

Razvoj primjene dviju glikozid hidrolaza - ekspresija saharoza fosforilaze na površini *S. cerevisiae* i praćenje aktivnosti alfa-amilaze

Lilek, Stela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:993605>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Stela Lilek

RAZVOJ PRIMJENE DVIJU GLIKOZID
HIDROLAZA - EKSPRESIJA SAHAROZA
FOSFORILAZE NA POVRŠINI *S.*
cerevisiae I PRAĆENJE AKTIVNOSTI α -
AMILAZE

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemiju u Zavodu za kemiju i biokemiju i u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anite Slavica i komentorstvom prof. dr. sc. Renate Teparić.

Ovaj je diplomski rad izrađen u okviru projekta „Biotehnološka primjena ugradnje heterolognih proteina u stanične stijenke kvasca (IP-2019-04-2891)“ Hrvatske zaklade za znanost, čije je trajanje predviđeno u razdoblju 2019.-2023.

Hvala prof. dr. sc. Damiru Ivekoviću na superviziji tijekom praćenja aktivnosti α -amilaze skenirajućom elektronskom mikroskopijom.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Slavici na uloženom vremenu i trudu tijekom izrade eksperimenata, pruženim savjetima, razumijevanju i pomoći pri pisanju diplomskog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Renati Teparić na pomoći i savjetima pruženim tijekom izrade eksperimenata i pisanja diplomskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem svojim najbližima, posebice roditeljima, na pruženoj podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za kemiju i biokemiju i Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemiju i Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

Razvoj primjene dviju glikozid hidrolaza - ekspresija saharoza fosforilaze na površini *S. cerevisiae* i praćenje aktivnosti α -amilaze

Stela Lilek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058211793

Sažetak: U ovome radu je istražena mogućnost primjene dviju glikozid hidrolaza - saharoza fosforilaze i α -amilaze. Primjenom odabranih metoda molekularne biotehnologije gen iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides* koji kodira za saharoza fosforilazu (*LmSPaza*), umetnut je u plazmid pRST423_Ccw12_G i načinjen je konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza. Ovi postupci su provedeni uz korištenje bakterijskog soja *Escherichia coli* DH5 α , čije su transformirane stanice rezistentne na ampicilin. Gen koji kodira za *LmSPazu* insertiran je u konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza između dva dijela gena *ScCCW12*, čime je osigurana uspješna ekspresija ovoga proteina na vanjskoj površini stijenke kvasca *S. cerevisiae*. LiAc metodom uspješno su konstruktom pRS_Ccw12LmSPaza transformirana dva soja kvasca *S. cerevisiae* - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210, a ekspresija *LmSPaze* potvrđena metodama SDS-PAGE i Western blot. Hidroliza škroba α -amilazom uspješno je popraćena skenirajućom elektronskom mikroskopijom i na ovaj način su potvrđeni rezultati prethodnih istraživanja u ovoj grupi.

Ključne riječi: glikozid hidrolaze, saharoza fosforilaza, α -amilaza, *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 61 stranica, 11 slika, 23 tablice, 38 literaturnih navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Komentor: prof. dr. sc. Renata Teparić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Renata Teparić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anita Slavica (mentor)
3. prof. dr. sc. Blaženka Kos (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

Datum obrane: 30. rujan 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry and Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biochemistry and Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

Development of the application of two glycoside hydrolases - expression of sucrose phosphorylase on *S. cerevisiae* surface and monitoring of α -amylase activity

Stela Lilek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058211793

Abstract: The use of two glycoside hydrolases - sucrose phosphorylase and α -amylase was investigated in this thesis. By applying selected methods of molecular biotechnology, the gene from the bacterium *Leuconostoc mesenteroides*, coding for sucrose phosphorylase (*LmSPase*) was successfully inserted into plasmid pRST423_Ccw12_G and the pRS_Ccw12LmSPase construct was made. These procedures were carried out using the bacterial strain *Escherichia coli* DH5 α , whose transformed cells are resistant to ampicillin. The gene that codes for *LmSPase* was inserted into the pRS_Ccw12LmSPase construct between two parts of the *ScCCW12* gene, which ensured the successful expression of this protein on the outer surface of the *S. cerevisiae* yeast wall. Using the LiAc method, two *S. cerevisiae* strains - *S. cerevisiae* BY4741 and *S. cerevisiae* SEY6210 were successfully transformed with the pRS_Ccw12LmSPase and *LmSPase* expression was confirmed by SDS-PAGE and Western blot. Hydrolysis of starch by α -amylase was successfully monitored by scanning electron microscopy and in this way the results of previous research in this group were confirmed.

Keywords: glycoside hydrolases, sucrose phosphorylase, α -amylase, *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 61 pages, 11 figures, 23 tables, 38 references, 3 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Anita Slavica, PhD, Full Professor

Co-mentor: Renata Teparić, PhD, Full Professor

Reviewers:

1. Renata, Teparić, PhD, Full professor (president)
2. Anita, Slavica, PhD, Full professor (mentor)
3. Blaženka, Kos, PhD, Full professor (member)
4. Jasna, Mrvčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 30th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. SAHAROZA FOSFORILAZA.....	3
2.1.1. Primjena saharoza fosforilaze	4
2.2. PRIMJENA ODABRANIH METODA MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE U EKSPRESIJI SAHAROZA FOSFORILAZE.....	5
2.2.1. Transformacija stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> DH5 α i ekspresija proteina	5
2.2.2. Ekspresija proteina u sojevima kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 i <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SEY6210	7
2.3. HIDROLIZA ŠKROBA DJELOVANJEM α -AMILAZE.....	9
2.3.1. Primjena skenirajuće elektronske mikroskopije u praćenju hidrolize škroba.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI I METODE	12
3.1.1. Materijali	12
3.1.1.1. Mikroorganizmi, plazmidi i enzimi	12
3.1.1.1.1. Mikroorganizmi	12
3.1.1.1.2. Plazmidi	13
3.1.1.1.2.1. Plazmid pMiniT2-LmSPaza.....	13
3.1.1.1.2.2. Plazmid pRST423_Ccw12_G	14
3.1.1.1.2.3. Plazmid pRS_Ccw12LmSPaza	14
3.1.1.1.3. Enzimi i kitovi.....	15
3.1.1.2. Kemikalije i hranjive podloge.....	15
3.1.1.2.1. Kemikalije	15
3.1.1.2.2. Hranjive podloge.....	18
3.1.1.2.3. Pufferi i otopine.....	20
3.1.1.2.3.1. Pufferi i otopine za izolaciju stijenki stanica kvasca i SDS-PAGE	20
3.1.1.2.3.2. Pufferi i otopine za Western blot.....	24
3.1.1.2.3.3. Puffer za hidrolizu škroba	25
3.1.1.3. Uređaji.....	25
3.1.2. Metode	28
3.1.2.1. Priprema svježih kultura bakterijskog soja <i>E. coli</i> DH5 α i sojeva kvasca <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> SEY6210 i <i>S. cerevisiae</i> BY4741 i čuvanje ovih kultura	30
3.1.2.2. Transformacija kemijski kompetentnih stanica <i>E. coli</i> DH5 α	31
3.1.2.3. Izolacija plazmidne DNA iz stanica <i>E. coli</i> DH5 α	32

3.1.2.4. Restrikcija plazmida pMiniT2-LmSPaza i pRST423_Ccw12_G	33
3.1.2.5. DNA elektroforeza	34
3.1.2.6. Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela	34
3.1.2.7. Određivanje koncentracije DNA	35
3.1.2.8. Ligacija inserta s genom za <i>LmSPazu</i> i plazmida pRST423_Ccw12_G i konstrukcija pRS_Ccw12LmSPaza za transformaciju stanica kvasca.....	36
3.1.2.9. Transformacija stanica <i>E. coli</i> DH5 α konstruktom pRS_Ccw12LmSPaza	36
3.1.2.10. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom	36
3.1.2.11. Uzgoj transformiranih stanica sojeva kvasca <i>S. cerevisiae</i> SEY6210 i <i>S. cerevisiae</i> BY4741	37
3.1.2.12. Izolacija staničnih stijenki kvasaca	38
3.1.2.13. Izolacija proteina stijenki	38
3.1.2.13.1. Izdvajanje nekovalentno vezanih proteina staničnih stijenki kvasaca SDS tretmanom	38
3.1.2.13.2. Izdvajanje kovalentno vezanih proteina staničnih stijenki kvasaca primjenom β -glukanaze.....	39
3.1.2.14. SDS-PAGE.....	39
3.1.2.15. Western blot	40
3.1.2.16. Hidroliza škroba α -amilazom i primjena skenirajućeg elektronskog mikroskopa.....	42
3.1.2.16.1. Hidroliza škroba α -amilazom.....	42
3.1.2.16.2. Priprema uzoraka za skenirajuću elektronsku mikroskopiju	42
3.1.2.16.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija	42
4. REZULTATI I RASPRAVA	43
4.1. EKSPRESIJA SAHAROZA FOSFORILAZE NA POVRŠINI STANICA KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.1.1. Konstrukcija plazmida pRS_Ccw12LmSPaza.....	44
4.1.2. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom.....	47
4.1.3. Provjera vezanja proteina <i>LmSPaza</i> u staničnu stijenkku kvasca Western blot metodom.....	49
4.2. PRAĆENJE HIDROLIZE ŠKROBA SKENIRAJUĆOM ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM.....	50
5. ZAKLJUČCI.....	55
6. LITERATURA.....	56

1. UVOD

Dva enzima iz obitelji glikozid hidrolaza - 13 (GH-13) - saharoza fosforilaza i α -amilaza, obuhvaćena su istraživanjima opisanim u ovom diplomskom radu. Značaj obaju enzima u modernoj biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji izuzetno je dokumentiran i poznat. Preostaje da se istraži, optimizira i primijeni (A) imobilizacija saharoze fosforilaze i (B) analitički poprati nedovoljno okarakterizirana aktivnost α -amilaze, što je karakteristično za sve enzime čiji su supstrati kompleksne strukture. Zbog toga je u ovome radu istražena mogućnost ekspresije tj. imobilizacije saharoza fosforilaze na površini stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i dodatno je popraćena aktivnost komercijalne α -amilaze metodom skenirajuće elektronske mikroskopije.

Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7.) bakterijska je transglukozidaza koja katalizira reakciju fosforolize saharoze u prisutnosti fosfata do α -D-glukoza-1-fosfata i D-fruktoze. Osim fosforolize različitih supstrata, ovaj enzim može katalizirati i povratnu reakciju - reakciju sinteze npr. saharoze, zatim hidrolizu supstrata (npr. saharoze do D-fruktoze i D-glukoze) i transglikozilaciju. U reakcijama transglikozilacije saharoza fosforilaza može koristiti različite arilne alkohole i karbonske kiseline kao akceptore glukozilne podjedinice. Tako npr. ovaj enzim može katalizirati reakciju regioselektivne glikozilacije glicerola ukoliko je donor glukozilne podjedinice saharoza, a pri čemu se dobiva D-fruktoza i glukopiranozil glicerol (GG) - visoko vrijedna biokemikalija. Ukoliko se želi učinkovito proizvesti ovaj spoj (GG), važno je da saharoza fosforilaza uglavnom provodi transglikozilaciju i ima nisku sintaznu i hidrolaznu aktivnost.

Cilj ovog rada bio je načiniti konstrukt koji sadrži gen koji kodira za saharoza fosforilazu fuzioniran sa genom koji kodira za protein stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. Na ovaj bi se način „imobilizirao“ ovaj enzim na vanjskoj površini stanica kvasca i, zbog toga, mogao koristiti u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji visoko vrijednih glikoziliranih biokemikalija.

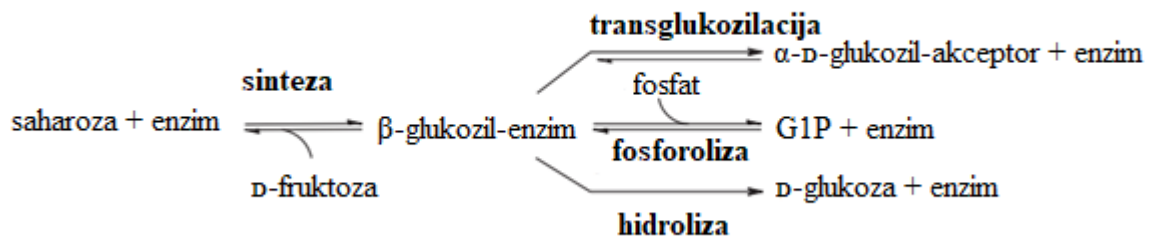
Primjena polimernih supstrata i kompleksnih sirovina je uvjet bez kojeg moderna biotehnološka industrija ne može funkcionirati. Stoga je u ovome radu vizualizirana aktivnost druge glikozid hidrolaze - α -amilaze tijekom njezine aktivnosti prema škrobu. Škrob je polisaharid građen od D-glukozilnih podjedinica povezanih u tri različita dijela škroba - amiloze, amilopektina i dodatnih polimernih struktura, koje za sada nisu dovoljno okarakterizirane. Amiloza je linearni polimerni dio škroba u kojem su glukozilne podjedinice povezane α -1,4-

glikozidnom vezom, a konfiguracija ovog polimera je samostalna ili dvostruka uzvojnica. Amilopektin je polimer kod kojeg su glukozilne podjedinice povezane α -1,4-glikozidnom vezom u linearnom dijelu lanca te α -1,6-glikozidnim vezama nakon 20-25 podjedinica. Dakle, amilopektin je tzv. razgranati dio škroba. Škrob se smatra glavnim polisaharidnim polimerom kod različitih biljaka. Ovaj je polimer relativno dostupan, ima nižu cijenu u usporedbi s oligo-, di- i monosaharidima (npr. glukozom) i, ukoliko se primijene odgovarajući biokatalizatori, škrob se može relativno lako razgraditi u okvirima učinkovitoga biotehnološkoga procesa i to znatno učinkovitije od celuloze, koja se ne može direktno koristiti u prehrambenoj industriji. U ovome radu bio je cilj popratiti visoko učinkovitu hidrolizu škroba α -amilazom i to skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Ovom metodom mogu se popratiti postupne promjene strukture ovog polimernog supstrata i to promjene od reda veličine 1 Å.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SAHAROZA FOSFORILAZA

Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) svrstana je u obitelj α -amilaza GH-13 (Franceus i Desmet, 2019). Obitelj GH-13 je glavna grupa glikozid hidrolaza, koje kataliziraju reakcije konverzije različitih supstrata, čije su podjedinice povezane α -glukozidnim vezama. Saharoza fosforilaza (eng. sucrose phosphorylase, SPase) katalizira reakcije hidrolize glikozida (npr. saharoze), zatim reakcije transglukozilacije, kao i reakcije fosforolize određenih supstrata (npr. saharoze), ali i sintezu potencijalnih donora glukozila iz odgovarajućih podjedinica (npr. saharoze; slika 1.; prema Goedl i sur., 2010).



Slika 1. Reakcije koje katalizira saharoza fosforilaza (prema Goedl i sur., 2010).

Dakle, ovaj enzim provodi hidrolizu i reverzibilnu fosforolizu saharoze u prisutnosti fosfatne skupine do D-fruktoze i α -D-glukoza-1-fosfata (slika 1.). Reakcija sinteze donora glukozila - supstrata (npr. saharoze) iz odgovarajućih podjedinica nije poželjna reakcija u primjeni ovoga enzima u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji. Reakcije transglukozilacije doprinose važnosti SPaze u modernoj biotehnološkoj proizvodnji rijetkih i visoko vrijednih glukoziliranih spojeva, što dodatno podupire i raznovrsnost akceptorskih molekula glukozilne podjedinice u reakcijama koje katalizira ovaj enzim. Transglukozilacija je reakcija koju karakterizira prijenos glukozilne podjedinice od donora (npr. saharoze) na različite molekule akceptora, kao što je npr. glicerol.

Kinetički mehanizam ovako katalizirane enzimske reakcije može se opisati Ping Pong Bi Bi kinetikom, pri čemu se najprije supstrat (npr. saharoza) veže na slobodnu SPazu. Ping Pong ili dvostruka zamjena označava otpuštanje prvog produkta s enzima prije vezanja drugog supstrata (npr. fosfata), dok se Bi Bi kinetika odnosi na reakciju u kojoj sudjeluju dva supstrata,

kao što su npr. saharoza i fosfat, a kojom nastaju dva produkta, a u ovome slučaju bi to bili D-fruktoza i α -D-glukoza-1-fosfat (slika 1.).

Ovaj enzim ima visoku regiospecifičnost i eksperimentalno je potvrđeno da njegova aktivnost ne ovisi o kofaktorima ili kosupstratima (Goedl i sur., 2007).

Aktivnost SPaze okarakterizirana je u stanicama bakterija mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides*, kao i u stanicama bakterija *Pseudomonas saccharophila* i *Streptococcus mutans*. SPaza je izolirana i pročišćena iz ovdje pobrojanih bakterijskih stanica.

2.1.1. Primjena saharoza fosforilaze

Kod primjene SPaze, prvenstveno se misli na unaprijeđenu primjenu ovoga imobiliziranog enzima. Primjena imobilizirane SPaze ima brojne prednosti u odnosu na primjenu enzima u otopini. Imobilizacijom izoliranog i pročišćenog enzima povećava se ekonomičnost proizvodnog bioprocesa u kojem se koristi ovakav enzim. Proizvodnja enzima u otopini, koji je namijenjen jednokratnoj uporabi, treba imati nisku cijenu, kako bi se zadovoljila ekonomičnost cjelokupnoga bioprocesa. Imobilizacijom pročišćenog enzima na inertni nosač osigurava se lakša izolacija imobiliziranoga enzima iz reakcijske smjese, ali i veća stabilnost ovoga enzima, zatim jednostavnije je zaustaviti ovako katalizirane reakcije, a bioprocen se može voditi kontinuiranim postupkom. Međutim, imobilizacija izoliranog i pročišćenog enzima na/u inertni nosač može uzrokovati smanjenje njegove aktivnosti i to zbog samog postupka imobilizacije, ali i zbog fenomena prijelaza - ograničene difuzije supstrata do enzima kao i difuzije produkta u okolni prostor. Metode imobilizacije enzima mogu se podijeliti na fizikalne i kemijske metode. Fizikalne metode temelje se na (1) adsorpciji enzima na površinu nosača elektrostatskim silama te na (2) vezanju enzima u inertni nosač - matricu ili u mikro-kapsule. Kemijske metode obuhvaćaju unakrsno vezanje enzima u ili na nosač te kovalentno vezanje enzima na nosač (Datta i sur., 2013).

Valikhani i sur. (2017) razvili su mikroreaktor s imobiliziranom SPazom. Ovaj enzim je vezan na stijenke mikrokanalića u mikroreaktoru, koje imaju negativan naboj, i to preko posebno konstruirane poveznice, koja se sastoji od 58 aminokiselina (tzv. modul Z_{basic2}) s pozitivnim nabojem. Ovako imobiliziranom SPazom provedena je fosforoliza saharoze u prisutnosti fosfata do α -D-glukoza-1-fosfata. U usporedbi s monovalentnim vezanjem enzima u cilju njegove imobilizacije, multivalentno vezanje SPaze s dva Z_{basic2} modula rezultiralo je povećanom

aktivnosti imobiliziranog enzima. U ovome mikoreaktoru bez limitiranog prijenosa mase dobivene su izvrsna produktivnost i iskorištenje ovoga enzimskog procesa. Primjena ovakvih enzimskih mikoreaktora je od izuzetne koristi, posebice za imobilizaciju enzima niske specifične aktivnosti.

SPaza katalizira reakcije u kojima sudjeluju fosforilirani ugljikohidrati. Fosforilirane molekule ugljikohidrata čine važnu skupinu biomolekula i u ovu skupinu se pribrajaju međuspojevi metaboličkih puteva i signalne molekule, koje su izuzetno važne u fiziologiji istraživanih i već primijenjenih industrijskih mikroorganizama. Makromolekulske strukture stanica, pa tako npr. i genom, također su građene od fosforiliranih ugljikohidrata. Glukopiranozil glicerol (GG) je spoj koji se može izolirati iz stanica različitih mikroorganizama, a industrijski se proizvodi u enzimski kataliziranoj reakciji glikozilacije glicerola. Ovaj je glikozilirani visoko vrijedni spoj važan prvenstveno radi svoga hidratacijskog potencijala. Industrijski interesantnu glikozilaciju glicerola može katalizirati SPaza i to zbog svoje transglikozilacijske aktivnosti (Wildberger i sur., 2015; Klimaček i sur., 2020). Produkt ove reakcije - GG se koristi u brojnim kozmetičkim i medicinskim proizvodima (npr. hidratantnim kremama), a koristi se i kao niskokaloričan zaslađivač u različitim proizvodima u cilju prevencije karijesa. Osim SPaze, i drugi enzimi ovoga tipa - glikozid fosforilaze, imaju izuzetan potencijal za biotehnološku (enzimsku) proizvodnju visoko vrijednih glikoziliranih spojeva u industrijskom mjerilu (Bolivar i sur., 2017).

2.2. PRIMJENA ODABRANIH METODA MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE U EKSPRESIJI SAHAROZA FOSFORILAZE

2.2.1. Transformacija stanica bakterije *Escherichia coli* DH5 α i ekspresija proteina

Za ekspresiju heterolognih proteina u istraživačke i proizvodne svrhe, pa tako i za ekspresiju SPaze, najčešće se koriste metode kloniranja i ekspresije kodirajućih gena u različitim sojevima bakterije *Escherichia coli.*, npr. u soju *E. coli* DH5 α . Ovaj soj može koristiti glukozu, ali i trehalozu kao glavni izvor ugljika i energije (Selvarasu i sur., 2009). Prije toga je potrebno transformirati stanice bakterije *E. coli* odgovarajućim plazmidom, koji sadrži gen za SPazu.

Transformacija različitih sojeva Gram-negativne bakterije *E. coli* ciljanim DNA materijalom ovisi o kompetentnosti ovih sojeva za određeni tip transformacije, a koja je uglavnom posljedica uvjeta uzgoja ovih stanica, kao i uvjeta pri kojima se odvija transformacija

kompetentnih stanica *E. coli*. Bakterijski sojevi *E. coli* mogu se transformirati (i) s DNA bakteriofaga, koji transficira stanice, zatim (ii) genomskom DNA ili (iii) plazmidnom DNA. Transformacija sojeva *E. coli* plazmidom, koji sadrži i gen koji kodira enzim koji osigurava rezistenciju transformiranih stanica na određeni antibiotik, može se provesti u hranjivoj podlozi koja sadrži Ca^{2+} ione i to pri temperaturi između 0 i 5 °C uz izazivanje temperaturnog šoka (naglo povećavanje temperature do 37 - 42 °C), što uzrokuje permeabilizaciju ovih stanica i olakšava ulazak plazmidne DNA u permeabilizirane stanice. Uspješnost postupka transformacije stanica *E. coli* procjenjuje se na temelju broja poraslih kolonija transformiranih stanica na selektivnoj hranjivoj podlozi s odgovarajućim antibiotikom (Hanahan, 1983). Općenito, uspješnost transformacije stanica ovisi o dva parametra - (1) metodi za transformaciju (kemijska transformacija ili elektroporacija - tretman stanica elektrošokom visokog napona) i (2) genomu bakterijskog soja *E. coli*, koji se transformira. Izbor metode za transformaciju ovisi o karakteristikama stanica koje se transformiraju i o svrsi transformacije (Hanahan i sur., 1991).

U ovom istraživanju smo kemijskim postupkom transformirali stanice soja *E. coli* DH5 α plazmidnom DNA. Gen koji kodira za SPazu uspješno je insertiran u ciljani plazmid tako da su restrikcijom plazmida koji je sadržavao ovaj gen [pMiniT2-LmSPaza] i ciljanoga plazmida [pRST423_Ccw12_G] pripremljeni fragmenti koji su zatim ligirani u konačni plazmid. U ovim postupcima smo koristili restrikcijske enzime *Pst*I i *Not*I i T4 DNA ligazu.

Restrikcijski enzimi odnosno restrikcijske endonukleaze su proteini koji prepoznaju specifičnu, kratku sekvencu i cijepaju DNA molekulu isključivo u blizini ili unutar specifične relativno kratke DNA sekvence, koja se naziva restrikcijsko mjesto. Restrikcijski enzimi se mogu podijeliti u četiri tipa - I, II, III i IV. Restrikcijski enzimi Tipa I cijepaju DNA molekulu na mjestima dosta udaljenim od mjesta prepoznavanja, tip II cijepa DNA unutar ili na kratkim određenim udaljenostima od mjesta prepoznavanja, tip III reže molekulu DNA na mjestima koja su relativno malo udaljena od mjesta prepoznavanja, dok tip IV restrikcijskih endonukleaza prepoznaje i cijepa metiliranu, hidroksimetiliranu ili glukozil-hidroksimetiliranu modificiranu DNA (Anonymous 3, 2022). Krajevi DNA koji se dobiju nakon djelovanja restrikcijskih enzima mogu se spojiti djelovanjem enzima T4 DNA ligaze i na taj način se provodi *in vitro* rekombinacija različitih DNA molekula. Rekombinacija DNA fragmenata, osim kloniranja DNA fragmenata, omogućila je i manipulaciju genima i to tako da su promijenjene njihove regulatorne sekvence (Liu i sur., 1998).

Enzim *Pst*I prepoznaje heksamernu sekvencu ...5'CTGCA ∇ G3'....., dok *Not*I prepoznaje

oktamerni slijed baza sastavljen isključivo od G (gvanin) i C (citidin) baza 5'...GC▼GGCCGC...3'. Restriksijski enzim *XmnI*, koji se koristi za provjeru ispravne ligacije fragmenta koji sadrži gen za *LmSPazu* u plazmid pRST423_Ccw12_G, prepoznaje sekvencu 5'...GAANN▼NNTTC...3' te ju cijepa pri 37 °C u odgovarajućem puferu.

T4 DNA ligaza katalizira formiranje fosfodieterske veze između 5'-fosfatnih i 3'-hidroksilnih krajeva u dvostrukoj uzvojnici DNA i spaja ove fragmente s komplementarnim ili tupim krajevima. Međutim, ovaj enzim ne pokazuje aktivnost prema jednolančanim nukleinskim kiselinama. Aktivnost ove ligaze može se detektirati u prisutnosti ATP-a kao izvora energije u opisanoj enzimski kataliziranoj reakciji (Potapov i sur., 2018).

2.2.2. Ekspresija proteina u sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 i *Saccharomyces cerevisiae* SEY6210

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* pripada carstvu *Fungi*. Ovaj izuzetno važni tradicionalno primijenjeni industrijski mikroorganizam ima DNA veličine 12068 kb organiziranu u 16 kromosoma (Parapouli i sur., 2020). U potpunosti je sekvencioniran njegov genom i utvrđeno je da sadrži oko 6000 različitih gena. Kvasac *S. cerevisiae* je mikroorganizam koji se često koristi u istraživanjima, posebice kod ekspresije heterolognih proteina/enzima koji se posttranslacijski kovalentno modificiraju slično kao kod viših organizama. (Parapouli i sur., 2020). Komparativnom genomskom analizom utvrđeno je kako otprilike 40 % gena *S. cerevisiae* kodira za proteine, čija je primarna struktura očuvana i velikim djelom se podudara sa sekvencom najmanje jednog poznatog proteina čovjeka. Važno je napomenuti i da 30 % humanih gena, koji kodiraju proteine uključene u različite bolesti čovjeka, imaju ortologe u kvascu (Galao i sur., 2007). Svi sojevi *S. cerevisiae* sadrže mitohondrijsku DNA (mtDNA), ali se mogu razlikovati po njezinoj dužini (tj. broju parova baza, bp). Brojni sojevi *S. cerevisiae* sadrže i ekstrakromosomalnu dvolančanu DNA, zvanu „2 μ“ veličine 6318 bp. Ekstrakromosomalna dvolančana DNA „2 μ“ nema utjecaj na fenotip kvasca osim usporenog rasta stanica, a ima primjenu u genetičkom inženjerstvu. Neki ekstrakromosomalni DNA elementi, koji su identificirani u različitim sojevima *S. cerevisiae*, su jednolančana i dvolančana RNA molekula i retrovirusi (Parapouli i sur., 2020). Zbog značajne homologije gena kvasca *S. cerevisiae* i gena čovjeka, kao i visoke homologije osnovnih biokemijskih puteva u stanicama kvasca i čovjeka, brojna istraživanja provode se u ovome modelnom mikroorganizmu, kako bi

se proučili temeljni stanični procesi, kao što su mehanizmi popravka DNA, zatim translacija mRNA i njezina razgradnja, kao i stanični ciklus (Galao i sur., 2007).

S. cerevisiae izvrstan je modelni mikroorganizam, koji se osim u istraživanjima tradicionalno primjenjuje i u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji. Optimalna temperatura rasta *S. cerevisiae* kreće se između 28 °C i 30 °C. Aktivnost ovih stanica je zabilježena i u kiselom području, kao i tolerancija na relativno visoke koncentracije etanola i nisku koncentraciju kisika otopljenog u podlozi. *S. cerevisiae* ima relativno kratko generacijsko vrijeme, a može se razmnožavati spolno mejozom ili nesporno pupanjem. Karakteristike ovog industrijskog mikroorganizma omogućavaju relativno ekonomičan uzgoj i jednostavnu genetičku preinaku. Industrijska primjena *S. cerevisiae* poduprta je fiziološkom karakteristikom ovoga kvasca, koji je Crabtree-pozitivan. Tako *S. cerevisiae* u podlozi s visokom početnom koncentracijom izvora ugljika pri aerobnim uvjetima uzgoja, osim biomase, proizvodi i etanol, ali može proizvesti i druge industrijski relevantne spojeve. Dakle, ova fiziološka karakteristika *S. cerevisiae*, koji proizvodi etanol (a pri aerobnim uvjetima ga može i koristiti kao supstrat), se koristi kao njegova selektivna prednost. Naime, većina drugih mikroorganizama, koji mogu biti kompetitori pri uzgoju ovoga kvasca, znatno lošije podnose relativno visoke koncentracije etanola. *S. cerevisiae* karakterizira i mogućnost korištenja relativno visokih koncentracija ugljikohidrata iz hranjivih podloga i proizvodnja brojnih visoko vrijednih aromatičnih spojeva poput alkohola, aldehida, ketona i estera (Parapouli i sur., 2020).

U ovome radu korištena su dva soja *S. cerevisiae* - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210. *S. cerevisiae* BY4741 dio je seta delecijских sojeva izvedenih iz soja *S. cerevisiae* S288C. U *S. cerevisiae* BY4741 su deletirani određeni geni koji se često koriste kao markeri na uobičajenim vektorima, kako bi se minimizirala ili eliminirala homologija s odgovarajućim genima markerima u tim vektorima bez značajnog utjecaja na ekspresiju gena koji se prepisuju s istog promotora (Anonymous 1, 2022). Stanice ovog soja mogu koristiti različite izvore dušika, jer aktiviraju različite transportne mehanizme i različite puteve sinteze aminokiselina, što ovisi o izvoru dušika koji je dostupan u hranjivoj podlozi (Cohen i Engelberg, 2007).

S. cerevisiae SEY6210 laboratorijski je soj, koji se razlikuje od soja *S. cerevisiae* BY4741 jer ne pripada grupi S288C sojeva (Song i sur., 2016), a koji se koristi u istraživanjima ekspresije različitih proteina. U usporedbi sa sojem *S. cerevisiae* BY4741, kod *S. cerevisiae* SEY6210 je uočen sporiji rast, a osim toga ne sadrži invertazu i zbog toga ne može metabolizirati rafinozu.

Budući da se protein/enzim od interesa želi eksprimirati na površini stanica kvasca *S. cerevisiae*, potrebno je detaljnije poznavati staničnu stijenku ovoga eukariotskog mikroorganizma. Stanična stijenka *S. cerevisiae* čini 15 do 30 % suhe tvari stanice, a građena je pretežno od manoproteina i β -1,3-glukana te u manjoj zastupljenosti β -1,6-glukana i hitina. Na vanjskoj strani stijenke nalaze se glikozilirani manoproteini, koji imaju određeni naboj i ograničavaju propusnost stijenke za otopljene tvari iz okoline stanice (Lipke i Ovalle, 1998). Na taj način visoko glikozilirani manoproteini ostvaruju svoju strukturnu ulogu. Različita istraživanja pokazala su važna emulgirajuća i stabilizirajuća svojstva manoproteina stanične stijenke kvasca, što je posljedica amfipatske strukture ovih molekula (Martínez i sur., 2016).

Protein ScCcw12 glikozilirani je protein stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* (Klis i sur., 2014). Uočena je visoka ekspresija gena koji kodira za protein ScCcw12 i kod filamentozne gljive *Ashbya gossypii*, koja je taksonomski bliska kvascu *S. cerevisiae*, i to u razdoblju rasta micelija. Sekvenca *ScCCW12*, koji spada u skupinu tzv. glikozilfosfatidilinozitolnih (GPI) proteina stanične stijenke, je relativno kratka s tri mjesta za *N*-glikozilaciju. ScCcw12 ima važnu ulogu u održavanju integriteta stanične stijenke i njezine poroznosti, što je dokazano kod stanica s deletiranim genom za ovaj protein, koje su bile vrlo osjetljive na tretman određenim bojama (npr. fluorescentno plavom i Congo crvenom bojom) i kod kojih je uočen spori rast (Klis i sur., 2010).

U ovome radu cilj je bio eksprimirati protein/enzim SPazu na površini stanica kvasaca *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 i na taj način imobilizirati ovaj enzim, čija je aktivnost potrebna u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji visoko vrijednih glikoziliranih biokemikalija.

2.3. HIDROLIZA ŠKROBA DJELOVANJEM α -AMILAZE

Škrob je polimer sačinjen od amiloze i amilopektina i strukturno nedovoljno definiranih polimera D-glukozilnih podjedinica, a može se izolirati iz različitih biljaka, kao što su kukuruz, pšenica i riža. Za sada je još uvijek relativno jeftin i dostupan izvor ugljikohidrata za biotehnološku industrijsku proizvodnju (Robyt, 2009). Kukuruzni škrob je obično bijeli prah bez karakterističnoga okusa, koji se tradicionalno kao sirovina koristi u proizvodnji papira, zatim prehrambenoj industriji, kozmetičkoj i dentalno-farmaceutskoj industriji (Choulis, 2014). Kukuruzna močevina (eng. liquefied corn starch, LCS) predstavlja vrlo potentan supstrat u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji otapala - acetona i butanola. LCS se dobiva postupkom

mokrog mljevenja izvora škroba, a obično sadrži 35-40% suhe tvari i to u formi tzv. reducirajućih šećera i dekstrina (Ezeji i sur., 2007). Kod proizvodnje oligosaharida i glukoze iz škroba, granule škroba potrebno je želatinizirati, kako bi se dobio tzv. škrobni lijepak („klajster“), odnosno pasta. Da bi se to postiglo, u vodenu suspenziju škroba dodaje se α -amilaza, koja hidrolizira polimerne lance škroba do dekstrina relativno niske molekulske mase. Dekstrini s dekstroznim ekvivalentom (DE, broj D-glukozilnih podjedinica) između 3 i 25 komercijalno se industrijski proizvode i dodaju u različite biotehnološke proizvode, kako bi se, između ostaloga, poboljšala i njihova viskoznost (Featherstone, 2015).

Termostabilna α -amilaza (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaza, EC 3.2.1.1.), koja je korištena u ovdje opisanim eksperimentima, izolirana je iz bakterije *Bacillus licheniformis*. Ovaj enzim za sada ima najznačajniju primjenu u industriji škroba i to zbog svoje termostabilnosti. Naime, pri povišenim temperaturama hidrolize škroba ovim enzimom dolazi do proizvodnje oligosaharida srednje veličine (DP 3-25). Poboljšanja ovoga enzima u smislu njegove termostabilnosti i/ili aktivnosti direktno utječu na uvjete provedbe bioprocasa, njegovu provedivost kao i učinkovitost i ekonomičnost. Zbog svoje složenosti, koja se prvenstveno odnosi na strukturne promjene ovoga polimernoga supstrata, razgradnja škroba može se podijeliti u više različitih enzimski kataliziranih procesa. Ovdje smo se koncentrirali na proces koji bi se provodio djelovanjem α -amilaze izolirane iz bakterije *Bacillus licheniformis*, a koristi se za depolimerizaciju odnosno hidrolizu škroba do maltodekstrina i formiranje tzv. škrobnog lijepka. Nakon ovog primarnog koraka hidrolize škroba, primjenjuju se drugi različiti enzimi, ovisno o tome koji se konačni proizvod želi proizvesti.

Enzim α -amilaza katalizira reakciju hidrolize α -1,4-glikozidne veze između glukožilnih podjedinica, koje sačinjavaju amilozni i amilopektinski dio škroba. Ovaj enzim klasificiran je kao glikozid hidrolaza (GH) i svrstan u obitelj GH-13 (GH-13). Strukturna karakteristika α -amilaze jesu tri različite domene - A, B i C. Domenu A, koja ima karakterističnu $(\beta/\alpha)_8$ strukturu, u koju u trodimenzionalnoj strukturi proteina zadire nepravilna β -domena (domena B). Ova je druga domena (B) smještena između β -nabrane ploče i α -uzvojnice treće domene - domene C. Enzim α -amilaza iz bakterije *B. licheniformis*, osim izuzetnoga industrijskog značaja, važna je u istraživanjima, npr. u proteinskom inženjerstvu (Rivera i sur., 2003).

2.3.1. Primjena skenirajuće elektronske mikroskopije u praćenju hidrolize škroba

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) predstavlja važnu tehniku elektronske mikroskopije, koja omogućava detaljnu vizualizaciju molekula od interesa reda veličine 1 nm. Ova metoda koristi se u istraživanju površine različitih materijala i (makro)molekula. Priređeni uzorak izlaže se visokoenergetskim elektronima, čime se može dobiti niz informacija o topografiji, morfologiji, kemijskoj strukturi, sastavu, orijentaciji kao i kristalografskoj strukturi (makro)molekule (Akhtar i sur., 2018).

Osnovni princip metode SEM se temelji na interakciji upadnog snopa elektrona i priređenog uzorka. Upadni snop elektrona fokusira se u promjeru od nekoliko centimetara do nekoliko nanometara energijom između 100 eV i 30 keV. Upadni elektroni ulaze u interakciju s atomima priređenoga uzorka kroz elastično ili neelastično raspršenje. Elastično raspršenje karakterizira upad elektrona bez gubitka energije, dok neelastično raspršenje uključuje gubitak energije elektrona i to najčešće uslijed ionizacije atoma priređenoga uzorka. Ulazni elektroni se raspršuju u području priređenog uzorka i ovo se područje naziva interakcijski volumen. Detektirani su različiti tipovi signala koji se generiraju u interakciji ulaznoga snopa elektrona i priređenoga uzorka. Dva bitna signala su sekundarni elektroni (SE) i povratno raspršeni elektroni (eng. backscattered electrons, BSE). Sekundarni elektroni su elektroni atoma priređenoga uzorka, koji se otpuštaju uslijed ionizacije te ih karakterizira niska energija i otpuštanje samo s nekoliko desetaka nm površine priređenoga uzorka. SE doprinose formiranju kvalitetne slike površine priređenoga uzorka. BSE su zapravo upadni elektroni, koji su oslobođeni s površine priređenoga uzorka i više puta raspršeni. Snaga raspršenja, koja „vraća“ elektrone na površinu uzorka, ovisi o atomskom broju uzorka i zbog toga slika povratno raspršenih elektrona čini kompozicijski kontrast slike. SEM koristi različite tipove detektora kako bi se optimalno detektirali i prikazali analitički i slikovni modeli priređenoga uzorka (Joy, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Materijali

3.1.1.1. Mikroorganizmi, plazmidi i enzimi

3.1.1.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu koristili su se ovi mikroorganizmi: bakterijski soj *Escherichia coli* DH5 α i dva soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* - *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741, svi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemiju u Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (tablica 1.).

Tablica 1. Popis mikroorganizama koji su korišteni u ovom radu.

Mikroorganizam	Soj
Bakterijski soj	<i>Escherichia coli</i> DH5 α
Sojevi kvasca	<i>S. cerevisiae</i> BY4741
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> SEY6210

Gen koji kodira saharoza fosforilazu (SPaza) iz bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* (LmSPaza) je dobiven od *Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering, Graz University of Technology*, a izoliran je iz plazmida pMiniT2-LmSPaza (Prilozi). Ovaj gen je zatim insertiran u plazmid pRST423_Ccw12_G (Prilozi). Nakon toga, rezultirajućim plazmidom pRS_Ccw12LmSPaza, koji je konstruiran insercijom gena za LmSPazu u pRST423_Ccw12_G, transformirane su stanice *Escherichia coli* DH5 α , plazmid je umnožen i izoliran iz ovih stanica te su njime transformirane stanice dvaju sojeva kvasca *S. cerevisiae* - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 (Prilozi). Popis ovih plazmida dan je u tablici 2.

Tablica 2. Popis plazmida koji su korišteni u ovom radu.

Plazmid	Primjena
pMiniT2-LmSPaza	bakterijski plazmid iz kojega je izoliran gen za <i>LmSPazu</i>
pRST423_Ccw12_G	kvašćev plazmid u kojega je insertiran gen za <i>LmSPazu</i>
pRS_Ccw12LmSPaza	konstruirani kvašćev plazmid s genom za <i>LmSPazu</i> , koji je korišten za transformaciju dvaju sojeva kvasca <i>S. cerevisiae</i>

Shema sa svim postupcima, koji su doveli do transformacije ovih dvaju sojeva kvasaca, prikazana je u poglavlju 3.1.2. Metode (slika 2.A. i B.).

3.1.1.1.2. Plazmidi

3.1.1.1.2.1. Plazmid pMiniT2-LmSPaza

Plazmid pMiniT2-LmSPaza sadrži: (1) gen koji kodira protein *LmSPazu* s His₆-tagom (6 histina u nizu) na C-terminalnom kraju proteina, (2) afinitetni biljeg hemaglutinin (HA) tj. peptid od devet aminokiselina, koji odgovara aminokiselinama 98-106 HA virusa ljudske gripe, a koristi se za imunodetekciju, (3) ori (eng. origin of replication) - ishodište za samostalnu replikaciju plazmida unutar bakterijske stanice i (4) gen *bla*, koji kodira za beta-laktamazu - enzim koji hidrolizira amidnu vezu u beta-laktamskom prstenu npr. ampicilina (pa su stanice transformirane ovim plazmidom rezistentne na ovaj antibiotik kada je beta-laktamski antibiotik dodan u odgovarajuću selektivnu hranjivu podlogu). Ovim plazmidom transformirana je bakterija *Escherichia coli* DH5 α (poglavljje 3.1.2.2.), u kojoj je plazmid umnožen i nakon toga izoliran (poglavljje 3.1.2.3.). Iz izoliranog plazmida izrezan je gen za *LmSPazu* i ligiran u plazmid pRST423_Ccw12_G (poglavljje 3.1.2.8.).

3.1.1.1.2.2. Plazmid pRST423_Ccw12_G

Plazmid pRST423_Ccw12_G (Prilozi) sadrži (1) dva dijela gena *ScCCW12*. *ScCCW12* gen kodira za manoprotein stanične stijenke kvasca i ima ulogu u održavanju novosintetiziranih područja stanične stijenke, a lokaliziran je na krajevima manjih pupova kao i u području septuma većih pupova (Anonymous 4, 2022). Ovaj plazmid još obuhvaća (2) ori za samostalnu replikaciju plazmida unutar bakterijskih i kvašćevih stanica; zatim (3) gen *bla*, kao i (4) gen *HIS3*, koji je auksotrofni marker za transformirane kvasce. Naime, gen *HIS3* kodira imidazolglicerol-fosfat dehidratazu, koja katalizira šestu po redu reakciju u metaboličkom putu biosinteze histidina. Mutacija u ovome genu fenotipski se karakterizira kao auksotrofija prema histidinu i osjetljivost prema solima bakra, kobalta i nikla. Dakle, stanice kvasca *S. cerevisiae* uspješno transformirane s pRST423_Ccw12_G mogu rasti u podlogama bez dodane aminokiseline His.

Ovim plazmidom transformirana je bakterija *Escherichia coli* DH5 α u kojoj je plazmid umnožen i nakon toga izoliran (vidi poglavlja 3.1.2.2. i 3.1.2.3.). U izolirani se plazmid djelovanjem restrikcijskih enzima *PstI* i *NotI* i zatim T4 DNA ligaze (poglavlje 3.1.2.8.) insertirao gen za *LmSPazu* i tako je konstruiran plazmid pRS_Ccw12LmSPaza (poglavlje 3.1.1.1.2.3.).

3.1.1.1.2.3. Plazmid pRS_Ccw12LmSPaza

Plazmid pRS_Ccw12LmSPaza je formiran ligacijom gena za *LmSPazu* i fragmenta plazmida pRST423_Ccw12_G. Ovaj plazmid sadrži (a) dva dijela gena *ScCCW12* između kojih je insertiran gen koji kodira za *LmSPazu*, zatim (b) dio koji kodira za HA biljeg, (c) ori za samostalnu replikaciju u bakterijskoj i kvašćevoj stanici, (d) gen *bla* za selekciju transformiranih bakterija/kvasaca ovim plazmidom na hranjivoj podlozi s ampicilinom i (e) gen *HIS3*, koji služi kao auksotrofni marker za selekciju transformiranih kvasca na/u podlogama bez aminokiseline histidin. Ovako konstruiranim plazmidom transformirane su stanice bakterijskog soja *Escherichia coli* DH5 α , u kojoj je konstruirani plazmid umnožen i nakon toga izoliran (poglavlje 3.1.2.9.). Izoliranim plazmidom transformirane su stanice dvaju sojeva kvasca - *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741.

3.1.1.1.3. Enzimi i kitovi

Tablica 3. Popis svih enzima korištenih u radu.

Vrsta enzima	Enzim	Proizvođač
Restriksijski enzimi	<i>NotI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD
	<i>PstI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD
	<i>XmnI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD
Ligaza	T4 DNA ligaza	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD
Amilaza	α -amilaza, termostabilna	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
β -glukanaza	β -glukanaza (60 °C, pH 6,0 - 8,0)	NZYTech, Lisabon, Portugal

Tijekom izolacije plazmida korišten je kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) (poglavlje 3.1.2.3.), a za određivanje koncentracije izolirane plazmidne DNA iz agaroznog gela primjenjuje se Qubit 3.0 fuorometer i odgovarajući kit za određivanje koncentracije dvolančane DNA (Invitrogen, Life Technologies, USA) (poglavlje 3.1.2.7.).

3.1.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

3.1.1.2.1. Kemikalije

Tablica 4. Popis i porijeklo kemikalija korištenih u ovome radu.

Kemikalija	Proizvođač
Agar	Biolife, Milano, Italija
Agarozna	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD

Tablica 4. Popis i porijeklo kemikalija korištenih u ovome radu – *nastavak*.

Akrilamid (C ₃ H ₅ NO)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Amonij persulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , APS)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Ampicilin (C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S)	Roth, Karlsruhe, Njemačka
Anti-HA-antitijela	HRP Anti-HA tag antibody, Abcam, Cambridge, UK
Bakto-tripton	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Bisakrilamid (H ₂ C=CHCONH) ₂ CH ₂)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Boja za elektroforezu (Bromophenol Blue sodium salt)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Brom-fenol plavo	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Coomassie boja	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Destilirana voda	PBF SuZ
„DNA carrier“ jednolančana DNA	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
ECL (eng. enhanced chemiluminescence) otopina za razvijanje blota	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, SAD
Etidijev bromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Etilendiamintetraoctena kiselina (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , EDTA)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Glicin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Glukoza (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Difco Laboratories, Detroit, SAD
Histidin, uracil, leucin, triptofan i druge aminokiseline (tablica 8.)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Inozitol	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD

Tablica 4. Popis i porijeklo kemikalija korištenih u ovome radu – *nastavak*.

Izopropanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Jabučna (malatna) kiselina, C ₄ H ₆ O ₅	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Kalijev hidrogenfosfat (K ₂ HPO ₄) Kalijev dihidrogenfosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Kalijev klorid (KCl)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Kukuruzni škrob, topljiv	Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
YNB (eng. Yeast Nitrogen Base) hranjiva podloga	Biolife, Milano, Italija
Kvašćev ekstrakt	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Litijev acetat (CH ₃ COOLi, LiAc)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Metanol (CH ₃ OH)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Magnezijev klorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Magnezijev sulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Na-dodecilsulfat (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na, SDS)	Fluka, Buchs, Švedska
Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Natrijev karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Obrano mlijeko	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Njemačka
Octena kiselina (CH ₃ COOH)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Polietilen glikol (PEG)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD

Tablica 4. Popis i porijeklo kemikalija korištenih u ovome radu – nastavak.

Ponceau S boja	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Tetrametiletilendiamin (C ₆ H ₁₆ N ₂ , TEMED)	Serva, Heidelberg, Njemačka
Tris(hidroksimetil)aminometan [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂], TRIS]	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, SAD
Triton X-100 [C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n (n = 9-10)]	Fluka, Buchs, Švedska
β-merkaptioetanol (HOCH ₂ CH ₂ SH)	Fluka, Buchs, Švedska

3.1.1.2.2. Hranjive podloge

Hranjiva LB podloga za uzgoj stanica bakterijskog soja *Escherichia coli* DH5α.

Tablica 5. Sastav tekuće hranjive Luria-Bertani (LB) podloge za uzgoj *E. coli* DH5α.

Sastojak	γ [g/L]
Bakto-tripton	10,0
Kvašćev ekstrakt	5,0
Natrijev-klorid (NaCl)	5,0

U ovu se podlogu dodaje ampicilin u konačnoj koncentraciji od 0,1 mg/L (LB-Amp; koncentracija ampicilina u izvornoj otopini je 100 mg/mL). Čvrsta hranjiva LB-Amp podloga s agarom ima sastav kao tekuća LB-Amp hranjiva podloga uz dodatak agara u koncentraciji 15,0 g/L.

Hranjiva SOC podloga za transformaciju stanica *E. coli* DH5 α

Tablica 6. Sastav tekuće hranjive SOC (eng. Super Optimal broth with Catabolite repression) podloge za transformaciju stanica *E. coli* DH5 α .

Sastojak	γ [g/L]
Natrijev klorid (NaCl)	0,5844
Kalijev klorid (KCl)	0,1864
Magnezijev sulfat (MgSO ₄)	1,2037
Magnezijev klorid (MgCl ₂)	0,9521
Glukoza (C ₆ H ₁₂ O ₆)	3,6031
Bakto-tripton	20,0
Kvašćev ekstrakt	5,0

Hranjiva YNB podloga za uzgoj stanica sojeva *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210.

Tablica 7. Sastav tekuće hranjive YNB kemijski definirane podloge bez aminokiselina (YNB-AA) za uzgoj dvaju sojeva kvasca - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 (Anonymous 2, 2022).

Sastojak	γ [g/L]
YNB-AA	6,7
„drop-out“ smjesa (tablica 8.)	1,6
odgovarajući šećer	0,02
aminokiseline	prema auktotrofности

Odgovarajući šećer (glukoza, rafinoza ili galaktoza) koristi se u ovoj hranjivoj podlozi ovisno o soju kvasca *S. cerevisiae* koji se želi uzgojiti. Tako soj *S. cerevisiae* BY4741 karakterizira prisutnost invertaze i mogućnost metaboliziranja rafinoze, dok soj *S. cerevisiae* SEY6210 nema invertazu i zbog toga ne može metabolizirati rafinozu. Stoga smo u ovom istraživanju koristili glukozu (20,0 g/L) kao izvor ugljika i energije u hranjivoj YNB podlozi

prilikom uzgoja soja SEY6210. Ovi sojevi kvasca auksotrofni su mutanti za aminokiselinu histidin, koja se koristi za selekciju transformiranog soja, pa se histidin ne dodaje u YNB selektivnu podlogu.

Tablica 8. Sastav „drop-out“ smjese potrebne za pripremu 1 L „drop-out“ otopine.

sastojak	m [g]	sastojak	m [g]
adenin	3,0	metionin	2,0
arginin	2,0	fenilalanin	2,0
asparaginska kiselina	6,0	prolin	2,0
cistein	2,0	serin	6,0
glutamin	2,0	treonin	2,0
glutaminska kiselina	2,0	tirozin	2,0
glicin	2,0	valin	2,0
izoleucin	2,0	aminobenzojeva kiselina	0,2
asparagin	2,0	inozitol	2,0

Stanice obaju sojeva kvasca uzgojene su submerzno u hranjivoj YNB-AA podlozi uz dodatak smjese aminokiselina (0,16 g/L Leu; 0,08 g/L Trp; 0,08 g/L uracil), vitamina i inozitola (1,6 g/L „drop out“, tablica 8.) i glukoze (20,0 g/L). Ova smjesa sadrži sve potrebne aminokiseline za rast kvasca, ali bez aminokiseline potrebne za selekciju auksotrofnog transformiranog soja - histidina (poglavlje 3.1.2.11.).

3.1.1.2.3. *Puferi i otopine*

3.1.1.2.3.1. *Puferi i otopine za izolaciju stijenki stanica kvasca i SDS-PAGE*

Tablica 9. Sastav 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 8,0 i pH 6,0.

50 mM K-fosfatni pufer	Sastojak	m [g]
pH 8,0	K ₂ HPO ₄	16,512 g
	KH ₂ PO ₄	0,708 g

Tablica 9. Sastav 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 8,0 i pH 6,0 - *nastavak*.

	Demineralizirana voda	do 1 L
pH 6,0	K ₂ HPO ₄	0,1305 g
	KH ₂ PO ₄	1,598 g
	Demineralizirana voda	do 1 L

50 mM K-fosfatni pufer, pH 8,0 koristio se za uklanjanje ostataka tekuće hranjive YNB podloge sa stanica kvasca, a prije samog razbijanja stanica, kako je to opisano u poglavlju 3.1.2.12. Ovim su se 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 8,0 ispirale stijenke stanica kvasca nakon njihova razbijanja (poglavljje 3.1.2.12.) kao i talog stijenki nakon njihova tretmana natrijevim dodecil sulfatom (SDS-om; poglavljje 3.1.2.14.). Stijenke se i resuspendiraju u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 8,0. Pufer s pH 8,0 koristio se kod izolacije plazmidne DNA (poglavljje 3.1.2.3.), za ispiranje stanica kod izolacije staničnih stijenki kvasca (poglavljje 3.1.2.12.) i za ispiranje stijenki kvasaca (poglavljje 3.1.2.13.2.).

Tablica 10. Sastav 5x koncentriranog Laemmli pufera, koji se koristi tijekom izolacije nekovalentno vezanih proteina stijenki stanica sojeva *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741.

Sastojak	γ [g/L]
Tris(hidroksimetil)aminometan [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂ , TRIS]	150
Etilendiamintetraoctena kiselina [C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , EDTA]	19
Natrijev dodecil sulfat [NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ , SDS]	100
Brom-fenol plavo	0,005
β -merkaptioetanol [HOCH ₂ CH ₂ SH]	50

Laemmli pufer dodaje se talogu stijenki, nakon čega se dobivena smjesa kuha kroz 10 minuta u kipućoj vodenoj kupelji (poglavljje 3.1.2.13.1.) tijekom čega dolazi do izolacije nekovalentno vezanih proteina staničnih stijenki djelovanjem SDS-a.

Tablica 11. Sastav 10x koncentriranog TRIS-glicin pufera za SDS-PAGE.

Kemikalija	γ [g/L]
Tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂]	30
Glicin [C ₂ H ₅ NO ₂]	144
Natrijev dodecil sulfat (SDS) [NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄]	10

Otopina litijeva acetata priprema se tako da se 10,2 g litijeva acetata otopi u 100 mL demineralizirane vode, nakon čega se pripremljena otopina sterilizira u autoklavu pri 121 °C kroz 20 min pri tlaku od 1 atm. Ova se otopina koristi za tretman stanica kvasca tijekom transformacije kvasca *S. cerevisiae* (poglavlje 3.1.2.10.).

Tablica 12. Sastav Tris acetat-EDTA (TAE) pufera.

Kemikalija	γ [g/L]
Tris(hidroksimetil)aminometan [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂ , TRIS]	4,8454
Octena kiselina [CH ₃ COOH]	1,2010
Etilendiamintetraoctena kiselina [C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , EDTA]	0,2922

Tablica 13. Sastav TRIS-HCl pufera, pH 6,8, za gornji gel i TRIS-HCl pufera, pH 8,8, za donji gel za SDS-PAGE.

TRIS-HCl pufer	Kemikalija	γ [g/L]
pH 6,8	Tris(hidroksimetil)aminometan [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂ , TRIS]	16,8

Tablica 13. Sastav TRIS-HCl pufera, pH 6,8, za gornji gel i TRIS-HCl pufera, pH 8,8, za donji gel za SDS-PAGE - nastavak.

	Natrijev dodecil sulfat [NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ , SDS]	1,1
pH 8,8	Tris(hidroksimetil)aminometan [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂ , TRIS]	136,4
	Natrijev dodecil sulfat [NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ , SDS]	3,0

Odgovarajuća pH vrijednost pufera podesi se dodatkom HCl-a.

Tablica 14. Sastav gornjeg gela (gela za sabijanje) za SDS-PAGE.

Kemikalija	V [mL]
TRIS-HCl pufer, pH 6,8 (tablica 13.)	2,13
30% akrilamid [C ₃ H ₅ NO]	0,3
Tetrametiletilendiamin (TEMED) [C ₆ H ₁₆ N ₂]	0,005
Amonij persulfat (APS) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	0,0225

Tablica 15. Donji gel (gel za razdvajanje) za SDS-PAGE.

Kemikalija	V [mL ili µL*]
TRIS-HCl pufer, pH 6,8 (tablica 13.)	2,5
Akrilamid [C ₃ H ₅ NO]	2,5

Tablica 15. Donji gel (gel za razdvajanje) za SDS-PAGE - nastavak.

Demineralizirana voda	2,5
Tetrametiletilendiamin (TEMED) [C ₆ H ₁₆ N ₂]	5*
Amonij persulfat (APS) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	38*

10 %-tna otopina amonijeva persulfata [(NH₄)₂S₂O₈, APS] za SDS-PAGE priprema se otapanjem 100,0 g amonijeva persulfata u 1000 mL demineralizirane vode, a otopina 30 %-tnog akrilamida za SDS-PAGE za razdvajanje denaturiranih proteina priprema se otapanjem 300,0 g akrilamida i 8,0 bisakrilamida u 1000 mL demineralizirane vode. Pripremljene otopine steriliziraju se u autoklavu pri 121 °C kroz 20 min pri tlaku od 1 atm. Tako dobivene otopine koriste se za pripremu donjeg gela (tablica 15.) i gornjeg gela (tablica 14.) potrebnih za provedbu SDS-PAGE analize nekovalentno i kovalentno vezanih proteina stanične stijenke *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 (poglavlje 3.1.2.14.).

3.1.1.2.3.2. Puferi i otopine za Western blot

Tablica 16. Kemikalije potrebne za pripremu Na-karbonatnog pufera, pH 9,5, za Western blot.

Kemikalija	γ [g/L] ili V [mL]*
Natrijev hidrogenkarbonat [NaHCO ₃]	1,25
Natrijev karbonat [Na ₂ CO ₃]	0,4125
Metanol [CH ₃ OH]	250,0*

Tablica 17. Kemikalije potrebne za pripremu pufera za blokiranje (eng. blocking buffer) nitrocelulozne membrane kod provedbe Western blota.

Kemikalija	γ [g/L] ili V [mL]*
Tris(hidroksimetil)aminometan [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂ , TRIS]	6,0
Natrijev klorid [NaCl]	8,8
TRITON X-100 [C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n (n = 9-10)]	1,0*

Odgovarajuća pH vrijednost pufera podesi se dodatkom HCl-a.

3.1.1.2.3.3. Pufer za hidrolizu škroba

Tablica 18. Sastav 0,05 M malatnog pufera pH 6,0.

Kemikalija	V [mL]
0,2 M malat [C ₄ H ₆ O ₅]	25,0
0,2 M NaOH	do pH 6,0
Destilirana voda	do ukupnog volumena od 100 mL

3.1.1.3. Uređaji

1) UV-Vis spektrofotometar

U ovom je radu određena koncentracija plazmidne DNA u uzorcima dobivenim izolacijom plazmida iz stanica *E. coli* DH5 α (poglavlje 3.1.2.3.) određivanjem apsorbancije (A) pri valnoj duljini (λ) od 260 nm (A₂₆₀) i to uz korištenje NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Osim pri ovoj valnoj duljini svjetlosti, određena je i apsorbancija pri λ od 280 nm, kako bi se iz dobivenih omjera ovih vrijednosti (A_{260/280}) procijenila čistoća izolirane plazmidne DNA (maksimum

apsorbancije za proteine je pri λ od 280 nm). Važno je napomenuti da ovaj uređaj funkcionira po Lambert-Beer principu, ali s nešto manjom preciznošću od standardnih spektrofotometara.

2) Centrifuga

Izdvajanje biomase iz svježe uzgojenih suspenzija *E. coli* DH5 α za izdvajanje plazmida pMiniT2-LmSPaza i pRST423_Ccw12_G (poglavljje 3.1.2.2.), zatim izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela (poglavljje 3.1.2.6.), kao i izolacija stijenki i proteina stijenki transformiranih sojeva kvasca *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 (poglavljja 3.1.2.12. i 3.1.2.13.) te kod β -glukanaznog tretmana taloga stijenki (poglavljje 3.1.2.13.2.) koristila se centrifuga Eppendorf Minispin and MiniSpin Plus personal microcentrifuge (obje centrifuge Eppendorf SE, Hamburg, Njemačka).

3) Uređaj za Western blot

Denaturirani proteini stijenke transformiranih stanica sojeva *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 su iz poliakrilamidnog gela (poglavljje 3.1.2.14.) preneseni na nitroceluloznu membranu (Unisart nitrocelulozne membrane, Sartorius Croatia, Zagreb, Hrvatska) u uređaju za Western blot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, SAD).

4) Uređaj za detekciju proteina

Nakon provedenog postupka prijenosa proteina s agaroznoga gela na nitroceluloznu membranu (Unisart nitrocelulozne membrane, Sartorius Croatia, Zagreb, Hrvatska), proteini su detektirani i to tako da se ova nitrocelulozna membrana boji s bojom Ponceau S (tablica 4.; 0,1 % m/v) u 5 %-tnoj octenoj kiselini (tablica 4.), a potom vezanjem anti-HA antitijela, nakon čega se proteini vezani sa antitijelima vizualiziraju skeniranjem u uređaju C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, SAD).

Ostala oprema:

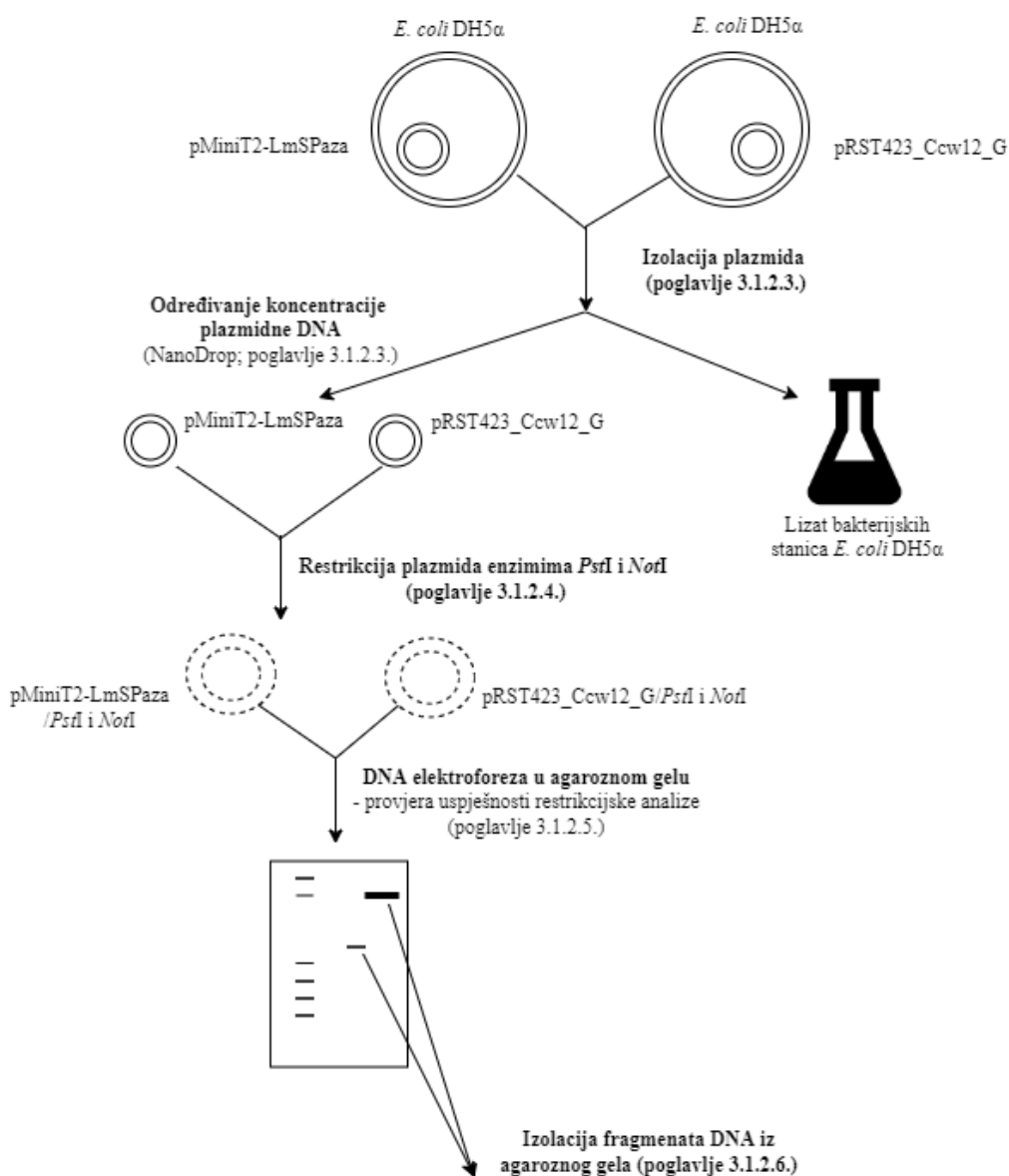
- Uređaj za SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, SAD);
- Laboratorijska vaga (Mettler P1210 Weighing Instrument, Watson Victor Ltd, New

South Wales, Engleska);

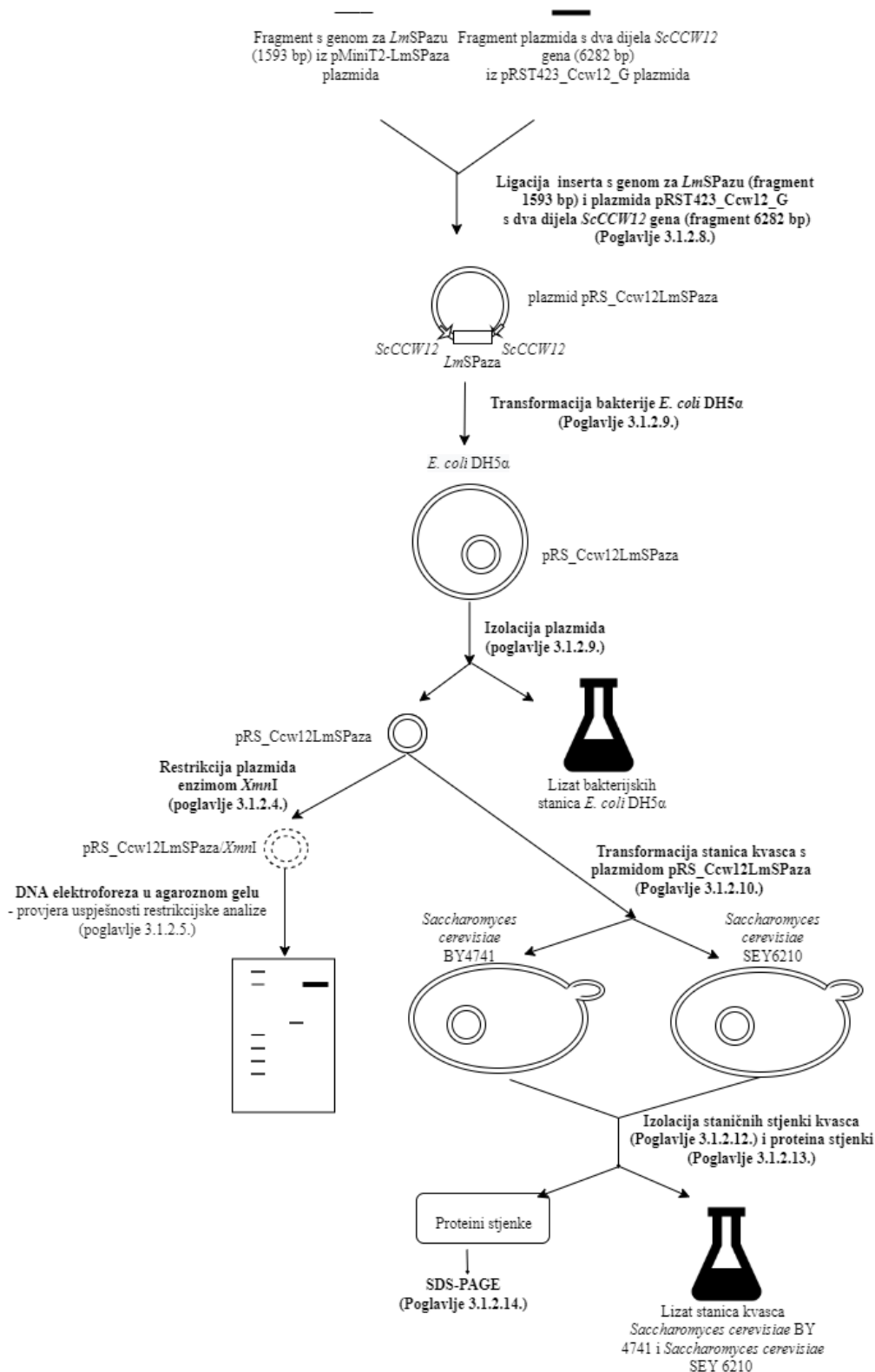
- Termoblok (Dry block thermostat, Bio TDB-100, BioSan, Riga, Latvija);
- Autoklav Sutjeska;
- Qubit 3.0 fluorometar (Invitrogen, Life Technologies, USA);
- BeadBug TM homogenizator (Benchmark Scientific, Inc., Sayreville, SAD);
- UVIDoc HD6 (Cleaver Scientific, Cambridge, UK);
- Digitalna orbitalna tresilica (CPS-350, PRO Scientific Inc, Willenbrock, SAD);
- Tresilica Incubation Shaker KS 3000i control (IKA-Werke GmbH & Co.KG., Staufen im Breisgau, Njemačka);
- SEM - visokovakumski pretražni elektronski mikroskop Vega3 LMH (Tescan, Češka Republika);
- Bunsenov plamenik (visina 16 cm sa sigurnosnim ventilom i regulatorom plamena, Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, Njemačka);
- Termomikser (Lab Dancer, Anton Paar, Graz, Austrija).

3.1.2. Metode

U okviru ovoga istraživanja preuzet je gen za *LmSPazu* iz plazmida pMiniT2-LmSPaza i insertiran u pRST423_Ccw12_G, čime je formiran konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza, načinjen za transformaciju stanica sojeva *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 u cilju ekspresije *LmSPaze* na površini stanica ovih kvasaca. Cjelokupni postupak shematski je prikazan na slici ovdje ispod (slika 2.A. i B.).



Slika 2.A. Shematski prikaz postupaka preuzimanja gena za *LmSPazu* iz pMiniT2-LmSPaza i analize restrikcijski dobivenih fragmenata DNA elektroforezom.



Slika 2.B. Shematski prikaz postupaka insertiranja gena u pRST423_Ccw12_G, konstrukcije pRS_Ccw12LmSPaze za transformaciju stanica sojeva *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 i analiza restriksijski dobivenih fragmenata DNA elektroforezom, te pripreme uzoraka za analizu proteina stijenke ovih dvaju sojeva.

3.1.2.1. Priprema svježih kultura bakterijskog soja *E. coli* DH5 α i sojeva kvasca *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 i čuvanje ovih kultura

Plazmid pMiniT2-LmSPaza čuvao se u *E. coli* DH5 α u hladnjaku pri temperaturi od -70 °C. Trajne kulture bakterijskog soja *E. coli* DH5 α kao i sojeva kvasca *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 čuvaju se u hladnjaku pri temperaturi od -70 °C.

Svježja kultura *E. coli* DH5 α pripremljena je otapanjem ove smrznute (-70 °C) trajne kulture na ledu i dodavanjem alikvota ove suspenzije stanica *E. coli* DH5 α (5 μ L) u tekuću hranjivu LB-Amp podlogu (10 mL; tablica 5.). Tekuća hranjiva LB-Amp podloga se nakon pripreme sterilizira u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i pretlaku od 1 atm tijekom 20 minuta. U ohlađenu LB podlogu za uzgoj stanica *E. coli* DH5 α sterilno se dodaje ampicilin u omjeru 1,0 μ L ampicilina (100 mg/mL) na 1,0 mL LB podloge, tako da je konačna koncentracija ampicilina u LB-Amp podlozi 0,1 mg/L.

Uzgoj bakterijskih stanica *E. coli* DH5 α u ovoj tekućoj podlozi s ampicilinom provedena je na tresilici (200 rpm) pri 37 °C preko noći. Ovako pripremljena suspenzija s poraslim bakterijskim stanicama *E. coli* DH5 α koristila se za kemijsku transformaciju (poglavlje 3.1.2.2.) plazmidima pMiniT2-LmSPaza, pRST423_Ccw12_G i pRS_Ccw12LmSPaza i to radi umnažanja ovih plazmida.

Nakon transformacije, kulture sojeva kvasaca *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 uzgojene su u tekućoj hranjivoj YNB podlozi bez histidina (tablica 7.). Prvi dio gena *ScCCW12* kodira za protein ScCcw12, koji omogućuje transport rekombinantnog proteina u staničnu stijenku, dok drugi dio gena *ScCCW12* kodira za dio proteina ScCcw12 koji omogućuje rekombinantnom proteinu LmSPazi da ostane vezan na vanjskoj površini stijenke kvasca. „Drop out“ smjesa se u tekuću hranjivu YNB podlogu dodaje prije sterilizacije (1,6 g „drop out“ smjese u 1000 mL tekuće YNB podloge). Zbog auksotrofnosti dvaju sojeva kvasca prije transformacije, u ovu hranjivu podlogu dodaje se His (0,08 g/L), zatim uracil (0,08 g/L), Leu (0,16 g/L) i Trp (0,08 g/L). Uzgoj kvasca u ovako priređenoj tekućoj podlozi provodi se na tresilici (200 rpm) pri temperaturi od 30 °C preko noći.

Tekuća hranjiva YNB podloga i otopina šećera (glukoza, rafinoza ili galaktoza; a u slučaju *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 - glukoza) steriliziraju se zasebno u autoklavu pri temperaturi 121 °C i pretlaku od 1 atm tijekom 20 minuta. Sterilizirana otopina ugljikohidrata (glukoza, 20 g/L) doda se naknadno u sterilnu hranjivu YNB podlogu i to neposredno prije naciepljivanja, tako da se postignu zadane konačne koncentracije sastojaka,

kako je prikazano u tablici 7.

Svježe priređene suspenzije stanica kvašćevih sojeva *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 koristile su se za transformaciju konstruiranim plazmidom pRS_Ccw12LmSPaza (poglavlje 3.1.2.10.).

3.1.2.2. Transformacija kemijski kompetentnih stanica *E. coli* DH5 α

Kemijski kompetentne stanice *E. coli* DH5 α transformirane su zasebno dvama plazmidima - pMiniT2-LmSPaza (Prilozi) i pRST423_Ccw12_G (Prilozi) s ciljem umnažanja ovih plazmida, kako je to prikazano na prethodnoj shemi (slika 2.A. i B.) i, nakon toga, izolacije ovih umnoženih plazmida [pMiniT2-LmSPaza i pRST423_Ccw12_G]. Alikvot kemijski kompetentnih stanica *E. coli* DH5 α (50 μ L), koje se čuvaju pri -70°C, otopi se na ledu (+4 °C) i u otopljeni alikvot doda se po 5 μ L izoliranog plazmida pMiniT2-LmSPaze ili pRST423_Ccw12_G. Dobivene suspenzije inkubiraju se na ledu kroz 30 minuta. Nakon ove inkubacije, izvodi se temperaturni šok stanica *E. coli* DH5 α i to premještanjem ovako priređene suspenzije sa +4 °C na temperaturu od 42 °C kroz 20 s. Nakon toga, suspenzija se vrati na led kroz naredne 3 min. Nakon temperaturnog šoka, po 100 μ L ovako dobivene suspenzije nacijepi se na čvrstu hranjivu LB-Amp podlogu i inkubira pri 37 °C preko noći.

Transformirane stanice *E. coli* DH5 α potrebno je uzgojiti u većem mjerilu radi potvrđivanja transformacije ovih bakterijskih stanica, umnažanja plazmida u *E. coli* DH5 α i izolacije umnoženih plazmida za transformaciju kemijski kompetentnih stanica kvasca *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210. Zbog toga se sterilnoj tekućoj LB podlozi (10 mL; poglavlje 3.1.2.1.) doda ampicilin (konačna koncentracija ampicilina 0,1 mg/L). Ovako pripremljena LB-Amp podloga raspodijeli se (po 5 mL) u dvije epruvete (Falcon Tubes, OMNILAB GmbH & Co. KG, Bremen, Njemačka) te se u jednu epruvetu dodaje alikvot stanica *E. coli* DH5 α transformiranih plazmidom pRST423_Ccw12_G (Prilozi), a u drugu se dodaje alikvot stanica *E. coli* DH5 α transformiranih plazmidom pMiniT2-LmSPaza (Prilozi). Dobivene suspenzije inkubiraju se na tresilici pri 37 °C i 200 rpm preko noći. Iz ovako svježe uzgojenih stanica izolirani su umnoženi plazmidi pRST423_Ccw12_G i pMiniT2-LmSPaza (ovdje ispod).

3.1.2.3. Izolacija plazmidne DNA iz stanica *E. coli* DH5 α

Princip. Bakterijske stanice koje sadrže plazmidnu DNA [pMiniT2-LmSPaza ili pRST423_Ccw12_G] se liziraju i tako se oslobađa plazmidna DNA iz *E. coli* DH5 α . Preostali sastojci lizata (proteini i genomska DNA) se ne vežu na membranu u kolonici za izolaciju i mogu se ukloniti ispiranjem membrane puferom, koji sadrži alkohol.

Postupak. Izolacija plazmidne DNA iz stanica *E. coli* DH5 α načinjena je pomoću kita NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Prekonoćna kultura *E. coli* DH5 α (1-5 mL) s plazmidom pMiniT2-LmSPaza ili pRST423_Ccw12_G (poglavlje 3.1.2.2.) prebaci se u epruvetu (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) i biomasa se izdvoji centrifugiranjem (11000 g kroz 30 s). Zatim se izdvojenim transformiranim stanicama doda 250 μ L 50 mM Tris-HCl pufera, pH 8,0, koji sadrži 10 mM EDTA i 100 μ g/mL RNaze A (A1 pufer) iz ovoga kita i stanice se resuspendiraju u ovom puferu (vorteks Lab Dancer, Anton Paar, Graz, Austrija). U tako dobivenu suspenziju doda se 250 μ L pufera za liziranje (1% m/v SDS alkalni pufer s 200 mM NaOH, pH 12,8; A2 pufer iz ovoga kita) te se suspenzija promiješa okretanjem Eppendorf epruvete i zatim inkubira pri sobnoj temperaturi kroz 5 min i to sve dok lizat tj. suspenzija postane bistra. U suspenziju se zatim dodaje 300 μ L pufera za neutralizaciju (3,0 M K-acetatni pufer, pH 5,0; A3 pufer iz kita) te se cjelokupni sadržaj promiješa okretanjem Eppendorf epruvete i to dok se plavo obojena suspenzija ne obezboji. Tako priređena suspenzija centrifugira se pri 11000 g kroz 5 min. Volumen dobivenoga supernatanta od 700 μ L prenese se na kolonu za izolaciju plazmidne DNA (kolona sa silikonskom membranom iz kita) i sadržaj kolone se centrifugira pri 11000 g kroz 1 min. Filtrat se odbaci, dok se na kolonu s vezanom plazmidnom DNA dodaje 500 μ L pufera za ispiranje (36-50 % gvanidin hidroklorid s 20-35 % 2-propanola, pufer AW iz kita) i sve zajedno se centrifugira pri 11000 g kroz 1 min. Filtrat se odbaci, dok se na kolonu tj. membranu kolone doda 600 μ L pufera za ispiranje [1,0 M NaCl u 50 mM MOPS (3-morfolinopropan-1-sulfonska kiselina), pH 7,0, s 15 % w/w izopropanola; A4 pufer iz kita]. Centrifugiranjem (11000 g kroz 1 min) se izdvoji filtrat, dok se membrana s plazmidnom DNA dodatno osuši narednim centrifugiranjem pri istim uvjetima. Nakon toga, membrana se prebaci u novu sterilnu Eppendorf epruvetu i na membranu se doda 50 μ L 5 mM Tris-HCl pufera, pH 8,5 (eluacijskog pufera ili AE pufera iz kita) i to tako da se ovaj pufer doda na sredinu membrane. Sustav se inkubira pri sobnoj temperaturi kroz 1 min. Nakon toga se dobivena otopina plazmidne DNA izdvoji centrifugiranjem (11000 g kroz 1 min). Ovako izolirana plazmidna DNA se može

čuvati pri -20 °C. Koncentracija izolirane plazmidne DNA odredi se mjerenjem apsorbancije ove otopine pri λ od 260 nm i usporedi s apsorbancijom pri λ od 280 nm, radi procjene čistoće izolirane plazmidne DNA (poglavlje 4.1.1.; tablica 19.).

3.1.2.4. Restrikcija plazmida pMiniT2-LmSPazu i pRST423_Ccw12_G

Koncentracija plazmidne DNA odredi se kako je to opisano u poglavlju 3.1.2.3. (NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer; Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) kako bi se odredila koncentracija plazmidne DNA potrebna za daljnje postupke. Poznata koncentracija plazmidne DNA koristi se pri proračunu komponenti restriksijske smjese (poglavlje 3.1.2.3.) tj. njihova volumena. Najprije su plazmidi tretirani *NotI* enzimom, jer ovaj enzim cijepa pMiniT2-LmSPazu unutar dva restriksijska mjesta. *NotI* cijepa i plazmid pRST423_Ccw12_G i to u području gena koji kodira za protein ScCcw12, unutar kojeg se kasnije može inserirati gen koji kodira za *LmSPazu*. U zasebne Eppendorf epruvete od 1,5 mL dodaje se odgovarajući volumen otopine izoliranog plazmida (ovisno o koncentraciji plazmidne DNA), 4 μ L rCutSmart pufera (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, SAD), 5 μ L destilirane vode i 1 μ L enzima *NotI* (10000 U/mL; tablica 3.). Restriksijska smjesa inkubira se kroz 1 sat pri 37 °C. Nakon inkubacije *NotI* inaktivira se u termostatu izlaganjem temperaturi od 80 °C kroz 20 minuta. Nakon toga su plazmidi tretirani *PstI* enzimom. Enzim *PstI* cijepa plazmid pRST423_Ccw12_G na način da se dobije fragment veličine 9 bp i fragment od interesa veličine 6282 bp. Restriksijski enzim *PstI* cijepa i plazmid pMiniT2-LmSPazu, nakon cijepanja s enzimom *NotI*, tako da se dobije izdvojeni fragment koji sadrži gen za *LmSPazu* s His₆-tag-om i afinitetnim biljekom (HA). Iz restriksijske smjese s inaktiviranim enzimom *NotI* izuzme se 37 μ L ove smjese i doda joj se 0,5 μ L rCutSmart pufera (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, SAD), 6,5 μ L destilirane vode i 1 μ L restriksijskog enzima *PstI* (20000 U/mL; tablica 3.).

Nakon ligacije gena u plazmid, izolirani plazmid se cijepa enzimom *XmnI*, kako bi se provjerila pravilna insercija ovoga gena tj. utvrdila veličina fragmenata koji se dobiju nakon djelovanja ovoga restriksijskog enzima. U 5 μ L otopine plazmida dodaje se 1 μ L rCutSmart pufera (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, SAD), 3 μ L destilirane vode i 1 μ L enzima *XmnI* (20000 U/mL; tablica 3.), kako bi se provjerila uspješnost ligacije inserta, koji sadrži gen za *LmSPazu* u plazmid pRST423_Ccw12_G između dva dijela gena *ScCCW12*, jer enzim *XmnI* cijepa konačni konstrukt pRS_Ccw12LmSPazu na tri fragmenta poznate duljine. Restriksijska

mjesta za tri enzima - *NotI*, *PstI* i *XmnI* u plazmidima pMiniT2-LmSPaza i pRST423_Ccw12_G prikazana su na slikama u poglavlju Prilozi.

3.1.2.5. DNA elektroforeza

Princip. Elektroforezom u gelu mogu se razdvojiti fragmenti DNA prema njihovoj veličini. DNA iz uzoraka, koja ima negativni naboj, u električnom polju migrira od katode prema anodi. Brzina migracije DNA proporcionalna je veličini ovih molekula s pripadajućim nabojem. Manji fragmenti DNA pomiču se brže prema dnu gela tj. anodi u odnosu na veće fragmente. Vizualizacija DNA provodi se dodatkom interkalirajuće boje (etidijeva bromida) u gel. DNA fragment veže boju, a osvjjetljenje gela ultraljubičastim svjetlom uzrokuje fluoresciranje boje tj. DNA molekule s interkaliranim etidijevim bromidom.

Postupak. Gel za elektroforezu priprema se suspendiranjem 0,3 g agaroze u 30 mL 1x Tris acetat-EDTA (TAE) pufera (tablica 12.) i zagrijavanjem do vrenja, nakon čega se suspenzija ohladi do oko 60 °C i izlijeva u kalup s češljicom. Formirani gel se stavlja u uređaj za gel elektroforezu i uroni u TAE pufer, a uzorci se nanese u jažice gela. Uzorci se prethodno pripreme miješanjem 9 µL boje za elektroforezu (Bromophenol Blue sodium salt; tablica 4.) s 1 µL svakoga uzorka. DNA elektroforeza se provodi kroz 40 minuta pri naponu od 85 V. Razdvojene DNA molekule se vizualiziraju pomoću uređaja UVIDOC HD6 (Cleaver Scientific, Cambridge, UK).

3.1.2.6. Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela

Fragment od interesa se izreže iz agaroznog gela i oprezno prenese u prethodno pripremljenu i izvaganu Eppendorf epruvetu. Izvaži se masa ove epruvete s fragmentom i iz razlike masa (epruveta s fragmentom i prazna epruveta) izračuna se masa gela s fragmentom. Za svakih 30 mg mase izrezanog gela dodaje se 60 µL Macherey-Nagel NTI pufera (pH 5,0-6,0) i ovako dobivena smjesa se inkubira pri 50 °C kroz 10 minuta uz povremeno miješanje smjese u Eppendorf epruveti (Dry block thermostat, Bio TDB-100, BioSan, Riga, Latvija). Otopljena smjesa nanosi se na NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kolonu (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) i centrifugira pri 11000 g kroz 30 sekundi. Filtrat se odbaci, a ova kolona se vrati u epruvetu za prikupljanje DNA te se na membranu dodaje 700 µL NT3 pufera (NucleoSpin Gel

and PCR Clean-up; Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Ovako priređeni uzorak se centrifugira (11000 g kroz 30 s). Filtrat se odbaci, a membrana kolone se suši centrifugiranjem pri 11000 g kroz 1 min. Zatim se kolona s membranom prebacuje u čistu Eppendorf epruvetu, na membranu se doda 30 μ L NE pufera za eluciju DNA (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up; Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) te se epruveta s kolonom inkubira pri sobnoj temperaturi kroz 1 min, nakon čega se filtrat izdvoji centrifugiranjem (11000 g kroz 1 min). Izoliranoj DNA prvo se odredi koncentracija (poglavlje 3.1.2.7.), a nakon određivanja koncentracije provodi se postupak ligacije fragmenata DNA od interesa (poglavlje 3.1.2.8.).

3.1.2.7. Određivanje koncentracije DNA

Princip. Qubit 3.0 fluorometar (Invitrogen, Life Technologies, USA) je uređaj kojim se može odrediti intenzitet fluorescencije određenih spojeva u cilju određivanja koncentracije nukleinskih kiselina (DNA i RNA) ili proteina u uzorku. Naime, ukoliko se spojevi koji fluoresciraju specifično vežu na molekulu od interesa, npr. dvolančanu ili jednolančanu DNA, RNA ili protein, može se odrediti koncentracija ovih makromolekula u uzorku. Fluorescentne boje slabo fluoresciraju i ovaj se intenzitet fluorescencije povećava ukoliko se ove boje vežu na određenu (makro)molekulu. Nakon vezanja fluorescirajuće boje (npr. PicoGreen ili Qubit), na npr. DNA, koje se odvija unutar par sekundi, ovaj kompleks intenzivno fluorescira i intenzitet fluorescencije je proporcionalan koncentraciji DNA u otopini. Qubit 3.0 fluorometar je kalibriran i odgovarajući fluorescentni signal konvertira u koncentraciju DNA prema standardima DNA poznate koncentracije.

Postupak. Radna otopina za određivanje koncentracije DNA pripremi se miješanjem Qubit reagensa s Qubit puferom u omjeru 1:200, prema uputama proizvođača (Invitrogen, Life Technologies, USA). Potrebno je prirediti otopine standarda DNA, kontrolu kao i otopine uzoraka. Tako se u optički prozirne kivete za standard dodaje 190 μ L radne otopine i 10 μ L pojedinog standarda - plazmidne DNA (Qubit 3.0 fuorometer kit). U kivete za uzorke dodaje se po 2 μ L uzorka i 198 μ L radne otopine. U kivete za kontrolu dodaje se 5 μ L radne otopine i 195 μ L Qubit pufera. Sadržaj u kivetama se lagano promiješa na termomikseru i inkubira kroz 2 minute pri sobnoj temperaturi. Zatim se kivete umetnu u fluorometar i očita se dobivena fluorescencija. Iz baždarnog dijagrama ovisnosti fluorescencije o koncentraciji DNA odredi se koncentracija DNA u uzorcima.

3.1.2.8. Ligacija inserta s genom za *LmSPazu* i plazmida *pRST423_Ccw12_G* i konstrukcija *pRS_Ccw12LmSPaza* za transformaciju stanica kvasca

Ligacija fragmenta veličine 1593 bp iz plazmida pMiniT2-LmSPaze, koji sadrži gen za *LmSPazu*, i fragmenta veličine 6282 bp iz plazmida pRST423_Ccw12_G provedena je primjenom T4 DNA ligaze (M0202, tablica 3.). Reakcijska smjesa dobiva se miješanjem 2 µL 10 x DNA pufera za ligaciju, zatim 2,63 µL pRST423_Ccw12_G fragmenta veličine 6282 bp; 4,53 µL fragmenta s genom za *LmSPazu* iz plazmida pMiniT2-LmSPaza veličine 1593 bp; 1 µL T4 DNA ligaze i 9,84 µL demineralizirane vode, sve do ukupnog volumena od 10,16 µL. Dobivena reakcijska smjesa inkubira se preko noći pri sobnoj temperaturi i, nakon toga, koristi za transformaciju stanica *E. coli* DH5α.

3.1.2.9. Transformacija stanica *E. coli* DH5α konstruktom *pRS_Ccw12LmSPaza*

U suspenziju stanica *E. coli* DH5α (50 µL) doda se 5 µL ligacijske smjese (poglavlje 3.1.2.8.) i sve zajedno inkubira kroz 30 minuta na ledu. Zatim se Eppendorf epruveta sa ovom suspenzijom prebaci u termostat kroz 20 s pri 42 °C, kako bi se izazvao temperaturni šok za stanice *E. coli* DH5α i, nakon toga, suspenzija se ostavi na ledu kroz naredne 3 min. U ovu se smjesu potom doda 950 µL SOC (tablica 6.), koji je prethodno zagrijan do 37 °C. Sve zajedno se inkubira kroz 1 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, smjesa se naciepljuje na LB-Amp agar i inkubira pri 37 °C kroz 24 h. Zatim se uzima jedna porasla kolonija transformirane *E. coli* DH5α i naciepi se u tekuću LB-Amp podlogu te se inkubira pri 37 °C kroz 24 sata. Iz ovako uzgojene svježe kulture transformirane *E. coli* DH5α izoliran je plazmid (poglavlja 3.1.2.3. - 3.1.2.7.) za transformaciju stanica kvasca (poglavlje 3.1.2.10.).

3.1.2.10. Transformacija stanica kvasca *LiAc* metodom

U ovome istraživanju korištena su dva soja kvasca *S. cerevisiae* za ekspresiju *LmSPaze* - *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741.

Sojevi su uzgojeni u 10 mL sterilne kompletne hranjive tekuće YNB podloge do logaritamske faze rasta ($OD_{600} \sim 2$ AU). Centrifugiranjem (3000 g kroz 5 min) se izdvoje stanice kvasca te se dobiveni talog stanica resuspendira u 5,0 mL sterilne destilirane vode i nanovo

centrifugira (3000 g kroz 5 min). Potrebno je izdvojiti oko 5,0 OD₆₀₀ jedinica suspenzije pri čemu 1,0 OD₆₀₀ odgovara 1×10^7 stanica kvasca/mL. Talog stanica se resuspendira u 1,0 mL 0,1 M LiAc i prenosi u sterilnu Eppendorf epruvetu. Sadržaj Eppendorf epruvete centrifugira se (8000 g kroz 30 s), a supernatant se ukloni. Stanicama se doda 240 µL 50 %-tnog polietilen glikola (PEG), 36 µL 1,0 M LiAc, 25 µL jednolančane DNA („DNA carrier“; tablica 4.), 50 µL otopine plazmida koja sadrži 1 µg konstruiranog plazmida (pRS_Ccw12LmSPaze; Prilozi). Priređena smjesa se homogenizira (vorteks Lab Dance, Anton Paar, Graz, Austrija) otprilike 1 min i zatim inkubira pri 30 °C kroz 30 min (Dry block thermostat, Bio TDB-100, BioSan, Riga, Latvija). Nakon inkubacije, transformacijska smjesa izlaže se temperaturnom šoku na način da se inkubira u termobloku 20 min pri 42 °C, centrifugira (8000 g kroz 15 s) te se ukloni sav supernatant. Stanice se resuspendiraju u 1,0 mL sterilne vode i ovako transformirane stanice sojeva *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 se naciepe na čvrstu selektivnu YNB-AA hranjivu podlogu bez histidina i inkubiraju pri 30 °C do porasta kolonija.

3.1.2.11. Uzgoj transformiranih stanica sojeva kvasca *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741

Transformirane stanice su naciepljene na čvrstu selektivnu YNB hranjivu podlogu, kako je to opisano u prethodnom poglavlju. Nakon toga, ove su stanice naciepljene u tekuću YNB hranjivu podlogu i inkubirane pri 30 °C, 200 rpm preko noći. Broj poraslih stanica sojeva *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 odredi se iz optičke gustoće suspenzije pri 600 nm (OD₆₀₀; spektrofotometar, UV-Vis Spektrofotometar Genesys 10S, Thermo Scientific). Najprije se priredi prvo decimalno razrjeđenje porasle suspenzije (10^{-1}) i to tako da se u 2700 µL demineralizirane vode dodaje 300 µL suspenzije transformiranih stanica *S. cerevisiae* BY4741 ili *S. cerevisiae* SEY6210 i tako priređenoj suspenziji odredi OD₆₀₀ i to u dva paralelna mjerenja. Dobivena vrijednost apsorbancije pomnoži se s razrjeđenjem otopine i time se dobiva broj OD₆₀₀ jedinica. Jedna OD₆₀₀ jedinica predstavlja otprilike 1×10^7 stanica/mL. Iz dobivenih vrijednosti OD₆₀₀ izračuna se koliki volumen suspenzije stanica se treba dodati u 50 mL tekuće YNB hranjive podloge bez fosfata (tablica 7.). Tako npr. ukoliko je OD₆₀₀ 1,35 AU i 2,13 AU; potrebno je dodati 4,22 mL suspenzije transformiranih stanica soja *S. cerevisiae* BY4741 i 3,93 mL transformiranih stanica soja *S. cerevisiae* SEY6210 u 50 ml tekuće YNB hranjive podloge bez fosfata, kako bi se postigla početna vrijednost OD₆₀₀ od 0,5 AU. Priređena suspenzija se

inkubira na tresilici (200 rpm) pri 30 °C preko noći do OD₆₀₀ 2-4 AU. Nakon toga se iz uzgojenih stanica mogu izolirati stanične stijenke (poglavlje 3.1.2.12.).

3.1.2.12. Izolacija staničnih stijenki kvasaca

Transformirane stanice kvasaca *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 uzgojene su i to u volumenu od 50 mL tekuće YNB hranjive podloge bez fosfata u Erlenmeyer tikvici pri 30 °C preko noći. Stanice su izdvojene centrifugiranjem (3000 g kroz 5 min) i isprane dva puta s po 30 mL destilirane vode i nanovo izdvojene centrifugiranjem. Nakon toga, ovako dobivene stanice su dva puta isprane 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 8,0 (tablica 9.) uz centrifugiranje (3000 g kroz 5 min). U suspenziju stanica u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 8,0 ($V \sim 10$ ml) dodaju se staklene kuglice i ovako priređene stanice se razbiju pomoću BeadBug™ homogenizatora (4000 g kroz 3 min). Dobivena smjesa se prebacuje u Eppendorf epruvete (1,5 mL) kako bi se iz nje centrifugiranjem odvojile staklene kuglice. Nakon toga se iz dobivene smjese izdvajaju stijenke stanica kvasca od unutarstaničnog sadržaja (8000 g kroz 1 min). Ovako izdvojene stijenke su isprane četiri puta s po 1,0 mL 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 8,0, i dobivena suspenzija je tretirana SDS-om (poglavlje 3.1.2.13.1.)

3.1.2.13. Izolacija proteina stijenki

3.1.2.13.1. Izdvajanje nekovalentno vezanih proteina staničnih stijenki kvasaca SDS tretmanom

Izdvojenim stijenkama stanica kvasaca *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741 dodano je 1,0 mL Laemmli pufera (tablica 10.) i ovako priređena suspenzija je kuhana kroz 10 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon toga, iz suspenzije je centrifugiranjem (8000 g tijekom 2 min) izdvojen supernatant, u kojem se nalaze nekovalentno vezani proteini stanične stijenke, i spremljen na -20 °C. Preostali talog je ispran četiri puta s 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 8,0.

3.1.2.13.2. Izdvajanje kovalentno vezanih proteina staničnih stijenki kvasaca primjenom β -glukanaze

Nakon ispiranja 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 8,0, preostali dio stijenki kvasaca se jednom ispere 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 6,0, i, nakon centrifugiranja (8000 rpm, 2 min), resuspendira u svježih 50 μ L 50 mM K-fosfatnog pufera pH 6,0, i ovoj se smjesi doda 2 μ L β -glukanaze (tablica 3.). Ovaj enzim katalizira hidrolizu β -glukana čije su građevne podjedinice povezane β -glikozidnom vezom u staničnoj stijenci kvasaca i tako omogućava solubilizaciju proteina stanične stijenke, koji su kovalentno vezani na beta-glukan. Nakon dodatka β -glukanaze, smjesa je inkubirana pri 55 °C tijekom 2 h i zatim je supernatant, koji sadrži izolirane proteine staničnih stijenki kvasaca, izdvojen centrifugiranjem (8000 rpm, 2 min) i spremljen pri -20 °C.

3.1.2.14. SDS-PAGE

Nekovalentno (poglavlje 3.1.2.13.1.) i kovalentno (poglavlje 3.1.2.13.2.) vezani proteini staničnih stijenki *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741, koji su transformirani konstruktom pRS_Ccw12LmSPaza, analizirani su natrij dodecil sulfat - poliakrilamidnom gel elektroforezom (prema eng. Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Uzorci proteina (1 – 1,4 μ L) su denaturirani dodatkom 5x koncentriranog Laemmli pufera (12,5 μ L; tablica 10.). SDS denaturira i linearizira proteine i vezanjem na protein osigurava negativni ukupni naboj proteina. U suprotnom slučaju, zbog razlike u naboju i obliku (nelineariziranih) proteina, vrpce proteina ne bi bile tako jasno i jednoznačno odijeljene.

Stakla za pripremu gela za SDS-PAGE se isperu u destiliranoj vodi i 70%-tnom etanolu i osuše. Zatim se manje staklo postavi na odstojnik većeg stakla te se zajedno postavljaju u nosač. Nosač se postavi na prozirni stalak s gumom, koja je prethodno dobro očišćena od ostataka poliakrilamida te se nosač učvrsti pomoću kvačice na vrhu prozirnog stakla. Zatim se priredi gel za razdvajanje (donji gel; tablica 15.). Najprije se pomiješa destilirana voda (12,5 mL); 1,126 M Tris-HCl pufer, pH 8,8, za donji gel (gel za razdvajanje; tablica 15.) i 30%-tni akrilamid (0,3 mL) u samostojećoj Falkon epruveti te se u ovu smjesu brzo jedan iza drugog dodaju TEMED (10 %, 0,005 mL) i APS (10 %, 0,0225 mL). Ovako priređena smjesa se dobro izmiješa i odmah se nanese između stakala. Nanese se oko 3,0 mL donjeg gela (gel za razdvajanje), a potom se

doda izopropanol (1 mL, tablica 4.) tako da se spriječi kontakt gela sa kisikom (kisik je inhibitor polimerizacije poliakrilamida) i ostavi se pri sobnoj temperaturi kroz 45 min da donji gel polimerizira. Nakon toga se filter papirom ukloni preostali izopropanol i pripremi smjesa za gornji gel (gel za sabijanje, tablica 14.) i nanosi se na donji gel. Odmah se u gornji gel umetne češljic za formiranje jažica. Tako priređen gel ostavi se da polimerizira kroz 30 min pri sobnoj temperaturi. Stakla s pripremljenim gelovima izvuku se iz nosača i stavljaju se u nosač s elektrodama, tako da su manja stakla okrenuta prema unutrašnjosti nosača. U jednu jažicu gela doda se standard s proteinima poznatih molekulskih masa (eng. Low Molecular Weight protein standard, LMW Protein Marker-1, Immuno-Biological Laboratories, Inc., Minneapolis, SAD), a u preostale jažice uzorci izoliranih proteina staničnih stijenki kvasaca. SDS-PAGE proveden je u TRIS-glicin puferu, pH 6,8, za SDS-PAGE, s 0,1 % SDS (tablica 11.) pri naponu od 180 V tijekom 2 h. Nakon elektroforeze, vrpce proteina su vizualizirane Coomassie bojom (Brilliant Blue R Concentrate, metanolna otopina, tablica 4.) i načinjena je slika gela u uređaju UVIDoc HD6.

3.1.2.15. Western blot

Identifikacija ciljanog proteina Western blot metodom zahtijeva nekoliko pripremnih postupaka, kako slijedi. Prije provođenja Western blot metode potrebno je: (1) izolirati proteine iz stanica (poglavlje 3.1.2.13.) i procijeniti koncentraciju izoliranih proteina (poglavlje 3.1.2.7.); (2) razdvojiti izolirane proteine na temelju specifičnog svojstva (npr. molekulske mase, izoelektrične točke, električnog naboja ili kombinacijom svega navedenog), a u ovom slučaju je to bila SDS-PAGE (poglavlje 3.1.2.14.); (3) prenijeti razdvojene proteine na membranu primjenom električne struje i blokirati membranu vezanjem proteina iz obranog mlijeka na slobodnu površinu membrane; (4) provesti reakciju ciljanog proteina na membrani sa specifičnim (primarnim) antitijelom; (5) detektirati visoko specifični kompleks protein (antigen) - (primarno i eventualno sekundarno) antitijelo na temelju radioaktivnosti, fluorescencije ili kemiluminiscencije. Antitijelo može biti konjugirano s nekim enzimom, kao što je peroksidaza iz hrena, koja katalizira razgradnju npr. supstrata čijom razgradnjom se dobije kemiluminiscentni produkt koji se može detektirati odgovarajućom kamerom ili na X-filmu.

Princip. Western blot (ili proteinski imunoblot) je metoda kojom se mogu identificirati proteini, kao što je npr. *LmSP*aza s afinitetnim biljegom hemaglutininom (HA), i to pomoću

visoko specifične interakcije antigen - antitijelo. Prije identifikacije ciljanog proteina interakcijom antigen - antitijelo, potrebno ga je prenijeti (blotirati) na čvrsti membranski nosač.

Postupak. Prijenos proteina na membranu. SDS-PAGE gel (poglavlje 3.1.2.14.) se postavi u posudu s destiliranom vodom tako da se prvo stavi podloga od spužve (Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), zatim tri Western blot filter papira (0,83 mm debljine x 7 cm x 8,4 cm; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), potom SDS-PAGE gel u kojem su razdvojeni proteini, pa nitrocelulozna membrana s veličinom pora od 0,45 μm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD). Nakon toga se doda još tri Western blot filter papira (0,83 mm debljine x 7 cm x 8,4 cm), opet podloga od spužve i sve zajedno se stavi u rešetkasti okvir. Priređena struktura se stavlja u kadicu za Western blot napunjenu 0,015 M Na-karbonatnim puferom, pH 9,5 (tablica 16.) tako da je gel okrenut prema negativnoj elektrodi, a nitroceluloza prema pozitivnoj elektrodi. Postavi se poklopac na kadicu i spoje se elektrode. Prijenos proteina iz SDS-PAGE gela na membranu se odvija kroz 2 h pri 380 mA i napon 180 V. Nakon toga se nitrocelulozna membrana oboji Ponceau S bojom (0,1 % m/v, u 5 %-tnoj octenoj kiselini; tablica 4.) do vizualizacije vrpce proteina iz LMW Protein Markera. Tada se nitrocelulozna membrana odboji ispiranjem s destiliranom vodom, a položaj proteina iz LMW Protein Markera (Immuno-Biological Laboratories, Inc., Minneapolis, SAD) se prethodno označi tupom grafitnom olovkom, jer ove vrpce nakon odbojavanja više nisu vidljive na membrani.

Reakcija *LmSPaze* na membrani sa specifičnim (primarnim) antitijelom. Nitrocelulozna membrana se inkubira u 10 mL pufera za blokiranje (tablica 17.), koji sadrži 1 % obranog mlijeka (tablica 4.) i to kroz 45 min na tresilici (100 rpm; Digitalna orbitalna tresilica CPS-350, PRO Scientific Inc, Willenbrock, SAD). Potom se pufer za blokiranje (tablica 17.) odlije iz kazete i dodaje se novih 5 mL pufera za blokiranje i 4 μL anti-HA antitijela (tablica 4.) te se ovaj sadržaj inkubira kroz 60 min na isti način na tresilici. Nakon vezanja antitijela na -HA oznaku, nitrocelulozna membrana se ispere 3 puta puferom za blokiranje tijekom 10 min tako da se ukloni suvišak antitijela (tablica 4.). Isprana membrana se osuši staničevinom u području standarda i kemiluminiscencom olovkom (WesternSure Pen, LI-COR Biosciences – GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Njemačka) se označe položaji proteina iz standarda.

Detekcija visoko specifičnog kompleksa protein (antigen) - (primarno i sekundarno) antitijelo. Membrana se tretira s ECL otopinama za razvijanje blota (tablica 4.), kako bi se kemiluminiscencija razvijena na membrani vizualizirala primjenom C-digit (Li-Cor) skenera.

3.1.2.16. Hidroliza škroba α -amilazom i primjena skenirajućeg elektronskog mikroskopa

3.1.2.16.1. Hidroliza škroba α -amilazom

Hidroliza škroba α -amilazom provedena je u dvije reakcijske smjese. Prva reakcijska smjesa sadržavala je 30 mL sterilizirane otopine škroba (10 g/L) i 50 μ L enzima α -amilaze u 0,05 M malatnom puferu, pH 6,0 (tablica 18.). Druga reakcijska smjesa je imala sličan sastav, samo je u ovoj drugoj reakcijskoj smjesi umjesto 50 μ L α -amilaze dodano 100 μ L ovoga enzima. Priređene smjese su inkubirane na tresilici (Incubation Shaker KS 3000 i control, IKA-Werke GmbH & Co.KG) pri 30 °C tijekom 24 sata.

Kao kontrolni uzorci pripremljeni su (1) nesterilna 1%-tna otopina škroba i to suspendiranjem 1,0 g topljivog škroba (tablica 4.) u 100 mL destilirane vode, kao i (2) sterilna 1%-tna otopina ovoga škroba, koja je sterilizirana (20 min pri 121°C; autoklav Sutjeska).

3.1.2.16.2. Priprema uzoraka za skenirajuću elektronsku mikroskopiju

Nakon inkubacije otopine škroba s α -amilazom, oko 200 μ L svake suspenzije ili njezinog odgovarajućeg (decimalnog) razrjeđenja nanese se na predmetno stakalce, fiksirano i osušeno provlačenjem predmetnog stakalca kroz plamen plinskog Bunsenovog plamenika. Površina fiksiranog uzorka prije snimanja učinjena je električki vodljivom magnetskim raspršivanjem tankog (3-5 mm) sloja legure zlato-paladij (60:40).

3.1.2.16.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija

U ovom istraživanju korišten je visokovakumski pretražni elektronski mikroskop Vega3 LMH (Tescan, Češka Republika), a slike su formirane u vidnom polju reda veličine μ m, a za snimanje su korišteni akcelerirajući naponi u rasponu od 2,5 do 10,0 kV.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Glavni cilj ovoga rada bio je eksprimirati glikozid hidrolazu - saharoza fosforilazu (*LmSPazu*) na površini dvaju sojeva kvasca - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 (poglavlje 4.1.). Soj *S. cerevisiae* BY4741 često se koristi u istraživanjima ovog tipa jer sadrži invertazu i može metabolizirati saharozu i rafinozu. S druge strane, soj *S. cerevisiae* SEY6210 nema invertazu i ne može metabolizirati saharozu pa zbog toga u ovome soju saharoza fosforilaza nema konkurencije za supstrat. Kako bi ostvarili ovaj zadani cilj, bilo je potrebno: (1) transformirati bakterijski soj *Escherichia coli* DH5 α dvama plazmidima - pMiniT2-*LmSPaza*, kako bi umnožili ovaj plazmid s genom za *LmSPazu*, i pRST423_Ccw12_G, kako bi umnožili plazmid pogodan za transformaciju stanica kvasaca; zatim (2) izolirati umnožene plazmide - pMiniT2-*LmSPaza* i pRST423_Ccw12_G, iz stanica *E. coli* DH5 α , kako bi restriksijskim enzimima (a) formirali ljepljive krajeve fragmenta koji sadrži gen za *LmSPazu* i (b) porezati na točno određenim mjestima pRST423_Ccw12_G i u ovaj plazmid insertirati fragment s ciljanim genom (*LmSPaza*) i tako formirati konstrukt pRS_Ccw12*LmSPazu*; zatim (3) transformirati stanice *E. coli* DH5 α radi umnažanja konstrukta pRS_Ccw12*LmSPaza* i izolirati ovaj plazmid kako bi (4) njime transformirali stanice dvaju sojeva kvasaca - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210. Dodatno je bilo potrebno potvrditi ekspresiju *LmSPaze* na površini stanica transformiranih sojeva kvasca metodama SDS-PAGE i Western blot. Sve ovdje opisano je prikazano na shemi u poglavlju Metode (slika 2.A i B).

Osim toga, drugi cilj ovoga istraživanja je bio popratiti hidrolizu kompleksnog supstrata - škroba tijekom reakcije, koju katalizira druga glikozid hidrolaza - α -amilaza i to skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) (poglavlje 4.2.).

4.1. EKSPRESIJA SAHAROZA FOSFORILAZE NA POVRŠINI STANICA KVASCA

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae pripada carstvu *Fungi*. Stanična stijenka njegovih stanica sastoji se od dva funkcionalno i strukturno različita dijela – unutarnjeg i vanjskog sloja. Unutarnji sloj stanične stijenke je građen uglavnom od glukana i osigurava mehaničku stabilnost stanice, dok je vanjski sloj građen od manoproteina i štiti stanicu od okolnih utjecaja. Neke od uloga manoproteina su održavanje i remodeliranje stijenke, interakcija s molekulama iz okoline stanice ili staničnim stijenkama drugih stanica tijekom reprodukcije ili flokulacije, zatim

signalizacija, stanična adhezija i imunološki odgovor stanice u određenim uvjetima (Teparić i sur., 2010; Samalova i sur., 2020). Protein ScCcw12 pripada skupini proteina koji se u stijenku vežu preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra, koje se veže na njega tijekom posttranslacijskog modificiranja prilikom njegova transporta iz stanice na površinu stanice (Teparić i sur., 2010; Samalova i sur., 2020).

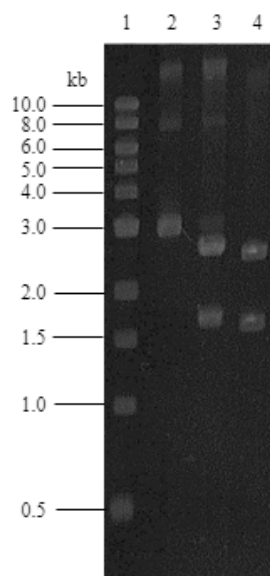
4.1.1. Konstrukcija plazmida pRS_Ccw12LmSPaza

Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijskih stanica *E. coli* DH5 α (poglavlje 3.1.2.2.), koje sadrže željene plazmide, plazmidi su izolirani iz stanica upotrebom NucleoSpin Plasmid kita za izolaciju high copy plazmida (poglavlje 3.1.2.3.) prema uputama proizvođača (Macherey-Nagel). Potom je određena koncentracija izoliranog plazmida pomoću uređaja NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) što je prikazano u tablici 19.

Tablica 19. Rezultati određivanja koncentracije izolirane plazmidne DNA.

Plazmid	A _{260/280} (-)	γ [ng/ μ L]
pMiniT2-LmSPaza	1,86	160,4
pRST423_Ccw12_G	1,89	174,8

Vrijednost omjera A_{260/280} između 1,8 - 1,9 označava zadovoljavajuću čistoću obaju izoliranih plazmida. Ova koncentracija izolirane plazmidne DNA dovoljna je za provođenje restrikcije ovih plazmida, koja je provedena restrikcijskim enzimima *Pst*I i *Not*I (poglavlje 3.1.2.4.). Nakon restrikcije, veličina dobivenih fragmenata (slika 3., poglavlje 3.1.2.5.) provjerena je DNA elektroforezom.



Slika 3. Prikaz veličine fragmenata plazmida pMiniT2-LmSPaza (2460 bp i 1593 bp) nastalih cijepanjem restriktivnim enzimima *Pst*I i *Not*I. Uzorak br.: 1 smjesa standarda s poznatim veličinama vrpci (1 kb Plus DNA Ladder, 100 bp do 10 kb; New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, SAD); 2. neporezan plazmid pMiniT2-LmSPaza; 3. plazmid pMiniT2-LmSPaza rezan sa *Pst*I; 4 plazmid pMiniT2-LmSPaza rezan sa *Pst*I i *Not*I.

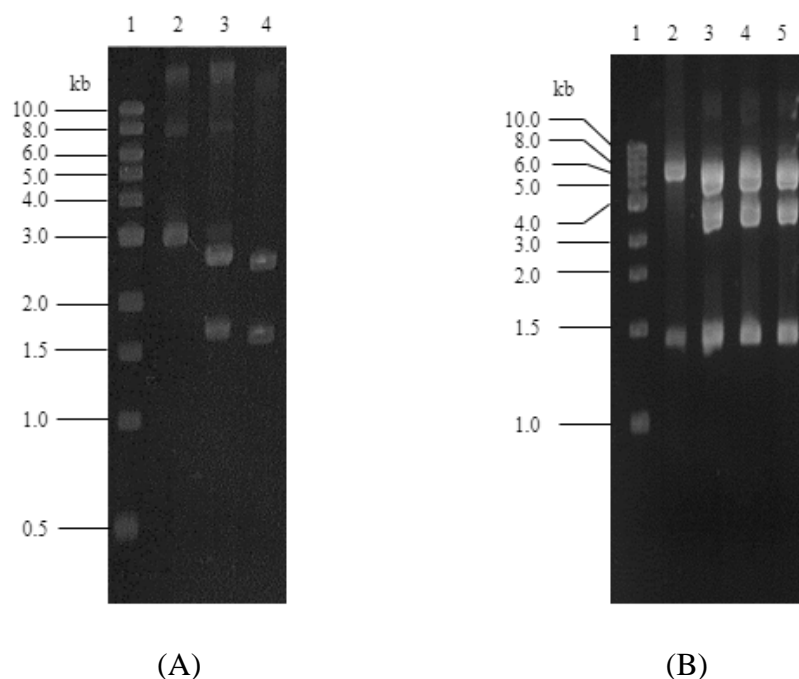
Restriktivskom analizom utvrđena je ispravnost veličina fragmenata nastalih djelovanjem restriktivskih endonukleaza. Nakon provedene restriktivske analize i DNA elektroforeze u agaroznom gelu, odgovarajući fragmenti izolirani su iz agaroznog gela (poglavlje 3.1.2.6.) te je njihova koncentracija određena primjenom Qubit 3.0 (Invitrogen, Life Technologies, SAD) fluorometra prema uputama proizvođača, a rezultati su prikazani u tablici 20.

Tablica 20. Rezultati fluorometrijskog određivanja koncentracije DNA u uzorcima izoliranih fragmenata pMiniT2-LmSPaza i pRST423_Ccw12_G.

Plazmid	γ [ng/ μ L]
pMiniT2-LmSPaza	8,39
pRST423_Ccw12_G	19,00

Izolirani fragment od 6282 bp iz pRST423_Ccw12_G i fragment 1593 bp iz pMiniT2-

LmSPaza ligirani su pomoću T4 DNA ligaze, kao što je opisano u poglavlju 3.1.2.8. Ligacijom navedenih fragmenata, koji imaju odgovarajuće krajeve, formiran je konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza koji se koristi za transformaciju dvaju sojeva kvasca *S. cerevisiae*. Ligacijskom smjesom transformirane su bakterijske stanice *E. coli* DH5 α , u kojima je umnožen konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza. Navedeni plazmid izoliran je iz *E. coli* DH5 α (poglavlje 3.1.2.9.) i provedena je restrikcija pRS_Ccw12LmSPaza s restrikcijskim enzimom *Xmn*I kako bi se provjerilo insertiranje gena za *LmSPazu* u plazmid pRST423_Ccw12_G (poglavlje 3.1.2.4.). Rezultati restrikcije plazmida pRS_Ccw12LmSPaza s *Pst*I, *Not*I i *Xmn*I provjereni su DNA gel elektroforezom, kojom se potvrdilo cijepanje plazmida na fragmente očekivane veličine (slika 4.B).



Slika 4. DNA gel elektroforeza nakon restrikcije dvaju plazmida - **(A)** pMiniT2-LmSPaza i **(B)** pRS_Ccw12LmSPaza, enzimima *Not*I i *Pst*I te *Xmn*I. **(A)** gel: 1, standard (1 kb Plus DNA Ladder, 100 bp do 10 kb, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, SAD); 2, pMiniT2-LmSPaza prije restrikcije; 3, pMiniT2-LmSPaza nakon restrikcije enzimom *Pst*I; 4, pMiniT2-LmSPaza nakon restrikcije enzimima *Pst*I i *Not*I (2460 i 1593 bp). **(B)** gel: 1, standard (1 kb Plus DNA Ladder, 100 bp do 10 kb, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, SAD); 2, pRST423_Ccw12_G nakon restrikcije enzimom *Xmn*I; 3 - 5, pRS_Ccw12LmSPaza nakon restrikcije enzimom *Xmn*I, koji je izoliran iz tri različite kulture transformiranih stanica *E. coli* DH5 α .

Nakon uzgoja triju odabranih kolonija transformiranih stanica *E. coli* DH5 α , plazmid pRS_Ccw12LmSPaza izoliran je iz bakterijskih stanice pomoću NucleoSpin® kita prema uputama proizvođača (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Plazmid pRS_Ccw12LmSPaza ima tri restrikcijska mjesta za djelovanje enzima *Xmn*I. Provedenom restrikcijskom analizom izoliranog plazmida s navedenim restrikcijskim enzimom i DNA elektroforezom u agaroznom gelu utvrđene su tri vrpce koje veličinom odgovaraju željenim fragmentima tj. prikazuju kako pocijepani konstrukt ima fragmente odgovarajuće veličine (fragment 4355 bp, 2588 bp i 932 bp; slika 4.B, 3-5) čime je potvrđena uspješna konstrukcija plazmida pRS_Ccw12LmSPaza s genom koji kodira za *Lm*SPazu.

4.1.2. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom

Nakon uspješnog umnažanja i izolacije konstrukta pRS_Ccw12LmSPaza iz *E. coli* DH5 α , uzgojene su svježe kulture sojeva kvasaca *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 (poglavlje 3.2.11.) i određena je optička gustoća ovih suspenzija (OD₆₀₀; tablica 21.).

Tablica 21. Optička gustoća (OD₆₀₀) suspenzija svježe uzgojenih *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 i volumen ovih suspenzija potreban za naciepljivanje kompletne tekuće YNB podloge sa svim aminokiselinama (uključujući His) za uzgoj obaju sojeva kvasca za transformaciju priređenim konstruktom.

soj <i>S. cerevisiae</i>	OD ₆₀₀ (AU)	V [mL]
BY4741	2,13	4,22
	1,85	4,86
SEY6210	2,29	3,93
	1,15	7,82

Jedna OD₆₀₀ jedinica (AU) ekvivalentna je otprilike 10⁷ stanica kvasca/mL. Stvaran broj stanica kod različitih sojeva *S. cerevisiae* može se razlikovati od ovako procijenjenog broja, pa je ovaj broj stanica kvasca u volumenu od 1 mL suspenzije aproksimativna vrijednost. U ovoj tablici prikazani su i volumeni ovih suspenzija, kojima je naciepljena hranjiva tekuća YNB podloga (V = 30 mL), kako bi se postigla početna OD₆₀₀ ~ 0,3 AU za uzgoj obaju sojeva. Svježe uzgojene stanice transformirane su konstruktom pRS_Ccw12LmSPaza LiAc metodom

(poglavlje 3.1.2.10.). Divlji tip stanica kvasca *S. cerevisiae* auksotrofni je mutant za histidin i ne raste na podlozi bez histidina. Zbog toga na YNB podlozi bez His rastu samo transformirane stanice kvasca koje su uspješno primile konstruirani plazmid. Sa čvrste selektivne hranjive podloge s poraslim kolonijama kvasca uzima se par kolonija i uzgajaju se kao što je opisano u poglavlju 3.1.2.11. tijekom čega dolazi do indukcije gena sa *PHO5* promotora. Količina poraslih transformiranih stanica kvasca popraćena je određivanjem OD₆₀₀ i to nakon razrjeđivanja izuzete suspenzije (razrjeđenje 30x; tablica 22.).

Tablica 22. Optička gustoća (OD₆₀₀) suspenzija svježe uzgojenih transformiranih sojeva kvasaca *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210 nakon prekonoćnog uzgoja.

soj	30 x OD ₆₀₀ (AU)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	77,4
	82,2
<i>S. cerevisiae</i> SEY6210	84,3
	52,5

Nakon uzgoja, stanice obaju sojeva kvasca izdvojene su centrifugiranjem, razbijene i izolirane su stijenke ovih stanica (poglavlje 3.1.2.12.). Izolirane stijenke podvrgnute su SDS tretmanu, kako bi se izdvojili nekovalentno vezani proteini stijenke (poglavlje 3.1.2.13.1.), i β-glukanaznom tretmanu, kako bi se izdvojili kovalentno vezani proteini stijenke (poglavlje 3.1.2.13.2.). Izolirane stijenke stanica kvasca izvagane su (laboratorijska vaga Mettler P1210 Weighing Instrument, Watson Victor Ltd., New South Wales, Engleska) za određivanje potrebne količine β-glukanaze. β-glukanaza (tablica 3.) katalizira reakciju hidrolize polisaharida u kojima su glukozilne jedinice povezane β-glikozidnim vezama tj. razgrađuje izdvojene stanične stijenke kvasca s nekovalentno i kovalentno vezanim proteinima. Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 23.

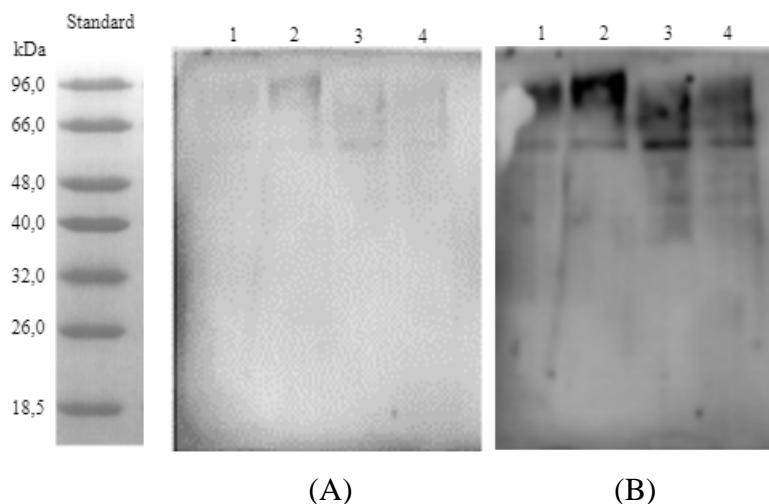
Tablica 23. Masa stijenki izoliranih iz transformiranih stanica kvasca *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY 6210.

Soj	m (stijenki) [g]
<i>S. cerevisiae</i> BY 4741	45,0
	43,0
<i>S. cerevisiae</i> SEY 6210	40,0
	55,0

4.1.3. Provjera vezanja proteina *LmSPaza* u staničnu stijenku kvasca Western blot metodom

Klasičnom kemijskom imobilizacijom proteina može doći do djelomičnog gubitka biološke aktivnosti imobiliziranih proteina ili promjene njegovih svojstava, a to se može izbjeći ukoliko se proteini imobiliziraju na površinu stanica u formi rekombinantnih proteina dobivenih fuzijom nativnog proteina stijenke i željenog proteina (Teparić i sur., 2010). Poznavanje načina ugradnje proteina u staničnu stijenku olakšava imobilizaciju heterolognih proteina na površinu stanice kvasca. Većina do sada u ovu svrhu pripremljenih konstrukata koriste nativne proteine iz skupine GPI usidrenih proteina stijenke kvasca. Najčešće za ovu svrhu korišteni GPI usidreni protein kvasca je α -aglutinin, koji se transportira na vanjsku stranu plazmine membrane nakon čega se translocira na β -1,6-glukan. Fuzija željenog proteina na N-terminalni kraj α -aglutinina rezultira kovalentnim vezanjem tako dobivenog rekombinantnog proteina na površinu stanice kvasca. Protein stanične stijenke Ccw12 pripada među najzastupljenije GPI usidrene proteine stanične stijenke (Mrša i sur., 1999) zbog čega je korišten za konstrukciju rekombinantnog proteina u ovom radu. Tako je u ovome istraživanju eksprimiran protein *LmSPaza* na površini stanice kvasca *S. cerevisiae* pomoću GPI sidra, tj. proteina ScCcw12. Stanice kvasca u konačnom uzgoju u hranjivoj YNB podlozi bez fosfata uzgojene su do OD₆₀₀ ~2-4 jedinice/mL, a nakon toga se stijenke i proteini stijenki kvasca izoliraju prema prethodno opisanom protokolu (poglavlje 3.1.2.12. i poglavlje 3.1.2.13.). Izolirane stijenke stanica kvasca podvrgnute su SDS tretmanu čime su izdvojeni nekovalentno vezani proteini u SDS ekstraktu. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke dobiveni su u β -glukanaznom ekstraktu koji je dobiven djelovanjem enzima β -glukanaze na preostali dio staničnih stijenki kvasca. Izolirani i izdvojeni proteini stanične stijenke kvasca razdvojeni su elektroforezom (SDS-PAGE, poglavlje 3.1.2.14.) nakon čega su preneseni na nitroceluloznu membranu Western blot metodom (poglavlje 3.1.2.15.).

Proteini preneseni na nitroceluloznu membranu detektirani su pomoću -HA antitijela (slika 5.B).

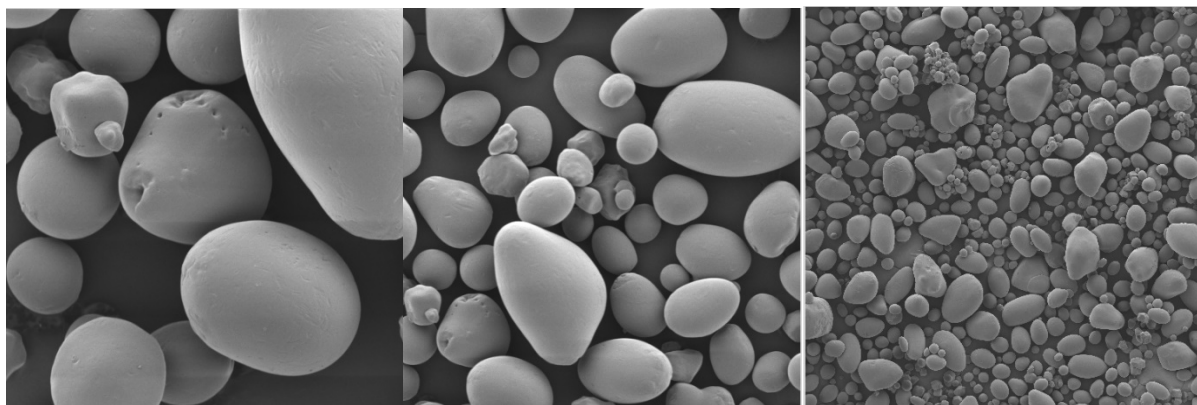


Slika 5. (A) Western blot analiza nekovalentno vezanih protein stanične stijenke; (B) Western blot analiza kovalentno vezanih proteina stanične stijenke kvasaca: 1 i 2, *S. cerevisiae* BY4741; 3 i 4, *S. cerevisiae* SEY6210.

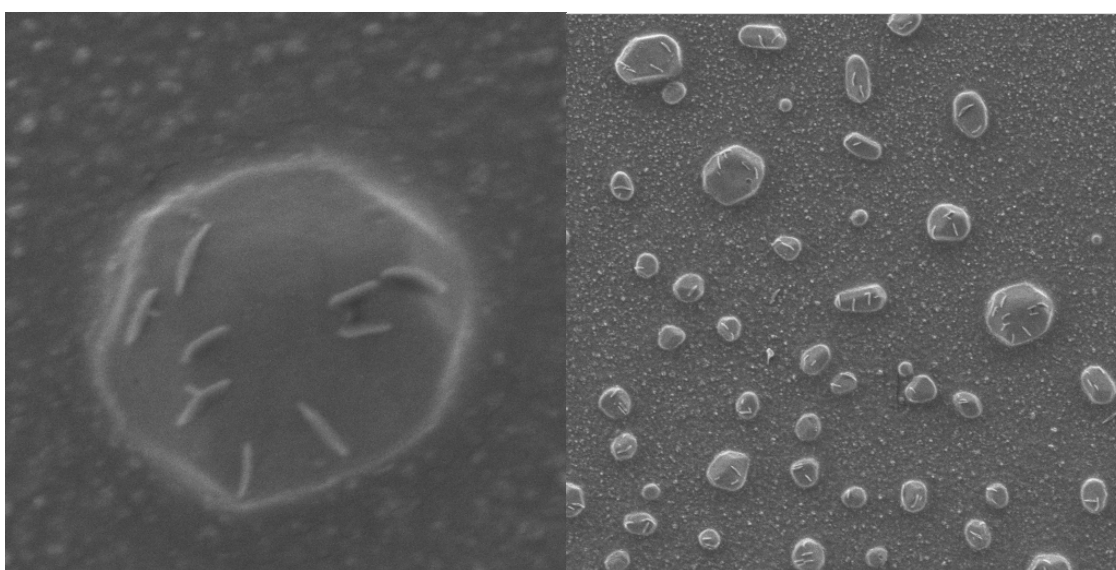
U eksperimentu koji su proveli Goedl i sur. (2007) pročišćeni enzim *LmSPaza* migrirao je kao zasebna proteinska vrpca obojena Coomassie bojom tijekom provedbe SDS-PAG elektroforeze pri čemu je određena molekulska masa proteina od oko 60 kDa dok je izračunata molekulska masa proteina s His-tagom iznosila 57 kDa. Rezultati provedene Western blot analize β -glukanaznog ekstrakta koji sadrži kovalentno vezane proteine stanične stijenke pokazuje vidljivu vrpcu proteina *LmSPaze* čija je veličina otprilike 60 kDa što odgovara literaturnim podacima.

4.2. PRAĆENJE HIDROLIZE ŠKROBA SKENIRAJUĆOM ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM

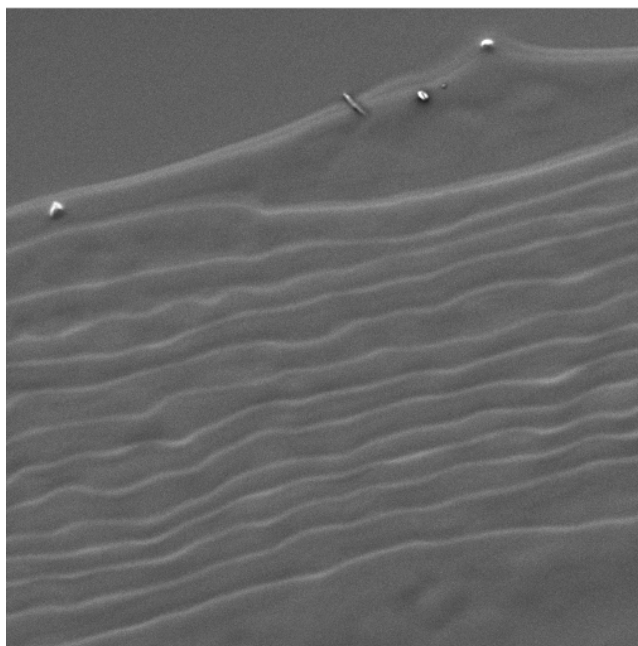
U ovome radu je primijenjena skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) u karakterizaciji hidrolize škroba α -amilazom. Promjer zrnaca škroba je reda veličine 1-5 μm , dok su dimenzije ove glikozid hidrolaze procijenjene na 35 Å \times 40 Å \times 70 Å nm (1BAG.pdb; Fujimoto i sur., 1998). Horovitz i sur. (2011) su primjenom SEM uočili različite strukture škroba poput sfernog i ovalnog oblika do neregularnog poligonalnog oblika, a slično se može vidjeti na slikama ovdje ispod (slike 6.-11.).



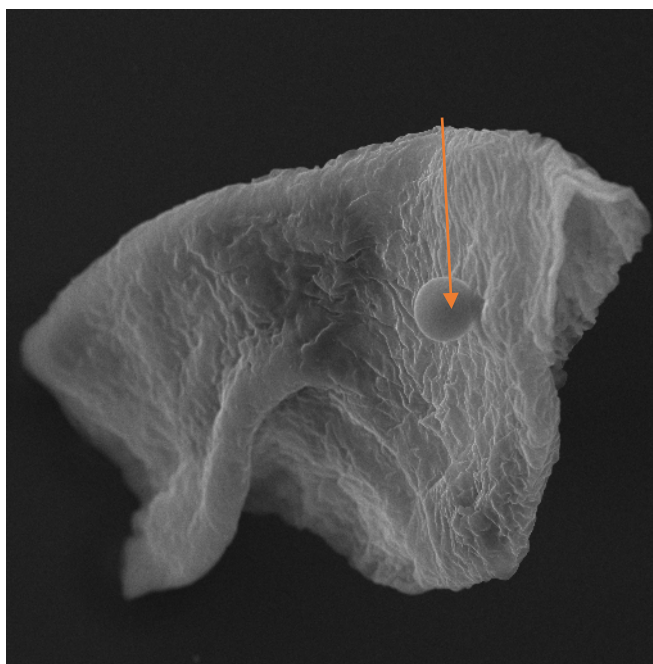
Slika 6. SEM zrnaca škroba.



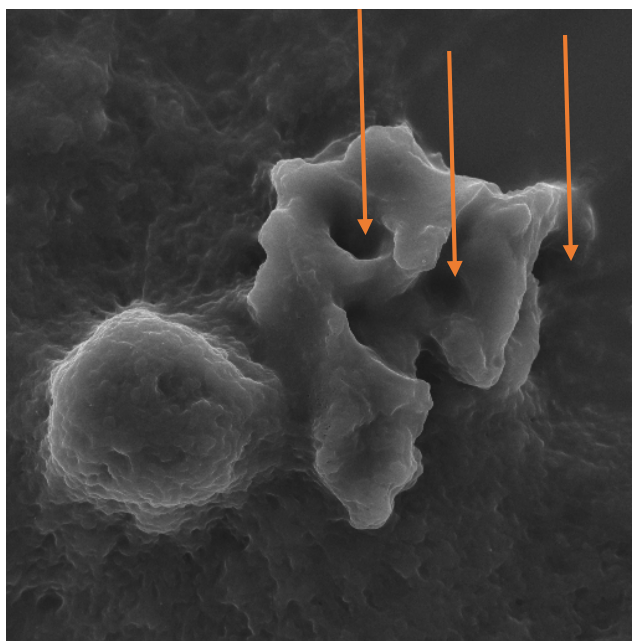
Slika 7. SEM zrnaca škroba s fino granuliranim kontinuiranim matricama, na čijoj se površini nalaze dispergirane granule približno sferičnog oblika, veličine 1-5 μm i izduženije čestice duljine do 15 μm . Na površini granula uočavaju se izdužene strukture, prividno cilindričnog ili jako izduženog elipsoidnog oblika, ravne ili lagano zakrivljene, promjera oko 100 nm.



Slika 8. SEM steriliziranog škroba. Uzorak je amorfna, morfološki homogena matrica unutar koje se naziru uklopljene granule veličine 5-50 μm koje po dimenzijama odgovaraju česticama polaznog škroba.

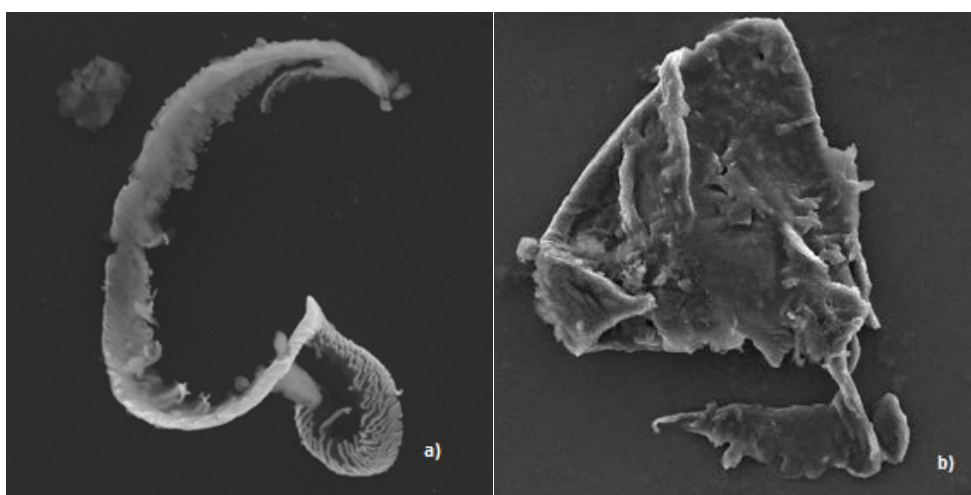


Slika 9. SEM nakupine zrnaca klajsterilizarnog škroba nakon sterilizacije i hidrolize škroba α -amilazom (100 U; poglavlje 3.1.2.16.1.) na početku inkubacije pri 30 $^{\circ}\text{C}$. Strelica označava enzim, koji se karakteristično veže na površinu ovoga polimernoga supstrata.



Slika 10. SEM nakupine zrnaca klajsterilizarnog škroba nakon hidrolize škroba α -amilazom (100 U; poglavlje 3.1.2.16.1.) nakon 24 h. Strelice označavaju karakterističan oblik pore / pukotine u zrcima škroba, koje nastaju djelovanjem ovoga enzima.

Slično je utvrđeno kod primjene škrobne sirovine (kukuruzne krupice) i vezivanja amilolitičke bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na površinu zrnaca kukuruzne krupice (podaci iz drugih istraživanja nisu pokazani).



Slika 11. Dvije različite nakupine ostataka zrnaca klajsteriziranog škroba nakon hidrolize škroba α -amilazom (100 U; poglavlje 3.1.2.16.1.) kroz 24 h.

Škrob je iznimno važan u ljudskoj prehrani, ali osim nutritivnih vrijednosti škrob je bitan supstrat u kemijskim i enzimskim reakcijama dobivanja proizvoda poput glukoznog sirupa, fruktoze ili hidrolizata škroba. Između velikog broja biljaka koje sintetiziraju škrob, industrijski je najvažniji kukuruz iz kojeg se dobiva kukuruzni škrob koji se koristio u ovome istraživanju (van der Maarel i sur., 2002). SEM metodom popraćena je promjena strukture zrnca škroba nakon izlaganja različitim uvjetima okoline. Tako slika 6. prikazuje nakupine zrnca škroba, na koje nije djelovao enzim α -amilaza i koji nije steriliziran. Vidljivo je kako su zrnca škroba strukturno neujednačena i kako mogu zauzeti ovalni, sferni ili neregularan poligonalni oblik kao što je prikazano u radu Horovitz i sur. (2011). Sterilizirani škrob prikazan je na slici 8., a strukturno se razlikuje od nesteriliziranih zrnaca škroba prikazanih na slici 6. i slici 7. Enzim α -amilaza dio je GH – 13 obitelji koje karakteriziraju sljedeća svojstva: (1) provode hidrolizu α -glikozidne veze ili kataliziraju reakciju transglikozilacije i (2) imaju četiri visoko očuvane regije u primarnoj sekvenci s aminokiselinama koje tvore katalitičko mjesto (van der Maarel i sur., 2002). U provedenom ispitivanju djelovanja enzima α -amilaze na kukuruzni škrob kao supstrat dobiveni su rezultati prikazani na slikama 9.-11. na kojima je vidljivo vezanje enzima na površinu supstrata i zatim postepene strukturne promjene škroba tijekom hidrolitičkog djelovanja ovoga enzima. Na ovaj način, grafički je popraćeno hidrolitičko djelovanje enzima α -amilaze na supstrat (škrob).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju razvoja primjene dviju glikozid hidrolaza - saharoza fosforilaze i α -amilaze, može se zaključiti slijedeće:

1. Primjenom odabranih metoda molekularne biotehnologije, gen koji kodira za saharoza fosforilazu (SPazu) iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides* (LmSPaza) uspješno je izdvojen iz plazmida pMiniT2-LmSPaze i kloniran u plazmid pRST423_Ccw12_G čime je formiran konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza.
2. Analizom fragmenata plazmida pRS_Ccw12LmSPaza dobivenih restrikcijom enzimima *NotI*, *PstI* i *XmnI* potvrđena je uspješnost insercije gena za LmSPazu u konstrukt pRS_Ccw12LmSPaza.
3. LiAc metodom su konstruktom pRS_Ccw12LmSPaza transformirana dva soja kvasca *S. cerevisiae* - *S. cerevisiae* BY4741 i *S. cerevisiae* SEY6210, a ekspresija LmSPaze potvrđena metodama SDS-PAGE i Western blotom.
4. Insercijom gena koji kodira za LmSPazu u konstruktu pRS_Ccw12LmSPaza između dva dijela gena *ScCCW12* osigurana je uspješna ekspresija ovoga proteina na vanjskoj površini stanica kvasca *S. cerevisiae*.
5. Hidroliza škroba α -amilazom uspješno je popraćena skenirajućom elektronskom mikroskopijom i na ovaj način su potvrđeni rezultati prethodnih istraživanja u ovoj grupi: (a) da se ova glikozid hidrolaza veže na površinu zrnaca škroba; (b) uslijed aktivnosti vezanoga enzima lokalno se u ovom polimernom supstratu formiraju pore ili pukotine, koje započinju na površini zrnca škroba i povećavaju se prema unutrašnjosti zrnca škroba; (c) napredovanje ovih pukotina rezultira povećanjem kontaktne površine između supstrata i enzima, „otvaranjem“ strukture zrnca škroba i potpunom razgradnjom ovoga polimernoga supstrata, što je u skladu s literaturnim podacima.

6. LITERATURA

Akhtar K, Ali Khan S, Bahadar Khan S, Asiri AM (2018) Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization, Handbook of Materials Characterization, Springer, Cham., <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_4>. Pristupljeno: 23. travnja 2022.

Anonymous 1 (2022) Strain: BY4741. SGD – *Saccharomyces* genome database, <<https://www.yeastgenome.org/strain/by4741>>. Pristupljeno: 2. svibnja 2022.

Anonymous 2 (2022) SciencesY2025 Yeast Nitrogen Base w/o AA, Carbohydrate & w/AS (YNB) (Powder). USBio - USBiological Life, <<https://www.usbio.net/media/Y2025>>. Pristupljeno: 25. travanj 2022.

Anonymous 3 (2022) Restriction Enzymes XmnI / PdmI. Labettor Research Experiment Guide, <<https://labettor.com/experiments/detail/exp/restriction-enzymes-xmni-pdmi/id/13711/>>. Pristupljeno: 16. svibnja 2022.

Anonymous 4 (2022) CCW12 / YLR110C Overview. SGD - *Saccharomyces* genome database, <<https://www.yeastgenome.org/locus/S000004100>>. Pristupljeno: 20. kolovoza 2022.

Bolivar JM, Luley-Goedl C, Leitner E, Sawangwan T, Nidetzky B (2017) Production of glucosyl glycerol by immobilized sucrose phosphorylase: options for enzyme fixation on a solid support and application in microscale flow format. *J Biotechnol* **257**, 131-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.019>

Choulis NH (2014) Chapter 49 – Miscellaneous drugs, materials, medical devices, and techniques. U: *Side Effects of Drugs Annual* 35 (J.K. Aronson), 1. izd., Elsevier, 899-924. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62635-6.00049-8>

Cohen R, Engelberg D (2007) Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake. *FEMS Microbiol Lett* **273**, 239-243. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00798.x>

Datta S, Rene Christena L, Yamuna Rani Sriramulu Rajam (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, **3** (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP (2007) Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *J Ind Microbiol Biot* **34** (12), 771-777. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0253-1>

Franceus J, Desmet T (2019) A GH13 glycoside phosphorylase with unknown substrate specificity from *Corallocooccus coralloides*. *Amylase* **3**, 32-40. <https://doi.org/10.1515/amylase-2019-0003>

Featherstone S (2015) 8 - Ingredients used in the preparation of canned foods. U: *A Complete Course in Canning and Related Processes. Volume 2: Microbiology, Packaging, HACCP and Ingredients*, 14. izd., Woodhead Publishing, Sawston, UK, 147-211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-678-4.00008-7>

Fujimoto Z, Takase K, Doui N, Momma M, Matsumoto T, Mizuno H (1998) Crystal Structure of a Catalytic-site Mutant α -Amylase from *Bacillus subtilis* Complexed with Maltopentaose. *J Mol Biol* **277**, 393-407. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1599>

Galao RP, Scheller N, Alves-Rodrigues I, Greinig T, Meyerhans A, Dí J (2007) *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microb Cell Fact* **6**, 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-32>

Goedl C, Sawangwan T, Wildberger P, Nidetzky B (2010) Sucrose phosphorylase: a powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals. *Biocatal Biotransfor* **28** (1), 10-21. <https://doi.org/10.3109/10242420903411595>

Goedl C, Schwarz A, Minani A, Nidetzky B (2007) Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of α -D-glucose 1-phosphate. *J Biotechnol* **129** (1), 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.019>

Hanahan D (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* **166** (4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)

Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Method Enzymol* **204**, 63-113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A)

Horovitz O, Cioica N, Jumate N, Pojar-Feneşan M, Balea A, Liteanu V, Mocanu A, Tomoaia-Cotişel M (2011) SEM characterization of starch granules. *Studia UBB Chemia*, **54**, 1-10.

Joy DC (2019) Scanning Electron Microscopy: Theory, History and Development of the Field Emission Scanning Electron Microscope. U: Biological Field Emission Electron Microscopy (Fleck RA, Humbel BM), 1. izd., John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, New Jersey, str. 1-6. <<https://doi.org/10.1002/9781118663233.ch1>> Pristupljeno: 24. travanj 2022.

Klímaček M, Sigg A, Nidetzky B (2020) On the donor substrate dependence of group-transfer reactions by hydrolytic enzymes: Insight from kinetic analysis of sucrose phosphorylase-

catalyzed transglycosylation. *Biotechnol Bioeng* **117** (10), 2933-2943. <https://doi.org/10.1002/bit.27471>

Klis FM, Brul S, De Groot PWJ (2010) Covalently linked wall proteins in ascomycetous fungi. *Yeast* **27**, 489–493. <https://doi.org/10.1002/yea.1747>

Klis FM, de Koster CG, Brul S (2014) Cell Wall-Related Bionumbers and Bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **13** (1), 2-9. <https://doi.org/10.1128/EC.00250-13>

Lipke PN, Ovalle R (1998) Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J Bacteriol* **180** (15), 3735-3740. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998>

Liu Q, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ (1998) The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol* **8**, 1300-1309. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00560-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00560-X)

Martínez JM, Cebrián G, Alvarez I, Raso J (2016) Release of Mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* Autolysis Induced by Pulsed Electric Field. *Front Microbiol* **7**, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01435>

Mrša V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle L, Tanner W (1999) Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181** (10), 3076-3086. <https://doi.org/10.1128/JB.181.10.3076-3086.1999>

Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas, E (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* **6** (1), 1-31. <https://doi.org/>

10.3934/microbiol.2020001

Potapov V, Ong JL, Kucera RB, Langhorst BW, Bilotti K, Pryor JM, Cantor EJ, Canton B, Knight TF, Evans Jr. TC, Lohman GJS (2018) Comprehensive Profiling of Four Base Overhang Ligation Fidelity by T4 DNA Ligase and Application to DNA Assembly. *ACS Synth Biol* **7**, 2665-2674. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00333>

Rivera MH, López-Munguía A, Soberón X, Saab-Rincón G (2003) α -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Eng Des Sel* **16**, 505-514. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg060>

Robynt JF (2009) Chapter 7 - Enzymes and Their Action on Starch. U: Starch: Chemistry and Technology (BeMiller J, Whistler, R), 3. izd., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 237-292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00007-0>

Samalova M, Carr P, Bromley M, Blatzer M, Moya-Nilges M, Latge JP, Mouyna I (2020) GPI Anchored Proteins in *Aspergillus fumigatus* and Cell Wall Morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **425**, 167-186. https://doi.org/10.1007/82_2020_207.

Selvarasu S, Siak-Wei Ow D, Yup Lee S, May Lee M, Kah-Weng Oh S, Karimi IA, Lee DY (2009) Characterizing *Escherichia coli* DH5a Growth and Metabolism in a Complex Medium Using Genome-Scale Flux Analysis. *Biotechnol Bioeng* **102** (3), 923-934. <https://doi.org/10.1002/bit.22119>

Song G, Balakrishnan R, Binkley G, Costanzo MC, Dalusag K, Demeter J, Engel S, Hellerstedt ST, Karra K, Hitz BC, Nash RS, Paskov K, Sheppard T, Skrzypek M, Weng S, Wong E, Cherry JM (2016) Integration of new alternative reference strain genome sequences into the *Saccharomyces* genome database. *Database* **2016** (2016), 1-7. <https://doi.org/10.1093/database/baw074>

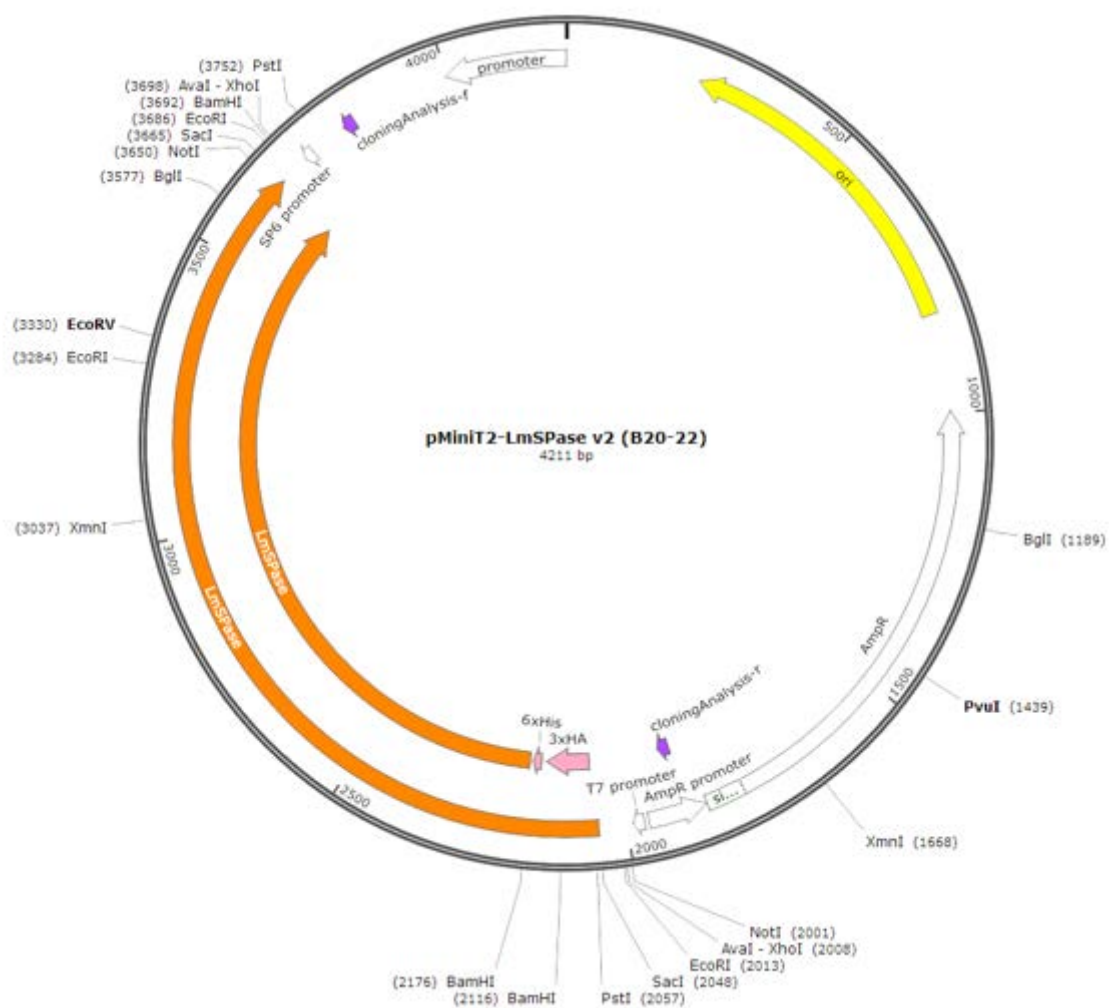
Teparić R, Stuparević I, Mrša V (2010) Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technol Biotech* **48** (3), 317-328.

van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol* **94**, 137-155. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2)

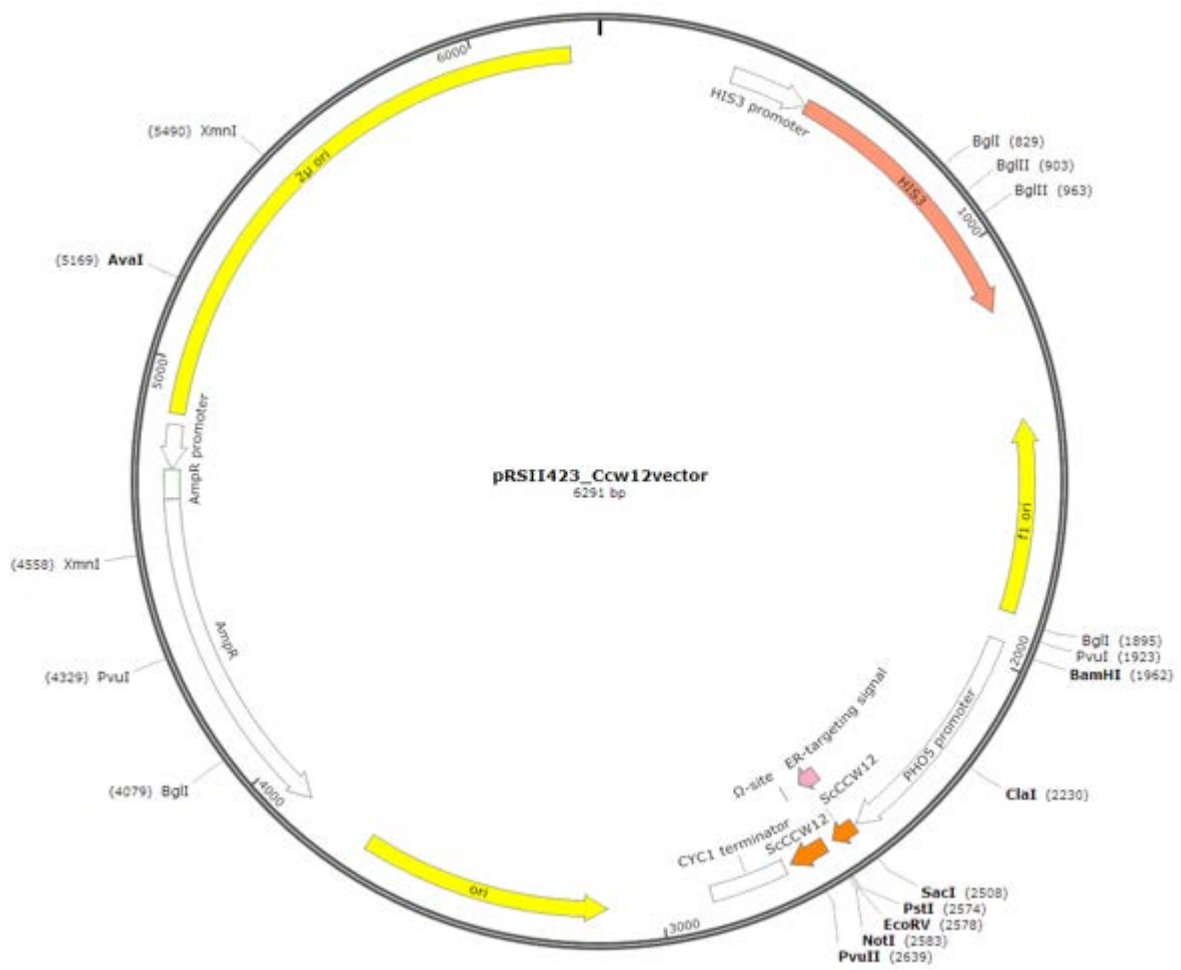
Valikhani D, Bolivar JM, Pfeiffer M, Nidetzky B (2017) Multivalency effects on the immobilization of sucrose phosphorylase in flow microchannels and their use in the development of a high-performance biocatalytic microreactor. *Chem Cat Chem* **9**, 161-166. <https://doi.org/10.1002/cctc.201601019>

Wildberger P, Pfeiffer M, Brecker L, Nidetzky B (2015) Diastereoselective Synthesis of Glycosyl Phosphates by Using a Phosphorylase-Phosphatase Combination Catalyst. *Angew Chem Int Edit* **54** (52), 15867–15871. <https://doi.org/10.1002/anie.201507710>

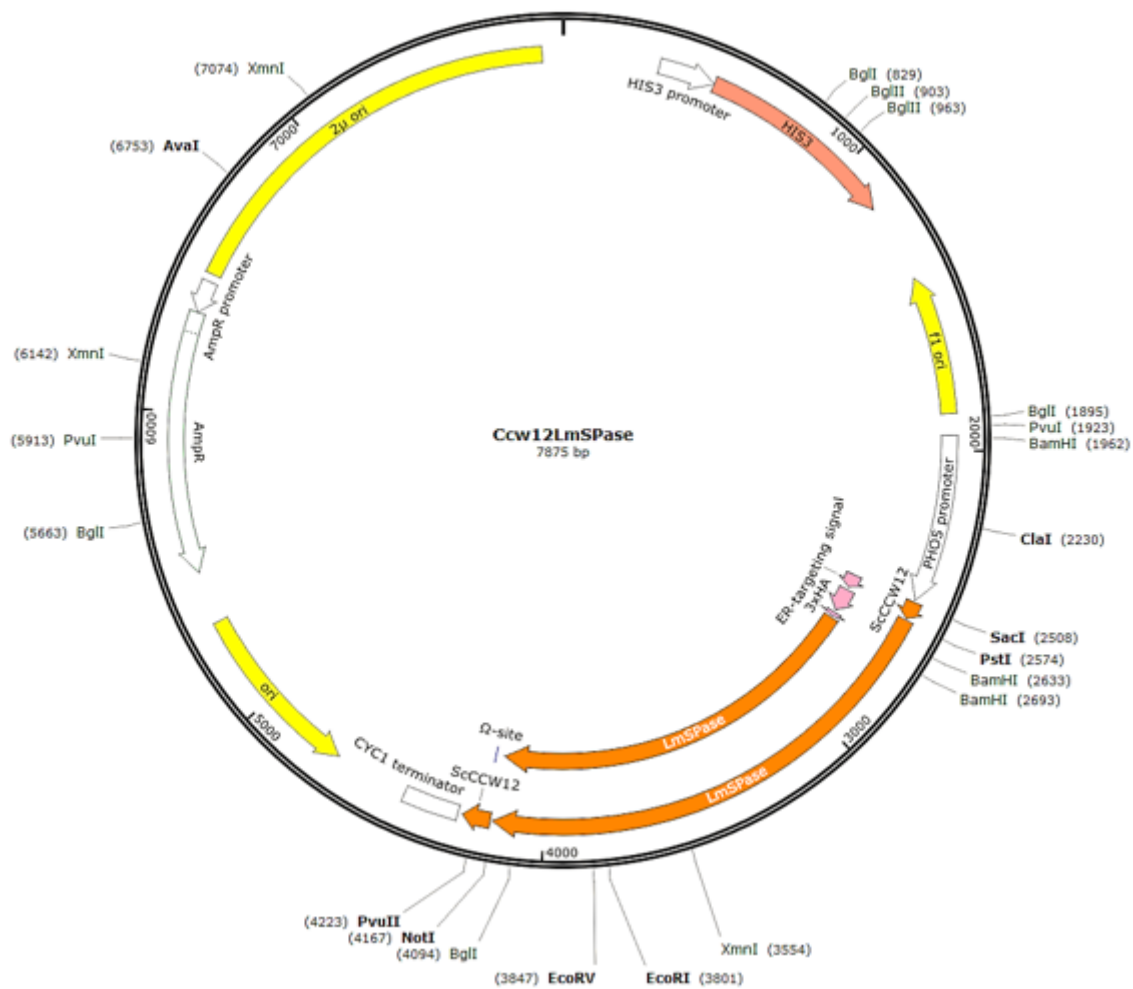
PRILOZI



Mapa pMiniT2-LmSPaza, iz kojega je uzet gen za *LmSPazu*.



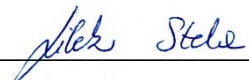
Mapa pRST423_Ccw12_G, u koji je kloniran gen za *LmSPazu*.



Konstrukt s genom koji kodira za *LmSPazu* - pRS_Ccw12LmSPaza, kojim su transformirana dva soja kvasca *S. cerevisiae* - *S. cerevisiae* SEY6210 i *S. cerevisiae* BY4741.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Stela Lilek 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.

A handwritten signature in blue ink, reading "Lilek Stela", written over a horizontal line.

Vlastoručni potpis