae* te dodatno još i ishodište replikacije iz *M. guilliermondii*. Plazmid pRS54cH (Ss) replikativan je u kvascu *S. pseudopolymorphus* (transformanti Ss2 i Ss3), ali je u jednom od tri analizirana transformanta navedeni plazmid integriran u kromosom kvasca (transformant Ss1).

Na membranu prikazanu na slici 7 transferirana je DNA pocijepana s HindIII (pRS55cH (Mg), pRS54cH (Ss), pRS53cH (Pp), pRS56cH (Db), pRS52cH (2 μ)) ili XmnI (pRS40cH (INT)), koji plazmide cijepaju na samo jednom mjestu, te je provedena hibridizacija DNA. Kod transformanata kod kojih je došlo do integracije plazmida u genom (jažice 3-9, 20-27) može se primijetiti vrpca neporezane DNA te najčešće još dvije vrpce iz čega se može zaključiti da su u većini stanica plazmidi integrirani u jednoj kopiji. Kod transformanata koji sadrže replikativne plazmide (jažice 10-18, 28, 29) dobivene su vrpce koje odgovaraju veličini plazmida, no u nekim jažicama bilo je i nepocijepane DNA pa se može vidjeti više vrpca koje odgovaraju različitim konformacijama plazmida.

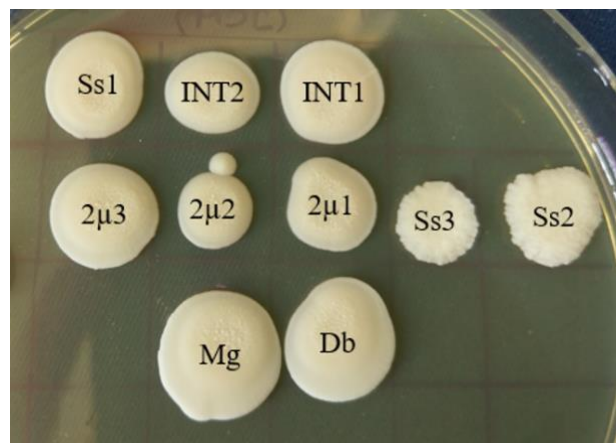
4.6. Morfologija kolonija odabranih transformanata

Primijećeno je da transformanti koji su odabrani za molekularnu analizu metodom hibridizacije DNA po Southernu tvore kolonije različite morfologije. Kako bi se bolje proučila morfologija kolonija spomenutih kvasaca, 5 μ L kultura transformanata je nacijepljeno u obliku kapljice na selektivnu podlogu s higromicinom, a rezultati su prikazani na slici 8.

a) *Schwanniomyces* sp. ZIM2980



b) *Schwanniomyces pseudopolymorphus*



Slika 8. Kolonije transformanata *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 (a) i *S. pseudopolymorphus* (b) na podlogama s higromicinom. INT1 i INT2 – sadrže plazmid pRS40cH (INT); Ss1, Ss2 i Ss3 – sadrže plazmid pRS54cH (Ss); 2 μ 1, 2 μ 2 i 2 μ 3 – sadrže plazmid pRS52cH (2 μ); Db – sadrže plazmid pRS56cH (Db); Pp – sadrže plazmid pRS53cH (Pp); Mg, Mg1- Mg8 – sadrže plazmid pRS55cH (Mg).

Na slici 8 a) može se primijetiti da transformanti *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, koji sadrže plazmid pRS55cH (Mg), prilikom rasta na krutim podlogama s odgovarajućom koncentracijama higromicina tvore kolonije koje imaju rubove s malim udubljenjima što su morfološke odlike karakteristične za kolonije kod kojih dolazi do odumiranja dijela stanica. Stoga je moguće da je navedeni plazmid u ovom kvascu replikativan, ali i nestabilan, tj. ne uspijeva se stabilno nasljeđivati prilikom diobe stanica, a one stanice koje izgube plazmid ne mogu preživjeti na podlozi s higromicinom. Rezultati molekularne analize hibridizacije DNA po Southernu zaista pokazuju da se radi o replikativnom plazmidu, a na membrani se može primijetiti i da su vrpce slabijeg intenziteta, vjerojatno upravo zbog toga što je plazmid nestabilan te je u stanicama prisutan u malom broju kopija. Kolonije transformanata koje sadrže plazmid pRS54cH (Ss) imaju manje izražena udubljenja. Mogući razlog je taj da se ovaj plazmid stabilnije nasljeđuje pa manje stanica odumire na selektivnim podlogama. Rezultati molekularne analize pokazuju da je ovaj plazmid također replikativan, ali vjerojatno i prisutan

u većem broju kopija u stanici zbog čega daje vrpce jačeg intenziteta. Kod ostalih transformanata kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 je molekularnom analizom potvrđeno da je prilikom transformacije došlo do integracije plazmida u genom kvasca. Navedeni transformanti tvore kolonije cjelovitih rubova zbog toga što se plazmid integriran u genom stabilno nasljeđuje, a samim time i gen za rezistenciju na antibiotik, pa nema odumiranja stanica na selektivnim podlogama.

Slika 8 b) prikazuje odabrane transformante kvasca *S. pseudopolymorphus* i može se vidjeti da kolonije s udubljenjima na rubovima tvore samo transformanti Ss2 i Ss3 (sadrže plazmid pRS54cH (Ss)), dok transformant Ss1 i svi ostali ispitivani transformanti tvore kolonije s cjelovitim rubom. Kao i kod transformanata kvasca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 koji tvore kolonije s cjelovitim rubom, i kod kvasca *S. pseudopolymorphus* je takav izgled kolonija karakterističan za transformante kod kojih je molekularnom analizom pokazano da je došlo do integracije plazmida u genom. Molekularnom analizom transformanata Ss2 i Ss3 dobivene su vrpce slabog intenziteta što ukazuje na to da plazmid vjerojatno u stanici nije prisutan u velikom broju kopija. Kako bi se odredilo u kojoj mjeri se replikativni plazmidi gube, testirana je stabilnost plazmida.

4.7. Određivanje stabilnosti plazmida

Kako bi se odredila stabilnost plazmida, proveden je eksperiment tako da su odabrani transformanti uzgajani u selektivnim tekućim podlogama (s higromicinom) te je 10 μ L predkulture svakog transformanta naciepljeno na krute selektivne i neselektivne podloge koje su inkubirane dva dana, a zatim su izbrojane porasle kolonije. Osim toga, 100 μ L četvrtog decimalnog razrjeđenja predkulture naciepljeno je u 20 mL neselektivne podloge. Nakon uzgoja u neselektivnim tekućim podlogama, transformanti su naciepljeni na krute selektivne i neselektivne podloge te su dva dana kasnije izbrojane porasle kolonije. Udio stanica rezistentnih na higromicin nakon uzgoja u selektivnoj i neselektivnoj tekućoj podlozi prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Udio stanica kvasca rezistentnih na higromicin B nakon uzgoja u selektivnoj i neselektivnoj podlozi

VRSTA	PLAZMID	UDIO REZISTENTNIH STANICA (%)	
		NAKON UZGOJA U SELEKTIVNOJ PODLOZI	NAKON UZGOJA U NESELEKTIVNOJ PODLOZI
<i>Schwanniomyces</i> sp. ZIM2980	pRS40cH (INT)	≈ 100 %	≈ 100 %
	pRS52cH (2μ)	≈ 100 %	≈ 100 %
	pRS54cH (Ss)	30,77 %	0,89 %
	pRS55cH (Mg)	7,86 %	0,03 %
<i>S. pseudopolymorphus</i>	pRS40cH (INT)	≈ 100 %	≈ 100 %
	pRS52cH (2μ)	≈ 100 %	≈ 100 %
	pRS54cH (Ss)	5,88 %	0,02 %
<i>S. polymorphus</i> var. <i>africanus</i>	pRS40cH (INT)	≈ 100 %	≈ 100 %
	pRS52cH (2μ)	≈ 100 %	≈ 100 %
	pRS54cH (Ss)	≈ 100 %	0,50 %
	pRS55cH (Mg)	0,24 %	0,00 %
<i>S. polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i>	pRS40cH (INT)	≈ 100 %	142,86 %
	pRS52cH (2μ)	7,50 %	0,00 %
	pRS54cH (Ss)	28 %	0,38 %
	pRS55cH (Mg)	1,00 %	0,00 %

Rezultati određivanja stabilnosti plazmida pokazuju da se plazmid pRS40cH (INT) u potpunosti stabilno nasljeđuje jer udio rezistentnih stanica iznosi 100 %, što je u skladu s očekivanjima obzirom da je u tom slučaju plazmid integriran u kromosom. Iz rezultata se također može zaključiti da i prilikom transformacije s plazmidom pRS52cH (2 μ) kod kvasaca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *S. pseudopolymorphus* i *S. polymorphus* var. *africanus* dolazi do integracije plazmida u genom, a kod prva dva navedena kvasca to je i potvrđeno molekularnom analizom hibridizacijom DNA po Southernu.

Čak i uz prisustvo selektivnog pritiska, udio živih stanica koje u trenutku nacijepeljivanja na krute podloge sadrže plazmid pRS55cH (Mg) je mali te za *S. polymorphus* var. *africanus* iznosi svega 0,24 %, dok je za *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 najviši, no svejedno relativno nizak, a iznosi 7,86 %. Ovi rezultati dovode do zaključka da se transformacijom s tim plazmidom mogu dobiti transformanti koji sadrže plazmid u kružnom obliku, no on je vrlo nestabilan što ga čini neadekvatnim replikativnim plazmidom za primjenu u ova četiri kvasca. Plazmid pRS54cH (Ss) je u sva četiri kvasca replikativan te stabilniji od plazmida pRS55cH (Mg). Kod kvasca *S. polymorphus* var. *africanus* je navedeni plazmid izuzetno stabilan, te se uz primjenu selektivnog pritiska on nalazi u 100 % nacijepeljenih stanica.

Nakon uzgoja u neselektivnim uvjetima, od replikativnih plazmida najveću stabilnost pokazuje plazmid pRS54cH (Ss) u kvascu *Schwanniomyces* sp. ZIM2980 gdje, čak i pri uzgoju bez selektivnog pritiska, udio rezistentnih stanica na kraju rasta kulture, nakon otprilike 32 generacije, iznosi gotovo 1 %. To se može objasniti velikim brojem kopija ovog plazmida po stanici što je u skladu s rezultatima molekularne analize metodom hibridizacije DNA po Southernu gdje se, kod ovih transformanata, mogu vidjeti vrlo intenzivne vrpce. Na temelju ovih rezultata, može se zaključiti da je ovaj plazmid vrlo dobar replikativni vektor za korištenje u *Schwanniomyces* sp. ZIM2980. Ukoliko bi se htjela postići povećana ekspresija nekog proteina u ovom kvascu, dobar način za to bio bi kloniranje gena koji kodira za željeni protein na plazmid pRS54cH (Ss) jer se navedeni plazmid u stanicama vjerojatno nalazi u većem broju kopija. Međutim kod transformanata kvasca *S. pseudopolymorphus*, dobivenih transformacijom plazmidom pRS54cH (Ss), se može zaključiti da je navedeni plazmid dosta nestabilan te da se u stanicama plazmid nalazi u malom broju kopija, a to je u skladu s rezultatima molekularne analize gdje ovi transformanti daju vrlo blijedi signal. Važno je napomenuti da molekularna analiza metodom hibridizacije DNA po Southernu nije dobra metoda za kvantifikaciju molekula DNA, međutim u ovom radu je razlika u intenzitetu vrpce tolika da je moguće diskutirati o količini DNA na temelju tih rezultata. Za transformanate kvasca *S. polymorphus*

var. *polymorphus* i *S. polymorphus* var. *africanus* nije provedena molekularna analiza, ali se vidi da je u njima plazmid pRS54cH (Ss) nešto manje stabilan nego u *Schwanniomyces* sp. ZIM2980.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Provedena je prva uspješna genetička transformacija kvasaca *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *Schwanniomyces pseudopolymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus*.
2. Postupak razvijen za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* može se koristiti i za transformaciju odabranih vrsta iz roda *Schwanniomyces* (*Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *Schwanniomyces pseudopolymorphus*, *Schwanniomyces polymorphus* var. *polymorphus* i *Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus*).
3. Ishodišta replikacije iz *M. guilliermondii* i *S. stipitis* funkcionalna su u kvascima *Schwanniomyces* sp. ZIM2980, *S. polymorphus* var. *polymorphus* i *S. polymorphus* var. *africanus*, dok je u kvascu *S. pseudopolymorphus* funkcionalno samo ishodište replikacije iz *S. stipitis*.
4. Plazmid koji sadrži ishodište replikacije iz *S. stipitis* bi se mogao koristiti za konstrukciju replikativnih ekspresijskih plazmida u kvascu *Schwanniomyces* sp. ZIM2980.

6. LITERATURA

Alriksson, B. (2006) *Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates*. PhD Thesis, Karlstad University.

Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* **18**, 768–778.

Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M. (2016) Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiol.* **16**, 21-30.

Chamnipa, N., Thanonkeo, S., Klanrit, P., Thanonkeo, P. (2018) The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Braz. J. Microbiol.* **49(2)**, 378-391.

Chang, D.C., Saunders, J. A., Chassy, B. M., Sowers, A. E. (1992) Overview of Electroporation and Electrofusion. U: Guide to Electroporation and Electrofusion, (Chang, D.C., Saunders, J. A., Chassy, B. M., Sowers, A. E., ured.), Academic Press, Inc., San Diego, str. 1.

Deibel Jr., M.R., Hiebsch, R.R., Klein, R.D. (1988) Secreted Amylolytic Enzymes from *Schwanniomyces Occidentalis*: Purification by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) and Preliminary Characterization. *Prep Biochem.* **18(1)**, 77-120.

Doğan, A. Demirci, S., Aytekin, A.Ö., Şahin, F. (2014) Improvements of Tolerance to Stress Conditions by Genetic Engineering in *Saccharomyces Cerevisiae* during Ethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 28-42.

Dohmen, R.J., Hollenberg, C.P. (1996) *Schwanniomyces occidentalis*. U: Nonconventional Yeasts in Biotechnology: a handbook, (Wolf, K., ured.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, str. 117-137.

Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Dahlems, U.M., Hollenberg, C.P. (1990) Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (*GAMI*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **95**, 111-121.

Ganeva, V., Galutzov, B., Teissie, J. (1995) Fast kinetic studies of plasmid DNA transfer in intact yeast cells mediated by Electropulsation. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **214**, 825-832.

- Gietz, R.D., Woods, R.A. (2001) Genetic Transformation of Yeast. *BioTechniques* **30**, 816-831.
- Ingledeu, W.M. (1987) *Schwanniomyces*: a potential superyeast? *Crit. Rev. Biotechnol.* **5(2)**, 159-176.
- Ingledeu, W.M. (1993) Yeasts for Production of Fuel Ethanol. U: The Yeasts: Yeast Technology, 2. izd., (Rose, A. H., Harrison, J. S., ured.), Elsevier, San Diego, str. 245-292.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. *J. Bacteriol.* **153(1)**, 163-168.
- Iwaki, A., Kawai, T., Yamamoto, Y., Izawa, S. (2013) Biomass conversion inhibitors furfural and 5-hydroxymethylfurfural induce formation of messenger RNP granules and attenuate translation activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79(5)**, 1661-1667.
- Jung, Y.H., Kim, K.H. (2015) Acidic Pretreatment. U: Pretreatment of Biomass, (Pandey, A., Negi, S., Binod, P., Larroche, C., ured.), Elsevier, Amsterdam/Oxford/Waltham, str. 27-50.
- Kawai, S., Hashimoto, W., Murata, K. (2010) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi Methods and possible underlying mechanism. *Bioeng. Bugs.* **1(6)**, 395-403.
- Löbs, A.K., Schwartz, C., Wheeldon, I. (2017) Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2(3)**, 198-207.
- Miklenić, M., Štafa, A., Bajić, A., Žunar, B., Lisnić, B., Svetec, I.K. (2013) Genetic Transformation of the Yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* with Non-Homologous DNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23(5)**, 674–680.
- Miklenić, M., Žunar, B., Štafa, A., Svetec, I.K. (2015) Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res.* **15(8)**.
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S., Marbawi, H., Gansau, J., Mohd Faik, A., Rodrigues, K. (2017) Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Rep.* **10**, 52-61.
- Mukherjee V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K.J., Lievens, B., Thevelein, J.M. (2017) Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 216-235.

- Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer, D., Mrvčić, J., Šantek, B. (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanol iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glasnik zaštite bilja* 5/2017.
- Piontek, M., Hagedorn, J., Hollenberg, C.P., Gellissen, G., Strasser, A.W.M. (1998) Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 331-338.
- Prosen, E.M., Radlein, D., Piskorz, J., Scott, D.S., Legge, R.L. (1993) Microbial Utilization of Levoglucosan in Wood Pyrolysate as a Carbon and Energy Source. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 538-541.
- Robak, K., Balcerek, M. (2018) Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technol. Biotechnol.* **56(2)**, 174-187.
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* **99(13)**, 5270-5295.
- Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L., Laluce C. (2002) Non-conventional yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58(2)**, 147–156.
- Suthar, D.H., Chattoo, B.B. (2006) Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth and levels of α -amylase in *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 94-102.
- Suzuki, M., Kurtzman, C.P. (2011) *Schwanniomyces* Klocker emend. M. Suzuki & Kurtzman. U: The Yeasts, a Taxonomic Study, 5. izd., (Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., ured.), Elsevier, New York, str. 785-794.
- Štafa, A., Miklenić, M., Žunar, B., Lisnić, B., Symington, L.S., Svetec, I.K. (2014) Sgs1 and Exo1 suppress targeted chromosome duplication during ends-in and ends-out gene targeting. *DNA Repair* **22**, 12–23.
- Wang, T-T., Lee, C-F., Lee, B.H. (1999) The Molecular Biology of *Schwanniomyces occidentalis* Klocker. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19(2)**, 113-143.
- Wang, Y., Liu, H., Sun, T., Zhang, S. (1998) Cloning of α -amylase gene from *Schwanniomyces occidentalis* and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. China C. Life Sci.* **41(6)**, 569-575.
- Winston, F., Chumley, F., Fink, G. R. (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 211-228.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Angela Hatanović
Ime i prezime studenta