

Karakterizacija i genetička transformacija odabranih vrsta nekonvencionalnih kvasaca iz roda *Schwanniomyces*

Slišković, Ana

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:159:072363>

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.

Ana Slišković

KARAKTERIZACIJA I GENETIČKA
TRANSFORMACIJA ODABRANIH
VRSTA NEKONVENCIONALNIH
KVASACA IZ RODA *Schwanniomyces*

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

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Marini Svetec Miklenić na nesebičnoj pomoći i posebnoj pažnji posvećenoj izradi ovoga diplomskog rada. Hvala na brojnim riječima ohrabrenja i savjetima koji su me inspirirali da proširim svoje poznavanje ovog područja znanosti.

Želim se zahvaliti svim djelatnicima Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama, a posebno hvala prof. dr. sc. Ivanu Krešimiru Svetecu na pruženoj podršci pri izradi ovoga rada kao i tokom cjelokupnog studija.

Nadalje zahvaljujem svojoj obitelji te Marini Oskomić, Luciji Štrbac i Toniju Tomiću, bez čije podrške, strpljenja i pomoći ne bih uspješno završila ovaj studij.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

KARAKTERIZACIJA I GENETIČKA TRANSFORMACIJA ODABRANIH VRSTA
NEKONVENCIONALNIH KVASACA IZ RODA *Schwanniomyces*
Ana Slišković, univ. bacc.ing. biotechn. 0058210210

Sažetak: Kako bi se ostvarila maksimalna efikasnost industrijskog bioprocesa, poželjno je da radni organizam bude otporan na širok raspon parametara procesnih uvjeta te da efikasno proizvodi željeni proizvod. Nekonvencionalni kvasci predstavljaju raznoliku skupinu organizama od kojih pojedine vrste prirodno posjeduju razne biotehnološki interesantne karakteristike te se sve češće koriste u proizvodnji. U skupinu nekonvencionalnih kvasaca spadaju i vrste iz roda *Schwanniomyces*, koje osim mogućnosti rasta na različitim izvorima ugljika pokazuju i efikasnu sekreciju proteina velike molekulske mase u podlogu. Unatoč navedenim prednostima, mnoge vrste ovog roda još uvijek nisu detaljno istražene zbog nedostatka prikladnih metoda za genetičku transformaciju i ciljane genetičke modifikacije. Stoga je cilj ovog rada bio transformirati kvasce *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*, *Schwanniomyces capriottii* i *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii*, te ispitati aktivnost ishodišta replikacije iz različitih vrsta kvasaca korištenjem plazmidnih vektora.

Ključne riječi: genetička transformacija, nekonvencionalni kvasci, rod *Schwanniomyces*, plazmidi

Rad sadrži: 45 stranica, 8 slika, 3 tablice, 63 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Igor Slivac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić (mentor)
3. prof. dr. sc. Ivan Krešimir Svetec (član)
4. prof. dr. sc. Renata Teparić (zamjenski član)

Datum obrane: 27. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

CHARACTERIZATION AND GENETIC TRANSFORMATION OF SELECTED SPECIES OF UNCONVENTIONAL YEASTS FROM THE GENUS *Schwanniomyces*

Ana Slišković, univ. bacc.ing. biotechn. 0058210210

Abstract: In order to achieve the maximum efficiency of industrial bioprocesses, it is desirable for the working organism to be resistant to a wide range of process conditions and to efficiently produce the desired product. Non-conventional yeasts represent a diverse group of organisms, some species of which naturally possess various biotechnologically interesting characteristics and are increasingly used in production. The group of non-conventional yeasts also includes species from the genus *Schwanniomyces*, which, in addition to the ability to grow on different carbon sources, also show efficient secretion of high molecular weight proteins into the substrate. Despite the mentioned advantages, many species of this genus have not yet been investigated in detail due to the lack of suitable methods for genetic transformation and targeted genetic modification. Therefore, the aim of this work was to transform the yeast *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*, *Schwanniomyces capriottii* and *Schwanniomyces vanriijiae* var. *yarrowii*, and to examine the activity of origins of replication from different yeast species using plasmid vectors.

Keywords: genetic transformation, unconventional yeasts, genus *Schwanniomyces*, plasmid vectors

Thesis contains: 45 pages, 8 figures, 3 tables, 63 references

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: Marina Svetec Miklenić, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Igor Slivac, PhD, Full professor (president)
2. Marina Svetec Miklenić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ivan Krešimir Svetec, PhD, Full professor (member)
4. Renata Teparić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 27th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. NEKONVENCIONALNI KVASCI I NJIHOVA VAŽNOST U BIOTEHNOLOGIJI	2
2.1.1. <i>Yarrowia lipolytica</i>	2
2.1.2. <i>Pichia pastoris</i> i <i>Hansenula polymorpha</i>	3
2.1.3. <i>Kluyveromyces lactis</i> i <i>Kluyveromyces marxianus</i>	3
2.1.4. <i>Blastobotrys adeninivorans</i>	4
2.1.5. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	4
2.2. METODE ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU I CILJANU MODIFIKACIJU NEKONVENCIONALNIH KVASACA	4
2.2.1. Metode za transformaciju stanica kvasca.....	5
2.2.2. Strategije za ciljanu genetičku modifikaciju kvasaca.....	6
2.2.3. Metode za genetičke modifikacije kod predstavnika nekonvencionalnih kvasaca	10
2.3. KVASCI RODA <i>Schwanniomyces</i>	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Plazmidi.....	14
3.1.2. Mikroorganizmi.....	16
3.1.3. Hranjive podloge i otopine	16
3.1.4. Kemikalije i enzimi	22
3.2. METODE	24
3.2.1. Uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	24
3.2.2. Uzgoj kvasaca roda <i>Schwanniomyces</i>	24
3.2.3. Izolacija plazmidne DNA iz tekuće bakterijske kulture.....	24
3.2.4. Pročišćavanje izolirane DNA fenolizacijom	25
3.2.5. Taloženje DNA pomoću amonijevog acetata.....	25
3.2.6. Cijepanje izolirane DNA restrikcijskim enzimima	25
3.2.7. Gel-elektroforeza.....	25
3.2.8. Izolacija genomske DNA iz kvasca.....	26
3.2.9. Transformacija kvasaca elektroporacijom.....	26
3.2.10. Hibridizacija DNA po Southernu	27
3.2.11. Određivanje generacijskog vremena	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. ODREĐIVANJE GENERACIJSKOG VREMENA	29
4.2. ODREĐIVANJE OSJETLJIVOSTI ODABRANIH VRSTA KVASACA NA ANTIBIOTIK HIGROMICIN B	30
4.3. IZOLACIJA PLAZMIDA ZA TRANSFORMACIJU KVASACA	31
4.4. TRANSFORMACIJA KVASACA RODA <i>Schwanniomyces</i>	33

4.5. MOLEKULARNA ANALIZA HIBRIDIZACIJOM DNA PO SOUTHERNU.....	36
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Kvasci igraju iznimno značajnu ulogu u proizvodnji hrane i pića od samih začetaka civilizacije. Najrasprostranjenija i najbolje opisana vrsta kvasca je *Saccharomyces cerevisiae*, koji se tisućljećima koristi u fermentacijskim procesima proizvodnje kruha, piva, vina i drugih alkoholnih pića. U modernoj biotehnološkoj industriji, *S. cerevisiae* je jedan od glavnih radnih mikroorganizama zahvaljujući GRAS-statusu, toleranciji na visoke koncentracije etanola, niske vrijednosti pH te detaljno istraženim metaboličkim procesima, fiziologiji i genetici (Nevoigt, 2008). Upravo zbog detaljno opisanog genoma i dostupnosti velikog broja alata za postizanje željenih genetičkih modifikacija, *S. cerevisiae* se koristi kao modelni organizam u istraživanju genetike eukariota te je primjenu pronašao i u proizvodnji heterolognih proteina. No, osim navedenih pozitivnih karakteristika, *S. cerevisiae* ima i određene nedostatke. Naime, moderni industrijski procesi od radnog organizma zahtijevaju otpornost na širok raspon procesnih uvjeta uključujući visoke temperature, osmotski tlak te visoke koncentracije inhibitornih nusproizvoda uz visoke prinose željenih proizvoda. Nekonvencionalni kvasci prirodno posjeduju širok raspon poželjnih karakteristika koje im pružaju prednost u odnosu na *S. cerevisiae*. Neke od tih prednosti su tolerancija na ekstremne okolišne uvijete, mogućnost rasta na različitim izvorima ugljika te efikasna sekrecija i glikozilacija heterolognih proteina (Patra i sur., 2021).

Kako bi se proširila uporaba nekonvencionalnih kvasaca u biotehnološkim procesima, poželjno je moći mijenjati njihove karakteristike primjenom genetičkog inženjerstva. Za uspješnu genetičku modifikaciju potrebno je moći transformirati stanice kvasca stranom DNA. Osim toga, od velike je važnosti dostupnost različitih stabilnih i replikativnih plazmidnih vektora koji se u stanicama održavaju u velikom broju kopija, uz stabilnu razinu ekspresije odabranih gena. Stoga su ciljevi ovog rada transformirati kvasce *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*, *Schwanniomyces capriottii* i *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii*, te ispitati aktivnost ishodišta replikacije iz različitih vrsta kvasaca korištenjem plazmidnih vektora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NEKONVENCIONALNI KVASCI I NJIHOVA VAŽNOST U BIOTEHNOLOGIJI

Nekonvencionalnim se kvascima smatraju sve vrste kvasaca osim *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, vrsta koje se tisućljećima koriste u biotehnološkim procesima (Spencer i sur., 2002). Pojedine vrste kvasaca prirodno posjeduju poželjne karakteristike poput osmotolerancije, termotolerancije, tolerancije na visoki tlak i visoke koncentracije inhibitora rasta i fermentacije, posjedovanja specifičnih metaboličkih puteva, visoke efikasnosti proizvodnje raznolikih proizvoda, mogućnosti rasta na raznovrsnim izvorima ugljika i slično (Rebello i sur., 2018). Osim toga, neke vrste nekonvencionalnih kvasaca pokazale su se prikladnima za proizvodnju rekombinantnih proteina jer, za razliku od *S. cerevisiae*, prilikom posttranslacijskih modifikacija ne dolazi do prekomjerne glikozilacije proteina i dodavanja manoze koja se smatra alergenom (Stöckmann i sur., 2009). Zahvaljujući navedenim karakteristikama, nekonvencionalni kvasci predstavljaju obećavajuću alternativu u suvremenim industrijskim bioprocima.

Nekonvencionalni kvasci predstavljaju heterogenu skupinu od 1600 vrsta kvasaca od kojih je velika većina slabo okarakterizirana (Garay i sur., 2016). Neki od najznačajnijih predstavnika ove skupine koji su pronašli upotrebu u biotehnologiji su: *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Blastobotrys adenivorans* te *Scheffersomyces stipitis*. Uzevši u obzir brojnost vrsta koje još nisu detaljno istražene, lako je zaključiti da će se mnoge druge vrste u budućnosti pokazati kao biotehnološki interesantne.

2.1.1. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica je nepatogeni, aerobni, heterotalični, dimorfni kvasac koji se ističe zbog mogućnosti rasta na hidrofobnim supstratima zahvaljujući specifičnim metaboličkim putevima razgradnje alkana, masnih kiselina i triglicerida (Fickers i sur., 2005). *Y. lipolytica* se smatra oleaginoznim kvascem jer ima sposobnost nakupljanja lipida s udjelom od 36 % u suhoj tvari biomase (Beopoulos i sur., 2009). Pri rastu na alkanima, ova vrsta proizvodi citratnu i izocitratnu kiselinu u omjeru 60:40 (Akiyama i sur., 2014). Osim toga, ovaj kvasac prirodno pokazuje efikasnu sekreciju proteina poput lipaza, esteraza, proteaza, fosfataza i RNaza (Barth i Gaillardin, 1997). Zahvaljujući navedenim svojstvima, kvasac *Y. lipolytica* se koristi u

procesima bioremedijacije, u industrijskoj proizvodnji heterolognih proteina, citratne i izocitratne kiseline, γ -dekalaktona, deterdženata te kao modelni organizam u istraživanjima mehanizama sekrecije proteina i dimorfizma (Gonçalves i sur., 2014).

2.1.2. *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha*

Pichia pastoris i *Hansenula polymorpha* su jedne od rijetkih vrsta kvasaca koje mogu rasti na metanolu kao jedinom izvoru ugljika. Obje vrste prilikom uzgoja dostižu visoke koncentracije biomase, a *Hansenula polymorpha* može rasti pri temperaturi od 42 °C te asimilirati nitrata (Mattanovich i sur., 2012). Obzirom da je za rast na metanolu potrebna visoka razina ekspresije enzima koji sudjeluju u metabolizmu metanola, poput enzima alkohol oksidaze, ove vrste kvasaca posjeduju snažne i visoko regulirane promotore. Navedeni su promotori prikladni za kontroliranu heterolognu ekspresiju gena te su iskorišteni za konstrukciju velikog broja ekspresijskih vektora (Gellissen i sur., 2005). Upravo je velika dostupnost različitih ekspresijskih sustava dovela do široke primjene ovih vrsta u proizvodnji rekombinantnih proteina i farmaceutika poput faktora rasta sličnog inzulinu (IGF), humanog serumskog albumina, enzima fitaze te cjepiva za hepatitis B (Gellissen, 2000).

2.1.3. *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces lactis i *Kluyveromyces marxianus* su nepatogene vrste kvasaca koje metaboliziraju laktozu a izolirane su iz jogurta, kefir, sira i trulog voća (Spencer i sur., 2002). Od ove dvije vrste, *K. lactis* je detaljnije istražen te ima višegodišnju široku primjenu u biotehnologiji. Obzirom da ovaj kvasac razgrađuje laktozu, od sredine prošlog stoljeća se koristi za dobivanje enzima β -galaktozidaze koji je nužan za proizvodnju mliječnih proizvoda bez laktoze. Upravo je dugogodišnja industrijska primjena te detaljna karakterizacija omogućila razvoj sustava za ekspresiju heterolognih gena u ovoj vrsti te se *K. lactis* koristi za industrijsku proizvodnju velikog broja proteina, primjerice prokimozina i humanog serumskog albumina (van Ooyen i sur., 2006). *K. marxianus* je termotolerantni kvasac koji može metabolizirati ksilitol, ksilozu, celobiozu, laktozu, arabinozu i glicerol zbog čega ima velik potencijal za primjenu u proizvodnji etanola iz lignoceluloznih sirovina pri visokim temperaturama (Nonklang i sur., 2008).

2.1.4. *Blastobotrys adeninivorans*

Blastobotrys adeninivorans, prethodno poznat kao *Arxula adeninivorans*, je nepatogeni, termotolerantni, halotolerantni i kserotolerantni kvasac koji može rasti pri temperaturi od 48 °C te na hranjivim podlogama s koncentracijom NaCl do 20 % (Wartmann i Kunze, 2000). Osim različitih ugljikohidrata i organskih kiselina poput ksiloze, škroba i mokraćne kiseline, ova vrsta kao jedini izvor ugljika može koristiti spojeve kao što su aminokiseline, purini adenin i ksantin, te amini butilamin i pentilamin (Middelhoven i sur., 1984). Uzevši u obzir otpornost ove vrste na različite okolišne uvijete te brojnost specifičnih metaboličkih puteva koje posjeduje, *B. adeninivorans* se koristi u proizvodnji heterolognih kao i endogenih proteina te služi kao izvor gena koji kodiraju za biotehnoški korisne enzime.

2.1.5. *Scheffersomyces stipitis*

Scheffersomyces stipitis je Crabtree-negativni kvasac izoliran iz trulog drva koji može metabolizirati glukozu, manozu, ksilozu i celobiozu do etanola u anaerobnim uvjetima (Parekh i Wayman, 1986). Pri uzgoju na hidroliziranom drvu, proizvodnja etanola može dostići koncentracije do 41 g L⁻¹, uz minimalnu proizvodnju ksilitola što *S. stipitis* čini prikladnim za proizvodnju bioetanolu iz lignoceluloznih sirovina (Parekh i sur., 1988). Osim toga, *S. Stipitis* može reducirati aldehidnu skupinu furanskog prstena u 5-hidroksimetilfurfuralu te metabolizirati octenu kiselinu što ga čini prirodno otpornim na glavne toksine koji nastaju pri obradi lignoceluloznih sirovina (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008). Razvoj prikladnih alata za genetičku modifikaciju ove vrste otežava činjenica da *S. stipitis* spada u skupinu kvasaca kod kojih kodon CTG kodira za aminokiselinu serin umjesto leucina.

2.2. METODE ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU I CILJANU MODIFIKACIJU NEKONVENCIONALNIH KVASACA

Kako bi se maksimalno iskoristio potencijal nekonvencionalnih kvasaca te se unaprijedile njihove poželjne karakteristike, potrebno ih je moći genetički modificirati. Genetička modifikacija nekonvencionalnih kvasaca zahtjevnija je u odnosu na modifikaciju *S. cerevisiae* obzirom na manje poznate genome i metaboličke puteve te slabu dostupnost prikladnih strategija i alata. No većina klasičnih metoda za genetičku transformaciju i modifikaciju kvasca *S. cerevisiae* je primjenjiva kod nekonvencionalnih kvasaca uz određene prilagodbe za svaku pojedinu vrstu.

2.2.1. Metode za transformaciju stanica kvasca

Transformacija je definirana kao tehnika unosa egzogene DNA u stanicu koja rezultira određenom genetičkom modifikacijom. Egzogen DNA prvo mora proći kroz staničnu stijenku i staničnu membranu te ući u citosol kako bi na kraju dospjela u jezgru (Kawai i sur., 2010). Obzirom na to, metode transformacije se mogu podijeliti na transformaciju protoplasta (stanica kod kojih je stanična stijenka enzimski razgrađena) te metode za transformaciju cjelovitih stanica, a to su elektroporacija, transformacija pomoću iona litija, biolistička transformacija te transformacija staklenim kuglicama (Gietz i Woods, 2001).

Metoda transformacije protoplasta uključuje enzimsku razgradnju stanične stijenke, unos egzogene DNA uz dodatak polietilen glikola (PEG) te CaCl_2 te ponovnu regeneraciju stanične stijenke (Burgers i Percival, 1987). Efikasnost transformacije protoplasta jako ovisi o samoj koncentraciji protoplasta, trajanju enzimske razgradnje te koncentraciji i vrsti egzogene DNA. Burgers i Percival (1987) su pokazali da se najviša efikasnost transformacije postiže uz niže koncentracije stanica (oko 5×10^7 stanica mL^{-1}), visoke koncentracije enzima kako bi se u što kraćem vremenu razgradile stijenke kod 90 % tretiranih stanica, uz niže koncentracije protoplasta te korištenjem jednolančane DNA. Iako ova metoda ne zahtjeva posebnu opremu te je prikladna za transformaciju stanica s velikim molekulama DNA, rijetko se koristi upravo zbog osjetljivog procesa razgradnje i regeneracije stijenke (Kawai i sur., 2010).

Ito i sur. (1983) su prvi pokazali da je moguće transformirati netaknute, cjelovite stanice kvasca *S. cerevisiae* uz dodatak jednovalentnih kationa poput Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ i Li^+ , te da korištenje Li^+ pokazuje najznačajnije povećanje efikasnosti transformacije. Osim toga, pokazali su kako je za uspješnu transformaciju nužno inkubirati cjelovite stanice u smjesi plazmidne DNA i PEG, da dodatak LiAc i toplinski šok pospješuju efikasnost transformacije te da je efikasnost najveća ako se transformiraju stanice koje se nalaze u sredini eksponencijalne faze rasta. Metoda je kroz vrijeme doručena, a neke od prilagodbi uključuju dodatak jednolančane DNA, 2-merkaptoetanol, ditionitrola (DTT), dimetil sulfoksida (DMSO) te etanola (Kawai i sur., 2010). Ova je metoda jedna od najčešće korištenih metoda transformacije jer je u odnosu na transformaciju protoplasta puno jednostavnija i brža.

Transformacija stanica kvasca elektroporacijom je temeljena na izlaganju stanica električnom pulsu visoke voltaže. Iako mehanizam elektroporacije nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da električni puls privremeno destabilizira staničnu membranu formirajući

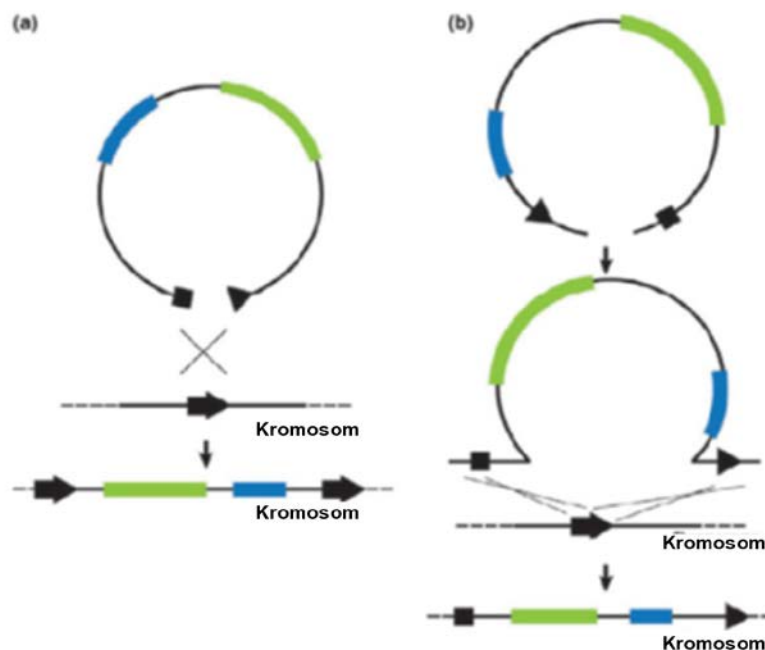
pritom pore koje olakšavaju prolazak makromolekula kroz membranu (Potter, 1993). Na efikasnost transformacije utječu parametri elektroporacije, odnosno jakost električnog polja, električni kapacitet i otpor, te način pripreme, odnosno tretiranja stanica (Gietz i Woods, 2001). Svaki od navedenih parametara potrebno je prilagoditi pojedinačnim vrstama i sojevima koji se transformiraju kako bi se postigla maksimalna efikasnost. U usporedbi s transformacijom protoplasta te transformacijom pomoću LiAc, ova je metoda vremenski znatno kraća ali zahtjeva korištenje specijalizirane opreme, odnosno elektroporatora.

Uspješan unos i ekspresija egzogene DNA u stanicama kvasca obuhvaća i korištenje vektora koji se može samostalno replicirati ili integrirati u genom kvasca. Takav vektor mora sadržavati selektivni marker, najčešće gen za rezistenciju na antibiotik ili auksotrofni marker, kako bi se omogućila selekcija stanica koje sadrže egzogenu DNA. U odnosu na kvasac *S. cerevisiae*, samo su za malobrojne vrste nekonvencionalnih kvasaca dostupni replikativni plazmidni vektori koji se u stanicama stabilno održavaju u velikom broju kopija (Löbs i sur., 2017).

2.2.2. Strategije za ciljanu genetičku modifikaciju kvasaca

Ciljane genetičke modifikacije se definiraju kao mjesno-specifične modifikacije genoma te uključuju ciljane disrupcije, delecije i integracije gena te točkaste mutacije (Yang i Blenner, 2020). Obzirom da je kod industrijske primjene genetički modificiranih sojeva izrazito bitna dugotrajna stabilnost te homogena ekspresija heterolognih gena, kao i mogućnost ekspresije više različitih heterolognih gena, integracija u kromosome se preferira nad korištenjem replikativnih plazmida (da Silva i Srikrishnan, 2012). Integracija heterolognih gena i metode inaktivacije gena (engl. *knockout*) su temeljene na endogenim mehanizmima popravka dvolančanih lomova DNA, odnosno homolognoj rekombinaciji (HR) te ilegitimnoj rekombinaciji (engl. *Non-homologous end joining, NHEJ*). Uzevši u obzir da prilikom ilegitimne rekombinacije dolazi do nasumične integracije heterolognih gena unutar genoma, što može uzrokovati neželjene promjene fenotipa soja te varijabilnu ekspresiju heterolognog gena, preferirani je mehanizam homologna rekombinacija koja omogućava mjesno-specifične modifikacije. U odnosu na kvasac *S. cerevisiae*, većina nekonvencionalnih vrsta kvasaca preferira ilegitimnu rekombinaciju kao primarni mehanizam popravka DNA zbog čega su za pojedine vrste razvijene različite strategije za pospješivanje homologne rekombinacije (Löbs i sur., 2017).

U svrhu ciljane integracije, delecije ili disrupcije određenog gena, koriste se linearizirani integrativni plazmidni vektori koji ne sadrže aktivno ishodište replikacije. Ovisno o ciljanom ishodu, navedeni vektori mogu biti konstruirani na različite načine no zajednička karakteristika je da sadrže regije homologne ciljanoj regiji u genomu kvasca, te željeni gen i selektivni marker. U slučaju vektora za rekombinaciju „krajevi-unutra“ (engl. *ends-in*), željeni gen i selektivni marker se nalaze van homologne regije unutar koje se vektor linearizira. Integracija ovakvog vektora u ciljnu regiju u genomu rezultat je jednostruke recipročne izmjene, pri čemu dolazi do duplikacije ciljanog gena, odnosno ciljane regije DNA. Ukoliko je cilj disrupcija gena, homologna regija integrirana u vektor se može konstruirati na način da sadrži „krajnje“ 5' i 3' krajeve ciljanog gena što rezultira dvjema nepotpunim kopijama tog gena (Klinner i Schäfer, 2004). Obzirom da se integrirani gen u genomu nalazi između dva istosmjerna ponavljanja, ciljane insercije provedene ovom metodom su strukturno nestabilne zbog učestale homologne rekombinacije između dvaju ponavljanja, odnosno takozvanog *pop-outa* (da Silva i Srikrishnan, 2012). Osim navedenih *ends-in* vektora, često su korišteni i linearni fragmenti DNA koji podliježu rekombinaciji „krajevi-van“ (engl. *ends-out*), odnosno zamijeni gena. Kod takvih su fragmenata željeni gen i selektivni marker na 5' i 3' krajevima omeđeni regijama DNA homolognim ciljanom mjestu u genomu. Integracija u genom je rezultat dvostruke recipročne izmjene, te je stabilnija u odnosu na *ends-in* integraciju jer ne dolazi do duplikacije gena, ali je efikasnost integracije manja (da Silva i Srikrishnan, 2012). Na slici 1 se nalazi shematski prikaz *ends-in* i *ends-out* rekombinacije.

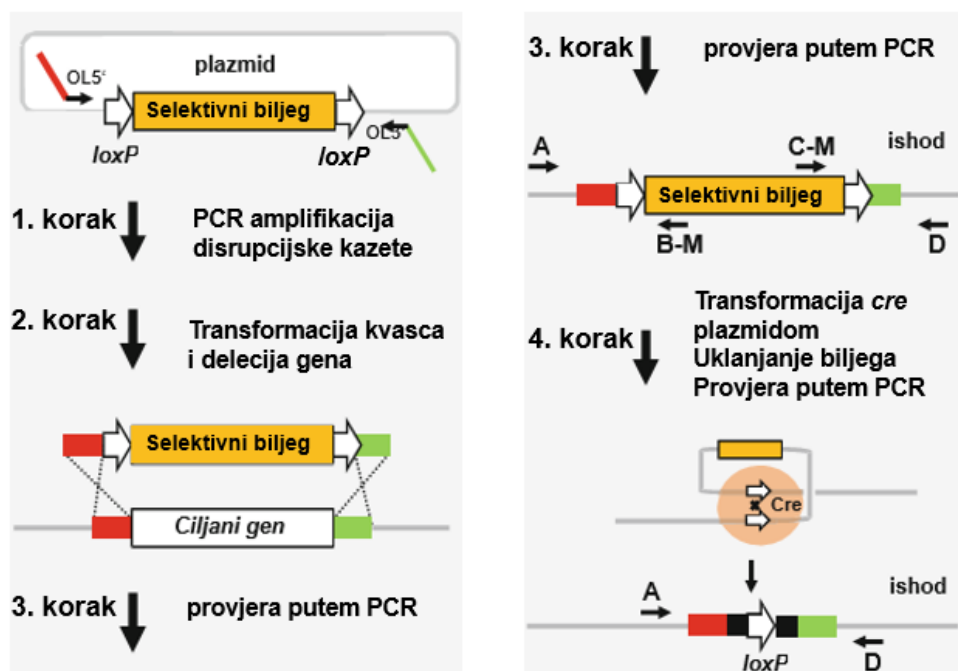


Slika 1. Shematski prikaz rekombinacije *ends-in* i *ends-out* (prema da Silva i Srikrishnan, 2012). (a) *ends-in* vektor je lineariziran unutar sekvence homologne ciljanoj sekvenci DNA (crne strelice). Vektor se u kromosom integrira jednostrukom recipročnom izmjenom prilikom čega dolazi do duplikacije ciljane sekvence. (b) linearni fragment DNA koji podliježe rekombinaciji *ends-out* kod kojega su željeni gen i selektivni biljeg (zeleno i plavo) omeđeni sekvencama homolognim ciljanoj sekvenci DNA. Do integracije u kromosom dolazi zbog dvostruke recipročne izmjene.

Kako bi se pojednostavio proces konstrukcije vektora, Baudin i suradnici (1993) su razvili efikasni protokol korištenjem lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). Obzirom da je kod kvasca *S. cerevisiae* za uspješnu ciljanu modifikaciju potrebna homologna regija duljine oko 50 parova baza, moguće je konstruirati početnice za PCR koje su jednim dijelom homologne ciljanoj regiji genoma a drugim dijelom homologne genu za selekciju transformiranih stanica. Na taj način je moguće u jednom koraku umnožiti fragment DNA koji na oba kraja sadrži kratke regije homologne ciljanom genu, između kojih se nalazi selektivni marker. Ovako sintetizirana DNA može se bez pročišćavanja koristiti kao disrupcijska kazeta za deleciju ciljanog gena.

Za primjenu u industriji je često nužno konstruirati sojeve koji eksprimiraju više različitih heteroloških enzima koji sudjeluju u specifičnom metaboličkom putu. Za konstrukciju takvih

sojeva potrebno je provesti više uzastopnih genetičkih modifikacija. Uzevši u obzir ograničen broj selektivnih markera, kao i činjenicu da nekada nije poželjno da industrijski soj posjeduje karakteristike poput rezistencije na antibiotik, nužno je takve selektivne markere moći ukloniti iz genoma kako bi se omogućila njihova ponovna upotreba (Hegemann i sur., 2014). Navedeno se može postići korištenjem Cre-*loxP* sustava koji se sastoji od enzima Cre rekombinaze te njegovog supstrata, DNA sekvence koja se naziva *loxP*. Godine 1996., Güldener i suradnici su konstruirali disrupcijsku kazetu koja sadrži gen za rezistenciju na antibiotik koji je sa oba kraja omeđen sekvencama *loxP*. Ekspresijom enzima Cre rekombinaze, dolazi do ekscizije selektivnog markera zbog rekombinacije između dvije *loxP* sekvence. Na ciljanom mjestu u genomu pritom ostaje samo jedna *loxP* sekvenca, te se isti selektivni marker može upotrijebiti za kasnije modifikacije. Na slici 2 se nalazi shematski prikaz opisanog procesa u kombinaciji s prethodno opisanim procesom konstrukcije vektora pomoću PCR.



Slika 2. Shematski prikaz ciljne delecije gena pomoću disrupcijske kazete umnožene PCR-om, te naknadno uklanjanje selektivnog biljega pomoću Cre/*loxP* sustava (prema Hegemann i sur., 2014). Prvi korak obuhvaća amplifikaciju disrupcijske kazete sa selektivnim biljekom omeđenim *loxP* regijama korištenjem oligonukleotidnih početnica koje su jednim dijelom homologne ciljanoj regiji u genomu (crvena i zelena boja). Drugi korak je transformacija kvasca transformirajućom DNA te delecija gena. Treći korak uključuje provjeru uspješne integracije korištenjem parova početnica A i B-M, te C-M i D. Posljednji korak uključuje transformaciju

kvasca plazmidom koji sadrži gen za rekombinazu Cre, ekspresiju rekombinaze Cre, izrezivanje biljega i konačnu provjeru pomoću PCR korištenjem početnica A i D.

U posljednjih nekoliko godina, razvojem sustava CRISPR-Cas9 omogućeno je precizno modificiranje genoma u različitim organizmima. Sustav CRISPR-Cas bakterijama pruža određenu vrstu imunosti protiv bakteriofaga, odnosno stranog genetičkog materijala, pri čemu CRISPR predstavlja grupirana kratka palindromska ponavljanja između kojih se nalaze razmaknice (engl. *clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats, CRISPR*), a Cas predstavlja CRISPR-asociranu nukleazu (Gasiunas i sur., 2012). Nukleaza Cas9 stupa u kompleks s dvije kratke molekule RNA, crRNA (crisprRNA) koja je komplementarna razmaknici, te tracrRNA. Ovaj ribonukleoproteinski kompleks prepoznaje specifičnu sekvencu u molekuli DNA te uvodi dvolančani lom na specifičnom mjestu. Navedeni je kompleks moguće programirati da cijepa željenu molekulu DNA u točno određenom mjestu konstrukcijom specifične RNA molekule komplementarne ciljanoj sekvenci (Jinek i sur., 2012). Za uspješnu primjenu ovog sustava u stanicama kvasca potrebno je konstruirati ekspresijski vektor koji sadrži gen za nukleazu Cas9, izoliran iz bakterije *Streptococcus pyogenes*, kojemu je na C-terminus dodan signal za transport u jezgru, te kratka sgRNA (engl. *single guide RNA*). Konstruirana molekula sgRNA na 5' kraju sadrži sekvencu duljine oko 20 parova baza koja je komplementarna ciljanoj DNA, a na 3' kraju sekvencu koja stupa u interakciju s Cas9 proteinom (Löbs i sur., 2017). Uvedeni dvolančani lom se može popraviti ligacijom krajeva loma (NHEJ), što često rezultira nasumičnom mutacijom, ili se dodatkom specifične DNA sekvence može inducirati popravak putem homologne rekombinacije te insercija željene sekvence u genom.

2.2.3. Metode za genetičke modifikacije kod predstavnika nekonvencionalnih kvasaca

2.2.3.1. *Yarrowia lipolytica*

Kvasac *Yarrowia lipolytica* je uspješno transformiran metodom s LiAc te elektroporacijom, no najveća je efikasnost transformacije ($2,8 \times 10^4$ transformanata po μg DNA) postignuta prilagođenim protokolom elektroporacije kojega su razvili Markham i suradnici (2018). Vernis i sur. (2001) su pokazali da autonomna replicirajuća sekvenca (ARS) u kvascu *Yarrowia lipolytica* osim ishodišta replikacije zahtjeva i centromernu DNA za uspješno održavanje plazmida. Također je bitno naglasiti da je ilegitalna rekombinacija dominantni mehanizam popravka dvolančanih lomova DNA u ovoj vrsti. Zbog toga je za ciljanu genetičku modifikaciju nužno pospješiti homolognu rekombinaciju inaktivacijom gena *KU70* i *KU80*, koji

kodiraju za proteine koji sudjeluju u ilegitalimnoj rekombinaciji (Verbeke i sur., 2013). Homolognu je rekombinaciju također moguće pospješiti zaustavljanjem stanica u S fazi staničnog ciklusa dodatkom hidroksiuree kulturi stanica u eksponencijalnoj fazi rasta (Tsakraklides i sur., 2015). Efikasne precizne modifikacije postignute su primjenom sustava CRISPR/Cas9 uz korištenje sintetičkog hibridnog promotora, koji kombinira nativni promotor RNA polimeraze III i tRNA, za transkripciju sgRNA (Schwartz i sur., 2016).

2.2.3.2. Metilotrofni kvasci *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha*

Metilotrofni kvasac *Pichia pastoris* je transformiran s visokom efikasnošću metodom transformacije protoplasta te elektroporacijom uz dodatak 100 mM LiAc te 10 mM DTT (Kawai i sur., 2010). Kao što je spomenuto u poglavlju 2.1.2., za konstrukciju ekspresijskih vektora koriste se endogeni, snažni i visoko regulirani promotori gena koji kodiraju za enzime alkohol oksidaze. No, kako je razina ekspresije heterolognih gena korištenjem replikativnih plazmida niska, preferira se integracija u genom (Gellissen i sur., 2005). Ovaj kvasac također preferira ilegitalimnu rekombinaciju zbog čega je za ciljne genetičke modifikacije nužno pospješiti homolognu rekombinaciju delecijom gena *KU70* ili zaustavljanjem staničnog ciklusa u S fazi (Löbs i sur., 2017). Za transformaciju i genetičku modifikaciju metilotrofnog kvasca *Hansenula polymorpha* najčešće se koriste vektori koji sadrže promotore gena koji kodira za alkohol oksidazu (P_{AOX}) u kombinaciji s terminatorom gena koji kodira za aminooksidazu (AMO). Obzirom da za ovu vrstu nema dostupnih stabilnih replikativnih plazmida, plazmidi koji sadrže promotore P_{AOX} , P_{AMO} i P_{TEF1} se lineariziraju cijepanjem unutar promotorske regije čime se osigurava ciljana integracija u *AOX*, *AMO* i *TEF1* lokuse. Efikasnost homologne rekombinacije se pospješuje delecijom gena *KU80* (Saraya i sur., 2012).

2.2.3.3. *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus je do sada uspješno transformiran elektroporacijom te metodom s LiAc, no uz niske efikasnosti. Lyu i suradnici (2021.) su razvili prilagođeni protokol za transformaciju protoplasta koji uključuje tretiranje stanica koje se nalaze u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta zimoliazom te transformaciju pri 0 °C uz dodatak PEG, CaCl₂ te 5 µL DNA nosača. Navedeni je protokol omogućio efikasnu transformaciju *K. marxianus* plazmidnim vektorima veličine do 58 kb. Za transformaciju kvasca *Kluyveromyces lactis* razvijen je prilagođen protokol elektroporacije uz efikasnost od 10⁶ do 10⁷ transformanata po µg DNA (Sanchez i sur., 1993). Dominantni mehanizam popravka dvolančanih lomova DNA kod

obje vrste je ilegitalna rekombinacija, te se homologna rekombinacija može značajno pospješiti inaktivacijom gena *KU70* kod *K. marxianus* te gena *KU80* kod *K. lactis* (Löbs i sur., 2017). Za ciljanu genetičku modifikaciju genoma *K. lactis* primijenjen je sustav umnažanja disrupcijske kasete pomoću PCR, uz primjenu *Cre/loxP* sustava za višestruku primjenu selektivnog biljega (Wésolowski-Louvel, 2011).

2.2.3.4. *Scheffersomyces stipitis*

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* uspješno je transformiran elektroporacijom te je efikasnost transformacije moguće višestruko poboljšati povećanjem voltaže do 2.5 kv (Cao i sur., 2018). Kao i kod prethodno opisanih vrsta, dominantni mehanizam popravka DNA kod *S. stipitis* je ilegitalna rekombinacija pa se homologna rekombinacija pospješuje delecijom gena *KU70* i *KU80*. Za stabilnu replikaciju i segregaciju plazmidnih vektora u ovoj vrsti nužna je centromerna DNA. Osim što insercija centromerne DNA stabilizira vektor, također omogućava povećanu ekspresiju heterolognih gena, te povećava efikasnost ciljane disrupcije gena ukoliko se takav vektor koristi za ekspresiju komponenti sustava CRISPR/Cas9 (Cao i sur., 2017).

2.3. KVASCI RODA *Schwanniomyces*

Kvasce roda *Schwanniomyces* prvi je opisao Kloecker 1909. godine. Pojedine vrste ovog roda su biotehnološki interesantne zbog sposobnosti razgradnje različitih izvora ugljika poput škroba, ksiloze, alkana, celobioze, L-arabinoze, inulina i slično. Osim toga, bitno je naglasiti da pojedine vrste roda *Schwanniomyces* posjeduju sposobnost efikasne sekrecije visokih koncentracija amilolitičkih enzima glukoamilaze i α -amilaze (Ingledew, 1987). Ove vrste imaju visok potencijal u proizvodnji etanola iz jeftinih sirovina poput lignoceluloze zbog činjenice da mogu efikasno metabolizirati škrob, ksilozu i celobiozu do etanola. Međutim, jedna od glavnih prepreka u razvoju ovih kvasaca za industrijsku primjenu je izrazito niska tolerancija na etanol (de Mot i sur., 1985). Potpuni potencijal za industrijsku primjenu ovih vrsta može se postići primjenom metaboličkog i genetičkog inženjerstva. No, većina vrsta iz roda *Schwanniomyces* je još uvijek slabo istražena upravo zbog nedostatka prikladnih metoda i alata za genetičke modifikacije. Naime, vrste iz ovog roda spadaju u skupinu kvasaca kod kojih kodon CTG umjesto za aminokiselinu leucin kodira za serin, stoga je prilikom konstrukcije ekspresijskih vektora nužno provesti optimizaciju kodona.

Najznačajniji i najbolje istražen predstavnik ovog roda je haploidni kvasac *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*. Ovaj kvasac proizvodi mnogobrojne ekstracelularne enzime kao što su α -galaktozidaza, β -glukozidaza, inulinaza, invertaza, fitaza, te amilolitički enzimi glukoamilaza i α -amilaza (Wang i sur., 1999). *S. occidentalis* var. *occidentalis* kao izvor ugljika može koristiti glukozu, fruktozu, D-ksilozu, saharozu, rafinozu, celobiozu, trehalozu, sukcinat, citrat, alkane, pululan, dekstrin, maltozu i škrob (Dohmen i Hollenberg, 1996). Zbog efikasnog sustava za selekciju proteina velike molekulske mase, niske razine glikozilacije proteina i sposobnosti rasta na jeftinim sirovinama poput škroba iz krumpira, pšenice, ječma i kukuruza, ovaj se kvasac smatra idealnim sustavom za industrijsku proizvodnju heterolognih proteina (Wang i sur., 1999). Amilolitički sustav kvasca *S. occidentalis* var. *occidentalis* ima još jedno zanimljivo svojstvo. Naime, geni *AMY1* i *GAM1* koji kodiraju za enzime α -amilazu i glukoamilazu nalaze se pod kontrolom snažnih inducibilnih promotora. Ekspresija ovih gena inducirana je u prisustvu maltoze ili škroba, a reprimirana u prisustvu glukoze. Takvi promotori predstavljaju idealne regulatorne elemente za konstrukciju ekspresijskih vektora, te je promotor gena *GAM1* iskorišten pri konstrukciji vektora za reguliranu ekspresiju heterolognih gena u ovoj vrsti (Piontek i sur., 1998). Kvasac *S. occidentalis* moguće je transformirati s visokom efikasnošću elektroporacijom uz dodatak DTT, te pulsom u trajanju 18 ms jakosti $2,17 \text{ kV cm}^{-1}$ (Costaglioli i sur., 1994). Osim kao domaćin, ova je vrsta zahvaljujući svojim raznolikim metaboličkim putevima pronašla primjenu i kao donor gena za proizvodnju industrijski interesantnih enzima. Primjerice, gen za enzim fitazu iz *S. occidentalis* korišten je za transformaciju riže u svrhu povećanja nutritivne vrijednosti stočne hrane (Hamada i sur., 2005). Također, različiti geni koji kodiraju za α -amilazu uspješno su eksprimirani u kvascima *K. lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* i *S. cerevisiae*, u kojemu su aktivne dvije različite autonomno replicirajuće sekvence iz *S. occidentalis* (Wang i sur., 1999).

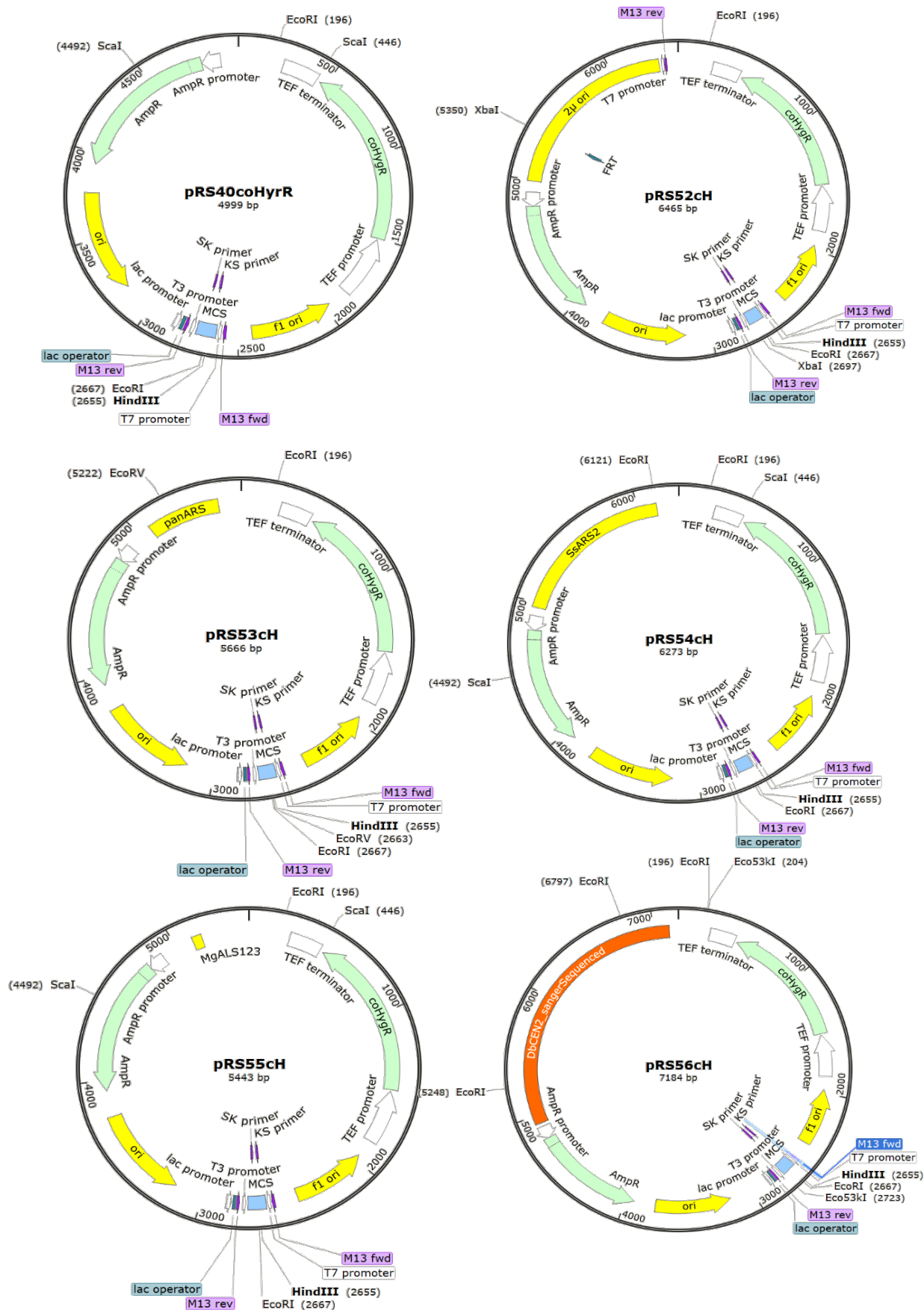
Obzirom da ostale vrste ovog roda nisu detaljno opisane, daljnja istraživanja su nužna kako bi se utvrdio njihov puni biotehnološki potencijal. Matanović i suradnici (2022) su konstruirali set replikativnih i integrativnih plazmida, optimizirali protokol za transformaciju elektroporacijom te uspješno transformirali vrste *S. pseudopolymorphus*, *S. polymorphus* var. *polymorphus* i *S. polymorphus* var. *africanus*. Konstruirani plazmidi te opisani protokol mogli bi poslužiti kao temeljni alati za daljnja istraživanja i biotehnološki razvoj drugih vrsta roda *Schwanniomyces*.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Plazmidi

Za transformaciju kvasaca roda *Schwanniomyces* korišteni su plazmidi pRS40cH, pRS52cH, pRS53cH, pRS54cH, pRS55cH te pRS56cH koji su prethodno konstruirani u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović i sur., 2022). Navedeni plazmidi sadrže sekvence DNA koje omogućuju njihovu propagaciju i održavanje u bakteriji *Escherichia coli*; bakterijsko ishodište replikacije (*ori*), gen *bla* koji kodira za enzim β -laktamazu, odnosno omogućuje rezistenciju na antibiotik ampicilin, višestruko mjesto za kloniranje (*MSC*) te ishodište replikacije iz filamentoznog bakteriofaga f1 (*f1-ori*). Nadalje, kako bi se omogućila selekcija transformiranih kvasaca, svi plazmidi sadrže gen za rezistenciju na antibiotik higromicin B (*coHygR*) koji je pod regulacijom *TEF* promotora i terminatora iz kvasca *Eremothecium gossypii*. Svi plazmidi, osim plazmida pRS40cH, sadrže ishodište replikacije iz različitih vrsta kvasaca. Plazmid pRS52cH sadrži ishodište replikacije plazmida 2μ iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Christianson i sur., 1992), plazmid pRS53cH sadrži ishodište replikacije *panARS* iz kvasca *Kluyveromyces lactis* (Liachko i Dunham, 2014), plazmid pRS54cH sadrži ishodište *SsARS2* iz kvasca *Scheffersomyces stipitis* (Yang i sur., 1994), plazmid pRS55cH sadrži ishodište *MgALS123* iz kvasca *Meyerozyma guilliermondii* (Foureau i sur., 2013), te plazmid pRS56cH koji sadrži regiju *BbCEN2* koja uključuje ishodište replikacije iz kvasca *Brettanomyces bruxellensis* (Ishchuk i sur., 2016). Obzirom da kod pojedinih vrsta kvasaca triplet CTG kodira za aminokiselinu serin umjesto za leucin, potrebno je navedeni kodon zamijeniti alternativnim kodonom za tu aminokiselinu kako bi se omogućila uspješna transformacija većeg broja nekonvencionalnih vrsta kvasaca. Stoga je kloniranju gena *HygR* prethodila optimizacija sastava kodona te *de novo* sinteza. Na slici 3 su prikazane mape plazmida na kojima su označeni svi navedeni geni, promotori i ishodišta replikacije kao i restriksijska mjesta za enzime korištene u ovom radu.



Slika 3. Mape korištenih plazmida. Na mapama su prikazane regije DNA relevantne za ovaj rad kao i restriksijska mjesta korištenih restriksijskih enzima.

3.1.2. Mikroorganizmi

U ovom su radu korištene četiri vrste kvasca roda *Schwanniomyces* te jedan soj bakterije *Escherichia coli*.

3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za propagaciju šest plazmida korištena je bakterija *E. coli*, soj DH5 α , genotipa: F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r_K⁻m_K⁺*), λ ⁻.*

3.1.2.2. Kvasci roda *Schwanniomyces*

U ovome su radu transformirane četiri različite vrste kvasca roda *Schwanniomyces*; *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis* JCM 8125, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii* JCM 8127^T, *Schwanniomyces capriottii* JCM 6177^T te *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii* JCM 6190^T. Svi sojevi potječu iz zbirke mikroorganizama JCM - *Japan Collection of Microorganisms, Japan*.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Podloge i otopine pripremljene su korištenjem sterilne deionizirane vode i sterilnih otopina ili su sterilizirane autoklaviranjem 20 min na temperaturi od 121 °C. Krute podloge su po sastavu jednake tekućim podlogama izuzev dodatka agara u koncentraciji od 15 g L⁻¹.

3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LB (kompletna podloga)

Bacto-tripton	10 g L ⁻¹
Kvašćev ekstrakt	5 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹

Podloga s antibiotikom ampicilinom:

Ampicilin se dodaje u pripremljenu i steriliziranu hranjivu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom koncentracije 20 mg mL⁻¹ do konačne koncentracije od 50 mg mL⁻¹ u krutoj podlozi, odnosno 100 mg mL⁻¹ u tekućoj hranjivoj podlozi.

3.1.3.2. *Kompletna podloga za uzgoj kvasaca roda Schwanniomyces (YPD)*

Bacto-pepton	20 g L ⁻¹
Kvašćev ekstrakt	10 g L ⁻¹
Glukoza	20 g L ⁻¹

Za selekciju transformiranih kvasaca u podlogu se dodaje antibiotik higromicin B u različitim koncentracijama za pojedine sojeve te za krutu i tekuću podlogu.

3.1.3.3. *Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA*

Amonijev acetat (8 M):

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4 °C.

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

186,1 g EDTA·2H₂O se otopi u 80 mL destilirane vode, pH se podesi dodatkom NaOH te se destilirana voda dopuni do ukupnog volumena od 100 mL.

Glukoza (40 g L⁻¹):

Otopina se sterilizira na 0,5 bara nadtlača.

GTE-pufer:

glukoza	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM

Pufer se neposredno prije uporabe pripremi iz sterilnih otopina.

Kalijev acetat (3 M):

Otopina se priprema na način da se u 60 mL 5 M otopine kalijeva acetata doda 11,5 mL hladne octene kiseline i 28,5 mL destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na temperaturi od 4 °C.

NaOH/SDS:

NaOH (6M)	0,2 mol L ⁻¹
SDS (10%)	10,0 g L ⁻¹

Otopina se priprema neposredno prije uporabe.

RNA-za:

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

TE-pufer (pH 7,4):

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

Priprema se iz sterilnih otopina.

Tris-HCl (1 M):

12,1 g Tris-a se otopi u 80 mL destilirane vode, pH se podesi se pomoću koncentrirane otopine HCl te se tikvica dopuni destiliranom vodom do oznake od 100 mL.

Fenol:

Redestilirani fenol se otapa pri 67 °C i zasićen je jednakim volumenom TE pufera (pH 8,0). Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri 4 °C

Kloroform/izoamilni alkohol:

Korištena je smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Otopina se ne sterilizira i čuva se pri 4 °C

SCE:

sorbitol	1,00 M
natrijev citrat	0,10 M
EDTA	0,06 M

STE:

SDS	5,0 g L ⁻¹
Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 M
EDTA (pH 8,5)	0,05 M

Zimoliaza 20-T:

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

3.1.3.4. Otopine za gel-elektroforezu

TBE-pufer (10x):

Tris	108 g
borna kiselina	55 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 mL
destilirana voda	do 1000 mL

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u 10x koncentriranom obliku i naknadno se razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije.

Agarozni gel (0,8%)

Agaroz	0,8 g
1x TBE pufer	100 mL

Agarozni gel se priprema otapanjem agaroze u 1x koncentriranom TBE puferu koji se prethodno pripremi razrjeđivanjem 10x koncentriranog TBE pufera.

Boja za nanošenje uzorka:

Gel loading dye, purple 6X (New England Biolabs, Ipswich)

Etidijev bromid

Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg mL^{-1} , ne sterilizira se i čuva na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom $50 \text{ }\mu\text{L}$ osnovne otopine u 1 L destilirane vode i također se čuva u tamnoj boci.

3.1.3.5. Otopine za transformaciju kvasca

DTT (0,35 M)

Otopina se priprema otapanjem odgovarajuće mase DTT u deioniziranoj vodi, sterilizira se filtracijom i čuva u hladnjaku na temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

LiAc (1 M)

Otopina se priprema otapanjem odgovarajuće mase LiAc u deioniziranoj vodi te se sterilizira filtracijom.

Sorbitol (1 M)

Otopina se priprema otapanjem odgovarajuće mase sorbitola u deioniziranoj vodi te se sterilizira autoklaviranjem.

3.1.3.6. Otopine za hibridizaciju DNA

Sve navedene otopine su sterilne.

Amonijev acetat (1M):

Priprema se razrjeđivanjem amonijeva acetata (8 M)

HCl (0,25 M)

NaOH (0,4 M)

NaOH/amonijev acetat

NaOH 0,5 M

Amonijev acetat 1 M

SSC (20x)

natrijev klorid 3 M

natrijev citrat 0,3 M

Otopina A

SDS (10%) 1 mL

SSC (20x) 10 mL

Destilirana voda 89 mL

Otopina B

SDS (10%) 1 mL

SSC (20x) 0,5 mL

Destilirana voda 98,5 mL

Otopina za prethibridizaciju

SSC (20x) 20 mL

Blocking reagent (smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija) 0,8 g

Natrijeva sol N-laurilosarkozina (10%) 0,8 mL

SDS (10%) 160 μ L

Otopina za hibridizaciju

Jednakog je sastava kao otopina za prethibridizaciju ali sadrži i 20 – 50 ng obilježene DNA (DNA-proba).

Pufer 1

Tris-HCl (pH 7,5)	0,10 M
NaCl	0,15 M

Pufer 2

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

Pufer 3

Tris (1 M; pH 9,7)	50 mL
natrijev klorid (5 M)	10 mL
magnezijev klorid (1 M)	25 mL

pH vrijednost pufera se podesi na 9,5 dodavanjem otopine HCl te se doda destilirana voda do ukupnog volumena od 0,5 L.

3.1.4. Kemikalije i enzimi

Agar: *Biolife, Milano.*

Agaroza: *Appligene, Strassbourg.*

Amonijev acetat: *Kemika, Zagreb.*

Apsolutni etanol: *Kemika, Zagreb.*

Borna kiselina: *Fisher Scientific, Pittsburgh*

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

DIG DNA labeling kit:	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
DTT	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
EDTA:	<i>Kemika, Zagreb.</i>
Etidijev bromid:	<i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.</i>
Fenol:	<i>Kemika, Zagreb.</i>
Glukoza:	<i>Kemika, Zagreb.</i>
Gel loading dye, purple 6X:	<i>New England Biolabs, Ipswich.</i>
Izopropanol:	<i>Alkaloid, Skoplje.</i>
Izoamilni alkohol:	<i>Kemika, Zagreb.</i>
Kalijev acetat:	<i>Acros Organics, New Jersey.</i>
Kloroform:	<i>Kemika, Zagreb.</i>
Kvašček ekstrakt:	<i>Biolife, Milano.</i>
Komplet kemikalija za hibridizaciju DNA metodom po Southernu:	<i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.</i>
LiAc:	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
Ribonukleaza A:	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
Restrikcijски enzimi i odgovarajući puferi:	<i>New England Biolabs, Ipswich.</i>
SDS:	<i>Merck, Hohenbrunn.</i>
Sorbitol:	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
Standard za elektroforezu:	<i>New England Biolabs, Ipswich.</i>
Tris: Tris Ultra Pure	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
Zimoliaza (Zymolyaze 100-T i 20-T):	<i>Seikugaku Kogyo Co., Tokyo.</i>

Kemikalije za pripremu ostalih otopina:

Sigma-Aldrich., St. Louis,

Kemika, Zagreb,

Alkaloid, Skoplje.

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Tajne kulture bakterije *E. coli* su čuvane u zamrzivaču na temperaturi od -70 °C. Prvi korak u izolaciji plazmidne DNA iz bakterijske kulture je dobivanje pojedinačnih kolonija na krutoj hranjivoj podlozi. Volumen od 10 µL bakterijske kulture se tehnikom do iscrpljenja precijepi iz trajne kulture na krutu hranjivu podlogu koja sadrži antibiotik ampicilin u koncentraciji od 100 mg mL⁻¹. Kulture na krutim podlogama se inkubiraju preko noći na 37 °C. Nakon inkubacije, pojedinačne se kolonije precijepu u Erlenmayerove tikvice s 100 mL tekuće hranjive podloge s ampicilinom. Tekuće se kulture inkubiraju preko noći na tresilici pri 37 °C i 250 o/min.

3.2.2. Uzgoj kvasaca roda *Schwanniomyces*

Tajne kulture kvasaca roda *Schwanniomyces* su čuvane u zamrzivaču na temperaturi od -70 °C. Volumen od 10 µL trajne kulture se tehnikom do iscrpljenja precijepi na kompletnu krutu hranjivu podlogu. Kulture na krutim podlogama se inkubiraju 48 h na 28°C. Nakon inkubacije, pojedinačne se kolonije precijepu u Erlenmayerove tikvice s 100 mL tekuće YPD hranjive podloge te se kulture inkubiraju preko noći na tresilici pri 28 °C i 200 o/min.

3.2.3. Izolacija plazmidne DNA iz tekuće bakterijske kulture

Prethodno uzgojene tekuće bakterijske kulture se centrifugiraju 5 min na 4 °C i 5 000 o/min. Supernatant se nakon centrifugiranja odlije te se dobiveni talog resuspendira u 2,4 mL hladnog GTE pufera i inkubira 5 min u ledu. Suspenziji se doda 4,8 mL otopine NaOH/SDS uz miješanje okretanjem, zatim slijedi 5 min inkubacije u ledu. Nakon toga se u suspenziju doda 7,2 mL hladnog kalijevog acetata uz miješanje okretanjem. Suspenzija se 20 min inkubira na ledu nakon čega se 20 min centrifugira pri 4 °C i 10 000 o/min. Supernatant se zatim pipetom pažljivo prenese u Corex kivetu, doda se 8,5 mL izopropanola te se vrh kivete oblijepi parafilmom kako bi se sadržaj promiješao okretanjem. Nakon toga slijedi centrifugiranje 20 min

pri 10 000 o/min. Supernatant se pažljivo odlije, kiveta se posuši vakuum sisaljkom te se odloži uz plamenik sve dok talog ne postane bezbojan. Osušeni se talog resuspendira u 300 μ L TE pufera uz dodatak 10 μ L RNaze.

3.2.4. Pročišćavanje izolirane DNA fenolizacijom

Nakon izolacije plazmidne DNA iz 100 mL tekuće bakterijske kulture slijedi pročišćavanje fenolizacijom. U 300 μ L suspenzije DNA se doda 150 μ L smjese kloroforma i izoamilnog alkohola te 150 μ L fenola. Smjesa se centrifugira 5 minuta na 10 000 o/min te se gornja faza izdvoji pipetom a ukupni se volumen namjesti na 300 μ L dodatkom TE pufera. Opisani se postupak ponavlja sve dok je između dvije tekuće faze vidljiv bijeli proteinski talog. Kada proteinski talog više nije vidljiv, u suspenziju se doda 300 μ L smjese kloroforma i izoamilnog alkohola, ponovi se centrifugiranje te se izdvoji gornja tekuća faza.

3.2.5. Taloženje DNA pomoću amonijevog acetata

U izoliranu i pročišćenu DNA se doda 100 μ L 8 M otopine amonijevog acetata i 800 μ L etanola uz miješanje okretanjem. DNA se preko noći taloži na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon čega slijedi centrifugiranje 20 min pri 10 000 o/min. Supernatant se pažljivo odlije, unutrašnjost epruvete se posuši vakuum sisaljkom te se odloži uz plamenik sve dok talog ne postane bezbojan. Talog se resuspendira u 50 μ L TE pufera zagrijavanjem u vodenoj kupelji 20 min pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.6. Cijepanje izolirane DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima provedeno je prema uputama proizvođača *New England Biolabs, Ipswich*, korištenjem originalnog pufera za pojedini enzim. Restrikcijska se otopina pripremi u volumenu od 10 μ L; dodatkom 1 μ L pufera, 0,3 μ L restrikcijskog enzima, varijabilnog volumena suspenzije DNA te dodatkom vode do ukupnog volumena od 10 μ L. Svi korišteni enzimi imaju koncentraciju 20 U μL^{-1} . Reakcija restrikcije se provodi 60 minuta pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.7. Gel-elektroforeza

Za elektroforezu je korišten 0,8 postotni agarozni gel koji se priprema otapanjem 0,8 g agaroze u 100 mL TBE pufera (1x) u laboratorijskoj boci. Boca se zatvori čepom i zagrijava 2 do 3 minute u mikrovalnoj pećnici s povremenim miješanjem sve dok se agarozna u potpunosti ne otopi. Gel se ohladi do temperature oko $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ te se izlije na nosač gela. Uzorci DNA se s

bojom za nanošenje uzoraka miješaju u omjeru od 1:6 te se unose u jažice pomoću mikropipete. Elektroforeza se provodi pri naponu od 40 V, a trajanje ovisi o koncentraciji agaroze u gelu te veličini fragmenata DNA. Gel se nakon elektroforeze inkubira 30 min u otopini etidijevog bromida te se osvijetli UV svjetlošću na transiluminatoru i fotografira kroz crveni filter.

3.2.8. Izolacija genomske DNA iz kvasca

Pojedinačne kolonije kvasca se precijepu u epruvete s 4 mL hranjive podloge te se uzgajaju do stacionarne faze rasta. Stacionarne se kulture centrifugiraju 2 min pri 10 000 o/min, supernatant se odlije a talog stanica se dva puta ispire u 1 mL vode uz centrifugiranje 2 min pri 10 000 o/min. Talog se nakon toga ispire u 1 mL otopine SCE i centrifugira 2min pri 10 000 o/min, supernatant se odlije a talog se resuspendira u 200 μ L uz dodatak 20 μ L enzima zimolijaze. Suspenzija se inkubira 45 min na 37 °C nakon čega se dodaje 800 μ L otopine STE te se suspenzija inkubira 20 min na 70 °C. Nakon što se suspenzija ohladi do sobne temperature, dodaje se 200 μ L hladnog kalijevog acetata te se inkubira 1 h na ledu. Suspenzija se zatim centrifugira 15 min pri 10 000 o/min na temperaturi od 4 °C kako bi se istaložili proteini. Pažljivo odvojenom supernatantu se doda 700 μ L izopropanola, centrifugira se 15 min na 10 000 o/min pri sobnoj temperaturi. Supernatant se nakon centrifugiranja odlije a dobiveni se talog suši uz plamenik dok ne postane bezbojan nakon čega se resuspendira u 300 μ L TE pufera. DNA se zatim taloži pomoću amonijevog acetata prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5.

3.2.9. Transformacija kvasca elektroporacijom

Kvasci su transformirani elektroporacijom prema protokolu za transformaciju kvasca *Brettanomyces bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Kvasci se uzgoje u 200 mL tekuće kulture na tresilici pri temperaturi od 28 °C do koncentracije od otprilike 10^8 stanica mL^{-1} . Koncentracija stanica se odredi brojanjem u Thomaovoj komorici. Tekuća kultura se centrifugira 4 min pri 1 500 g na sobnoj temperaturi, supernatant se pažljivo odlije a talog stanica se dva puta ispire sa 100 mL sterilne deionizirane vode uz centrifugiranje pri istim uvjetima. Talog stanica se resuspendira u otopini koja se sastoji od 35 mM DTT i 100 mM LiAc, suspenzija se 45 min inkubira na tresilici pri 28 °C i 80 o/min. Suspenzija se nakon inkubacije centrifugira 4 min pri 1 500 g na 4 °C, stanice se drže na ledu od ovog koraka pa sve do same elektroporacije. Talog stanica se jedanput ispire s 20 mL ledene, sterilizirane deionizirane vode te dvaput s 20 mL ledene otopine sorbitola (1 M) uz centrifugiranje pri istim uvjetima. Talog se resuspendira u ledenoj otopini sorbitola (1 M) do ukupnog volumena od 500 μ L te se suspenzija raspodijeli na

10 uzoraka volumena po 50 μ L. U svaki od uzoraka se dodaje 1 μ L DNA otopljene u deioniziranoj vodi uz miješanje pipetiranjem te 5 min inkubacije na ledu. Uzorci se zatim prenose u kivete za elektroporaciju koje su prethodno držane na ledu nakon čega slijedi puls. Parametri elektroporacije iznose 1,8 kV i 5 ms. Neposredno nakon pulsa suspenziji stanica se dodaje 1 mL smjese sorbitola (1 M) i YPD podloge u omjeru 1:1 uz inkubaciju u trajanju 20 min na sobnoj temperaturi. Zatim se suspenzija prenese u staklenu epruvetu, dodaje se 1 mL YPD podloge nakon čega slijedi inkubacija u trajanju od dva generacijska vremena za svaku pojedinu vrstu kvasca na tresilici pri 180 o/min i 28 °C. Nakon inkubacije, uzorci se nacijepu na krutu hranjivu podlogu koja sadrži antibiotik higromicin te se inkubiraju 2 do 3 dana na 28 °C.

3.2.10. Hibridizacija DNA po Southernu

Kako bi se detektirali fragmenti plazmidne DNA u transformiranim stanicama kvasca, nakon gel elektroforeze se vrši transfer fragmenata DNA s gela na membranu te detekcija pomoću neradioaktivno označene DNA probe. Metoda se provodi korištenjem kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i detekciju homologne DNA prema uputama proizvođača uz određene prilagodbe (Gjuračić i Zgaga, 1996). U radu su navedene količine pufera za posthibridizacijsko ispiranje i vizualizaciju primjenjive za membranu površine 100 cm². Ispiranja se odvijaju pri sobnoj temperaturi uz lagano protresanje, osim ako je u radu navedeno drugačije.

3.2.10.1. Prijenos DNA na membranu

Nakon gel-elektroforeze, gel se 30 min inkubira u 0,25 M otopini HCl, zatim se ispiru destiliranom vodom te inkubira 30 min u otopini amonijevog acetata (1 M) i NaOH (0,4 M). Transfer DNA s gela na membranu se provodi 1,5 h na uređaju za prijenos vakuumom (*GE Healthcare Biosciences*, New Jersey) uz podtlak od 15 kPa. Za vrijeme transfera, gel je uronjen u otopinu NaOH (0,4 M). Membrana se nakon transfera inkubira 15 min u otopini amonijevog acetata (1 M) nakon čega se 30 min suši na 120 °C.

3.2.10.2. Predhibridizacija i hibridizacija

Osušena membrana se prenosi u plastičnu vrećicu koja se zatvara sa 3 strane te se ulije prehibridizacijska otopina (0,5 mL otopine po 1 cm² membrane). Vrećica se zatim zatvara u potpunosti te se membrana inkubira 3 h na 62 °C uz lagano protresanje. Nakon toga slijedi hibridizacija koja uključuje inkubaciju membrane u otopini za hibridizaciju volumena jednakog

10 do 20% korištenog volumena prehibridizacijske otopine, u trajanju od 18 h na 62 °C.

3.2.10.3. Posthibridizacijsko ispiranje

Nakon hibridizacije, membrana se dva puta ispiri s 50 mL otopine A u trajanju 10 min na sobnoj temperaturi, te dva puta s 25 mL otopine B u trajanju od 15 min na 62 °C. Sva ispiranja se provode na tresilici pri 75 o/min.

3.2.10.4. Detekcija

Membrana se kratko uroni u 100 mL pufera 1, zatim se 1 h ispiri u 80 mL pufera 2 na sobnoj temperaturi. Membrana se zatim 30 min inkubira na tresilici, u zataljenoj vrećici koja sadrži 20 mL pufera 2 s dodatnih 4 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze. Nakon toga slijede dva uzastopna ispiranja s 100 mL pufera u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi te kratko uranjanje u puferu 3. Membrana se zatim inkubira u zataljenoj plastičnoj vrećici uz dodatak 10 mL pufera 3, 35 µL X-fosfata (5-brom-4-klor-indolil-fosfat) i 45 µL NBT-a (nitrozoplavi-tetrazolij). Inkubacija se provodi u mraku na temperaturi od 37 °C sve do pojave tamno obojenih vrpca na membrani nakon čega se reakcija zaustavlja ispiranjem membrane destiliranom vodom. Membrana se suši na 37 °C te se čuva u mraku.

3.2.11. Određivanje generacijskog vremena

Stanice kvasca se nacijepe u tekuću kulturu volumena 50 mL te se inkubiraju preko noći na tresilici pri 28 °C i 200 o/min. Određivanje generacijskog vremena započinje nakon otprilike 18 h uzgoja, kada kvasci uđu u početak eksponencijalne faze rasta. Iz kulture volumena 50 mL se izuzimaju uzorci volumena 1 mL u razmaku od 90 min. Ukupni broj stanica u određenoj vremenskoj točki se određuje brojanjem u Thomaovoj komorici, dok se broj živih stanica određuje nacjepljivanjem na krutu hranjivu podlogu te brojanjem izraslih kolonija nakon inkubacije duge 48 h, na 28 °C. U svakoj se vremenskoj točki određuje optička gustoća suspenzije stanica spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 600 nm.

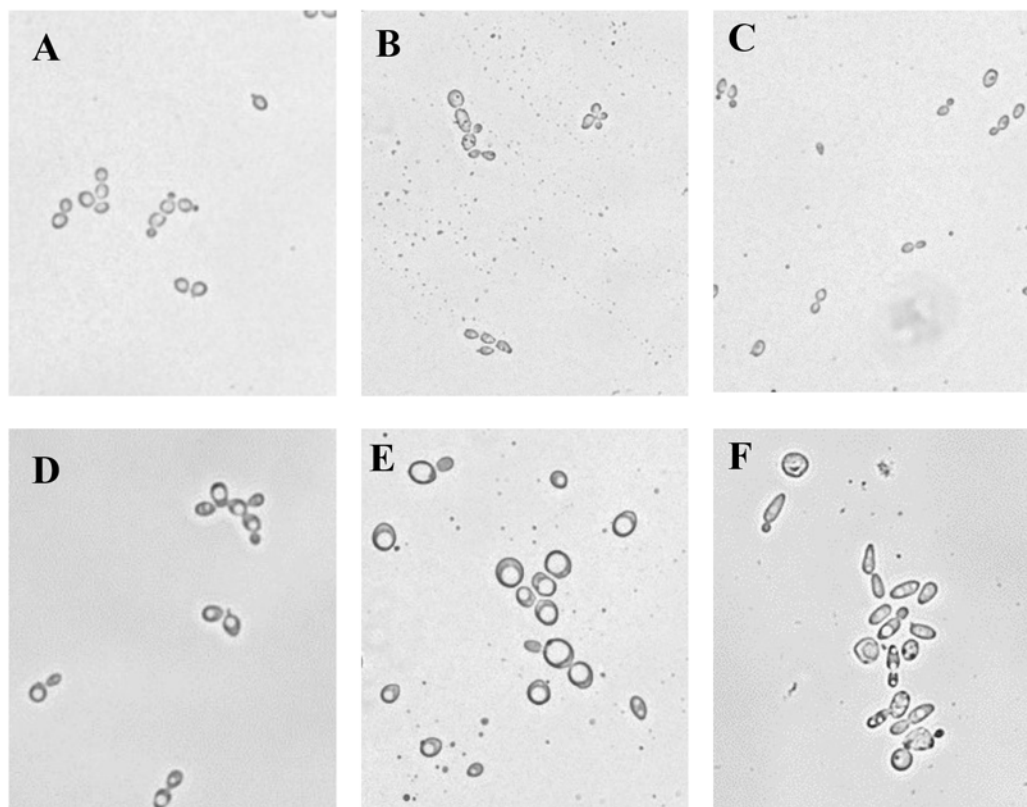
4. REZULTATI I RASPRAVA

Osnovni cilj ovog rada bio je istražiti koja su ishodišta replikacije iz drugih vrsta kvasaca (*2μ ori*, *panARS*, *SsARS2*, *MgALS123* i *BbCEN2*) aktivna u četiri vrste kvasca iz roda *Schwanniomyces* (*S. occidentalis* var. *occidentalis*, *S. occidentalis* var. *persoonii*, *S. capriottii* te *S. yarrowii* var. *vanrijiae*). U tu svrhu, navedeni su kvasci iz roda *Schwanniomyces* transformirani odgovarajućim plazmidima (poglavlje 3.1.1.). U svrhu provedbe optimalnog uzgoja kvasaca prije same transformacije, kvascima je određeno generacijsko vrijeme (poglavlje 4.1.). Osim toga, kako bi se omogućila selekcija transformanata, bilo je potrebno odrediti koncentraciju antibiotika higromicina B koja onemogućava rast netransformiranih stanica kvasaca, a ne ometa rast transformiranih stanica kvasca (poglavlje 4.2.). Kvasci iz roda *Schwanniomyces* transformirani su metodom elektroporacije (poglavlje 4.4.), čemu je prethodila restriksijska analiza plazmida, koja je provedena u svrhu potvrđivanja strukture plazmida (poglavlje 4.3.). Analiza hibridizacije DNA po Southernu je provedena s ciljem potvrđivanja uspješnosti transformacije (poglavlje 4.5.).

4.1. ODREĐIVANJE GENERACIJSKOG VREMENA

Eksperiment određivanja generacijskog vremena proveden je po postupku opisanom u poglavlju 3.2.11. Brojanje svih stanica u Thomaovoj komorici te brojanje živih stanica nacjepljivanjem na krutu podlogu dalo je varijabilne podatke o generacijskom vremenu. Na osnovu tih podataka, kao i podataka dobivenih mjerenjem optičke gustoće moguće je donijeti okvirne zaključke vezane za rast svake pojedine vrste kvasca. Kvasac *S. vanrijiae* var. *yarrowii* ima generacijsko vrijeme od otprilike 70 min te fazu prilagodbe od otprilike 120 do 150 min, što je primjetno kraće od drugih vrsta. Osim što ova vrsta raste brže od ostale tri vrste, stanice su 2 do 3 puta veće zbog čega je optička gustoća suspenzije veća u usporedbi s drugim vrstama. Osim toga, pri koncentracijama većim od otprilike 5×10^7 stanica mL^{-1} primjećuje se izrazito mali broj stanica s pupovima iz čega je moguće zaključiti da ovaj kvasac u stacionarnu fazu rasta ulazi pri nižim koncentracijama stanica u odnosu na druge vrste. Na slici 4 je prikazana mikroskopska slika stanica kvasca *S. vanrijiae* var. *yarrowii* u eksponencijalnoj te stacionarnoj fazi rasta. Usporedbom stanica iz dvije različite faze rasta moguće je primijetiti razliku u veličini stanica te veličini vakuola kao i razliku u broju pupova. Prilikom uzgoja kvasca *S. vanrijiae* var. *yarrowii* u tekućoj hranjivoj kulturi također je primijećeno da stanice izrazito flokuliraju. Kvasac *S. occidentalis* var. *persoonii* ima fazu prilagodbe u trajanju od otprilike 150 min te generacijsko

vrijeme između 70 i 80 min. U stacionarnu fazu ulazi pri koncentracijama većim od 3×10^8 stanica mL^{-1} . Prilikom uzgoja u tekućoj hranjivoj podlozi, stanice flokuliraju ali manje u odnosu na kvasac *S. vanrijae* var. *yarrowii*. Kvasci *S. occidentalis* var. *occidentalis* i *S. itii* imaju fazu prilagodbe dugu otprilike 180 do 200 min te generacijska vremena od otprilike 80 do 90 min. U stacionarnu fazu rasta ulaze pri koncentracijama višim od 1×10^8 stanica mL^{-1} te pri uzgoju u tekućim hranjivim podlogama stanice flokuliraju. Na slici 4 je također vidljiva razlika u veličini stanica između odabranih vrsta kvasaca.



Slika 4. Mikroskopska slika stanica kvasca u različitim fazama rasta. A – stanice *S. capriottii* u eksponencijalnoj fazi rasta, B – stanice *S. occidentalis* var. *occidentalis* u eksponencijalnoj fazi rasta, C – stanice *S. occidentalis* var. *personii* u eksponencijalnoj fazi rasta D – stanice *S. vanrijae* var. *yarrowii* u eksponencijalnoj fazi rasta, E – stanice *S. vanrijae* var. *yarrowii* u stacionarnoj fazi rasta, F – stanice *S. vanrijae* var. *yarrowii* nakon 72 h uzgoja

4.2. ODREĐIVANJE OSJETLJIVOSTI ODABRANIH VRSTA KVASACA NA ANTIBIOTIK HIGROMICIN B

Obzirom da svi korišteni plazmidi sadrže gen za rezistenciju na navedeni antibiotik, za selekciju stanica kvasca koje su primile transformirajuću DNA korištene su hranjive podloge s

antibiotikom higromicinom B. Prije same transformacije, bilo je potrebno odrediti točnu koncentraciju antibiotika koja onemogućava rast stanica svake pojedine vrste kvasca. Za određivanje potrebne koncentracije antibiotika u tekućim podlogama, za svaki kvasac su korištene 3 različite koncentracije. Za vrste *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii* i *Schwanniomyces capriottii* korištene su koncentracije od 300, 400 i 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok su za kvasac *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii* korištene koncentracije antibiotika od 400, 500 i 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Za određivanje koncentracije antibiotika koja u krutoj podlozi onemogućava rast kvasca, za vrste *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis* i *Schwanniomyces capriottii* korištene su koncentracije od 200, 300 i 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok su za vrste *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii* i *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii* korištene koncentracije od 300, 400 i 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Koncentracije antibiotika pri kojima nije bilo rasta stanica prikazane su u tablici 1. Navedene su koncentracije korištene za selekciju transformanata.

Tablica 1. Rezultati određivanja osjetljivosti kvasca na antibiotik higromicin B u tekućoj i krutoj podlozi

ANTIBIOTIK	PODLOGA	KONCENTRACIJA ANTIBIOTIKA KOJA ONEMOGUĆAVA RAST KVASCA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		<i>S. occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	<i>S. occidentalis</i> var. <i>persoonii</i>	<i>S. vanrijiae</i> var. <i>yarrowii</i>	<i>S. capriottii</i>
Higromicin B	Tekuća	300	300	400	300
	Kruta	300	400	500	300

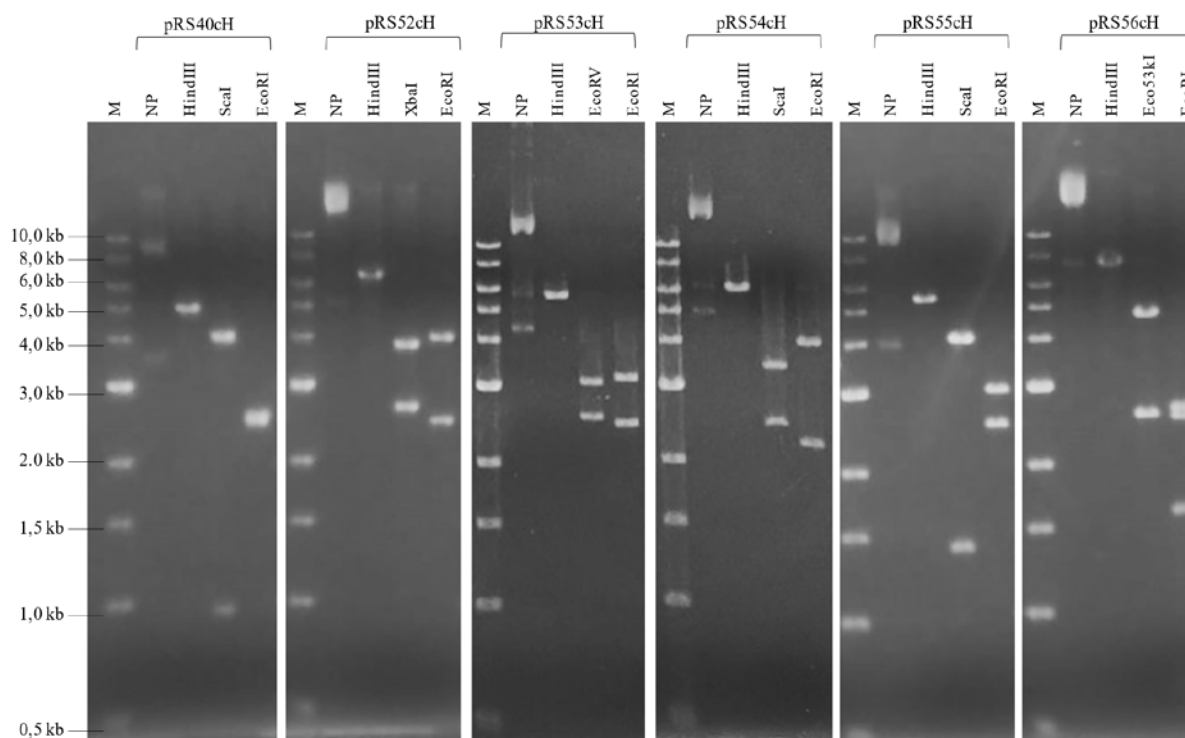
4.3. IZOLACIJA PLAZMIDA ZA TRANSFORMACIJU KVASACA

Za transformaciju kvasaca roda *Schwanniomyces* korišteni su plazmidi pRS40cH, pRS52cH, pRS53cH, pRS54cH, pRS55cH i pRS56cH koji su detaljno opisani u poglavlju 3.1.1. Plazmidi su iz velikog volumena kultura bakterije *E. coli* izolirani prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. Restriksijska analiza plazmida provedena je kako bi se potvrdila njihova struktura i odredila masa izolirane DNA. Restriksijske mape navedenih plazmida na kojima su označena restriksijska mjesta korištenih enzima prikazane su na slici 3. Endonukleaza HindIII sve plazmide cijepa u samo jednom mjestu te je korištena za dobivanje linearnih oblika

plazmida, čime je omogućeno potvrđivanje njihove veličine kao i procjena mase izolirane DNA. Restriksijska endonukleaza EcoRI plazmide cijepa u dva mjesta osim plazmida pRS54cH i pRS56cH koje cijepa u 3 i 4 mjesta. Osim navedenih, korištene su još četiri endonukleaze koje plazmide cijepaju u 2 mjesta: ScaI koja cijepa plazmide pRS40cH, pRS54cH i pRS55cH, XbaI koja cijepa plazmid pRS52cH, EcoRV koja cijepa plazmid pRS53cH te Eco53kI koja cijepa plazmid pRS56cH. Veličine očekivanih fragmenata DNA nakon cijepanja plazmida odgovarajućim restriksijskim endonukleazama prikazane su u tablici 2. Na slici 5 vidljiv je prikaz gela nakon elektroforeze nepocijepane plazmidne DNA kao i plazmida pocijepanih odabranim restriksijskim endonukleazama. Iz navedenog prikaza gela vidljivo je da veličine svih vrpce odgovaraju očekivanim veličinama fragmenata DNA nakon restrikcije plazmida. Prilikom cijepanja plazmida pRS54cH endonukleazom EcoRI očekivana su tri fragmenta različitih veličina no na gelu su vidljiva samo 2. Obzirom da se fragment iz standarda za elektroforezu veličine 500 pb nalazi na samome dnu gela, moguće je zaključiti da se najmanji očekivani fragment plazmida pRS54cH, veličine 348 pb, nalazi van gela. Iz prikazanih se rezultata može zaključiti da stvarne strukture analiziranih plazmida odgovaraju strukturama opisanim u poglavlju 3.1.1.

Tablica 2. Očekivane veličine fragmenata DNA dobivenih cijepanjem plazmida restriksijskim enzimima

PLAZMIDI	OČEKIVANA VELIČINA FRAGMENTA DNA (pb)					
	HindIII	EcoRI	ScaI	XbaI	EcoRV	Eco53kI
pRS40cH	4999	2471, 2528	953, 4046			
pRS52cH	6465	2471, 3994		2653, 3812		
pRS53cH	5666	2471, 3195			2559, 3107	
pRS54cH	6273	348, 2471, 3454,	4046, 2227			
pRS55cH	5443	2471, 2972	1392, 4046			
pRS56cH	7184	583, 1549, 2471, 2581				2519, 4665



Slika 5. Restriksijska analiza plazmidne DNA. M – 0,5 μ L standarda za elektroforezu; NP – nepocijepana plazmidna DNA; HindIII – plazmidna DNA pocijepana enzimom HindIII; ScaI – plazmidna DNA pocijepana enzimom ScaI; EcoRI – plazmidna DNA pocijepana enzimom EcoRI; XbaI – plazmidna DNA pocijepana enzimom XbaI; EcoRV – plazmidna DNA pocijepana enzimom EcoRV; Eco53kI – plazmidna DNA pocijepana enzimom Eco53kI.

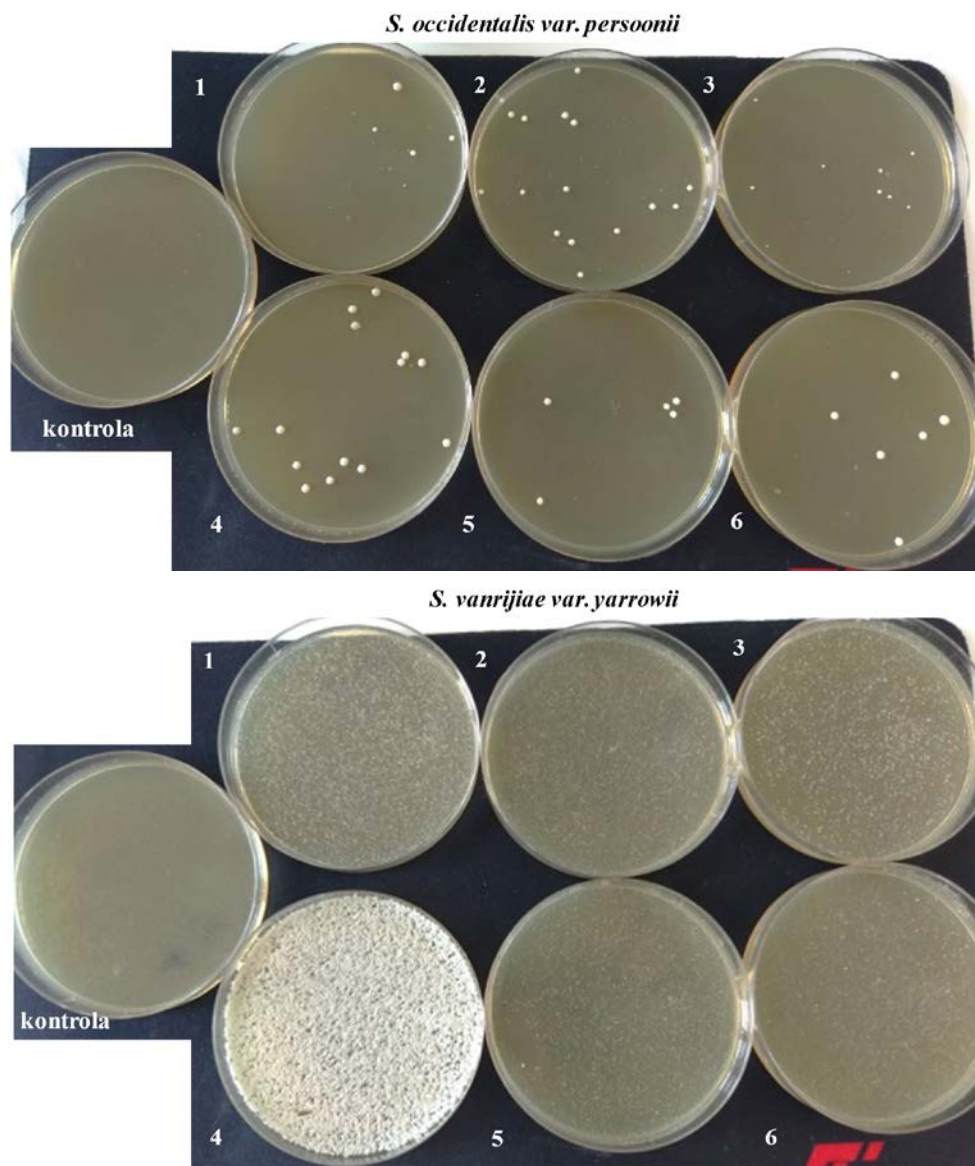
4.4. TRANSFORMACIJA KVASACA RODA *Schwanniomyces*

Kvasci *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*, *Schwanniomyces capriottii* i *Schwanniomyces vanrijiae* var. *yarrowii* transformirani su elektroporacijom prema protokolu za transformaciju kvasca *Brettanomyces bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Za transformaciju je korišten nereplikativni plazmid pRS40cH, lineariziran cijepanjem restriksijskom endonukleazom ScaII, te kružni oblici plazmida pRS52cH, pRS53cH, pRS54cH, pRS55cH i pRS56cH. Uz to, prilikom svake transformacije napravljen je i kontrolni uzorak s kojim je proveden cijelokupni postupak transformacije, ali je umjesto otopine DNA dodan jednak volumen sterilne vode. U tablici 3. su prikazani brojevi transformiranih stanica kao i vrijednosti efikasnosti transformacije za sve korištene vrste kvasaca i plazmida, a na slici 6 kao primjer prikazane su krute hranjive podloge

na kojima su izrasli transformanti kvasaca *S. occidentalis* var. *persoonii* i *S. vanrijae* var. *yarrowii*.

Tablica 3. Rezultati transformacije kvasaca roda *Schwanniomyces*

PLAZMIDI	VRSTA							
	<i>S. occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	<i>S. occidentalis</i> var. <i>persoonii</i>	<i>S. vanrijae</i> var. <i>yarrowii</i>	<i>S. capriottii</i>	<i>S. occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	<i>S. occidentalis</i> var. <i>persoonii</i>	<i>S. vanrijae</i> var. <i>yarrowii</i>	<i>S. capriottii</i>
	BROJ TRANSFORMANATA				EFIKASNOST TRANSFORMACIJE (broj transformanata μg^{-1} DNA)			
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0
pRS40cH	81	18	$\sim 3 \times 10^3$	0	34,95	11,65	$1,94 \times 10^3$	0
pRS52cH	1	63	$\sim 3 \times 10^3$	0	0,314	29,72	$1,42 \times 10^3$	0
pRS53cH	24	12	$\sim 3 \times 10^3$	8	19,94	14,96	$3,74 \times 10^3$	9,97
pRS54cH	53	14	$\sim 3 \times 10^3$	148	30,48	12,08	$2,59 \times 10^3$	127,66
pRS55cH	12	5	$\sim 3 \times 10^3$	88	9,51	5,95	$3,57 \times 10^3$	104,64
pRS56cH	9	6	$\sim 3 \times 10^3$	0	2,19	2,19	$1,10 \times 10^3$	0



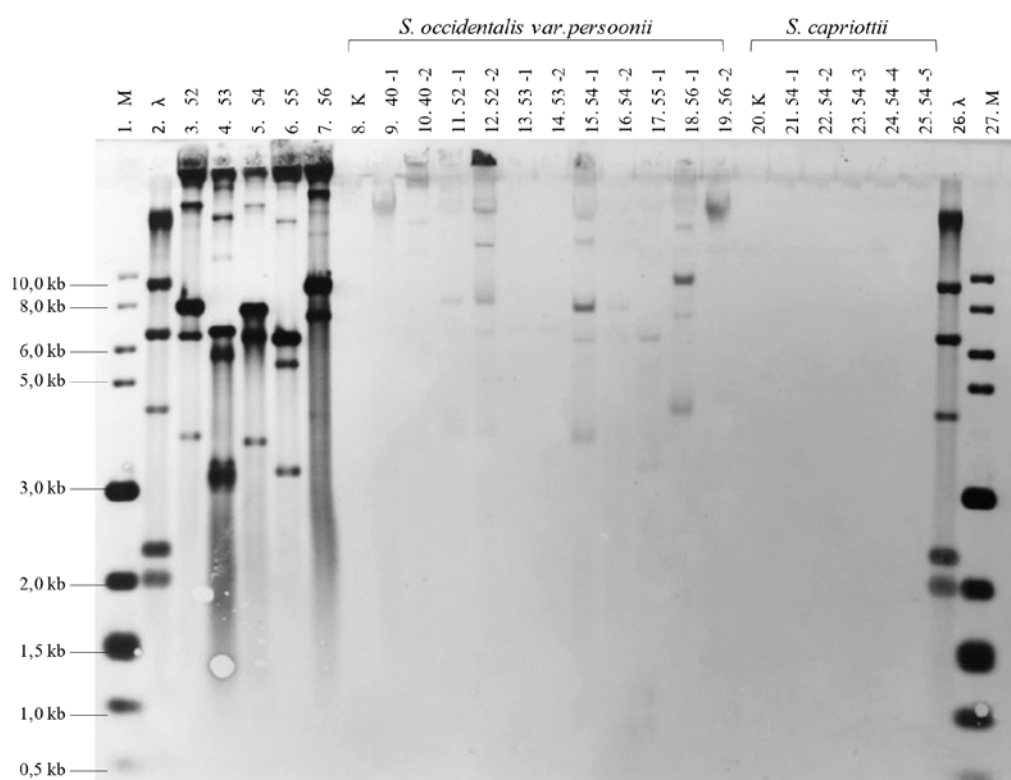
Slika 6. Krute selektivne podloge s antibiotikom higromicinom B s poraslim transformantima kvasaca *S. occidentalis var. personii* i *S. vanrijae var. yarrowii*. Kontrola – negativna kontrola bez dodane DNA; 1 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS40cH pocijepanim enzimom ScaII; 2 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS52cH; 3 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS53cH; 4 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS54cH; 5 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS55cH; 6 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS56cH

Iz priloženih rezultata je vidljivo da su kvasci *S. occidentalis var. occidentalis*, *S. occidentalis var. personii*, i *S. vanrijae var. yarrowii* uspješno transformirani sa svim korištenim plazmidima dok je kvasac *S. capriottii* uspješno transformiran plazmidima pRS53cH, pRS54cH, pRS55cH.

4.5. MOLEKULARNA ANALIZA HIBRIDIZACIJOM DNA PO SOUTHERNU

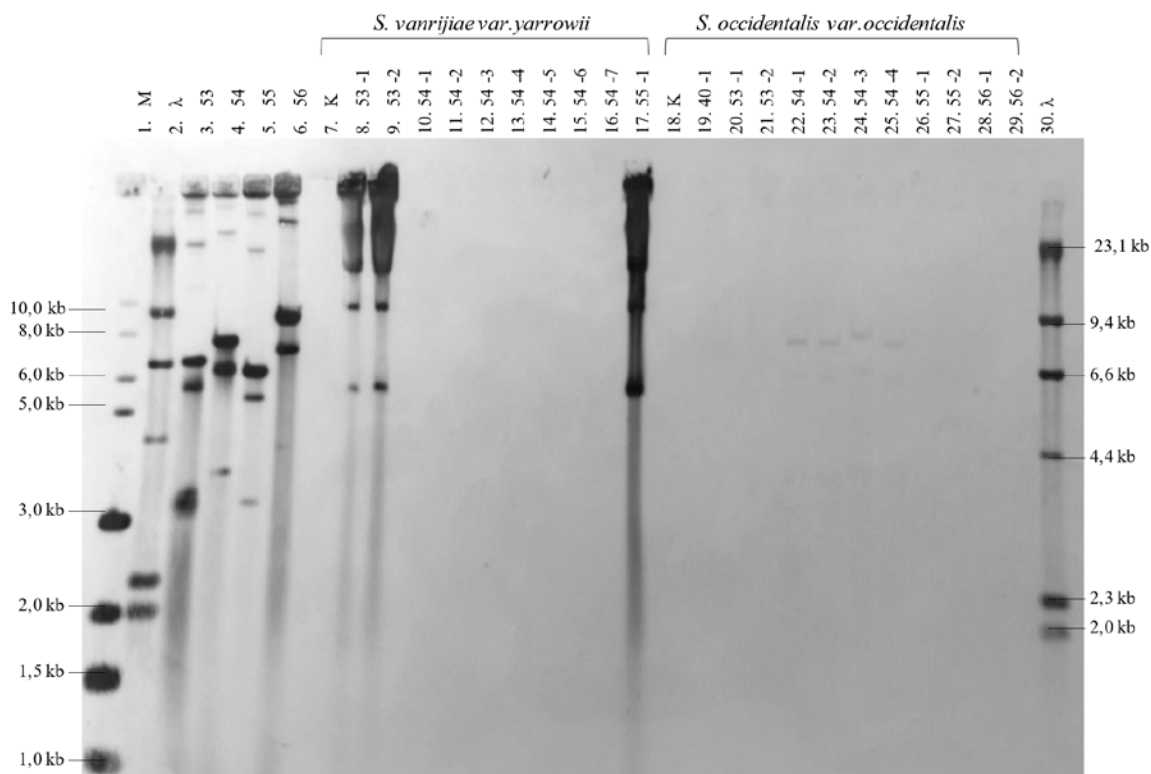
Molekularna analiza odabranih transformanata metodom hibridizacije DNA po Southernu provedena je kako bi se potvrdio uspješan unos transformirajuće DNA u stanice odabranih vrsta kvasaca, te ujedno utvrdilo održavaju li se uneseni plazmidi u kružnom obliku unutar transformiranih stanica ili su se integrirali u genom kvasca. Za hibridizaciju je korištena DNA proba obilježena digoksinogenin-deoksiuridin trifosfatom koja sadrži regiju *coHygR*, uz *TEF* promotor i terminator iz kvasca *Eremothecium gossypii*. DNA proba se komplementarno sparuje sa svim plazmidima korištenim za transformaciju obzirom da svih šest plazmida u svojoj strukturi sadrže navedene regije DNA.

Na slici 7 prikazani su rezultati molekularno genetičke analize 11 nasumično odabranih transformanata kvasca *S. occidentalis var. personii* te 5 transformanata kvasca *S. capriottii*, a na slici 8 su prikazani rezultati molekularno genetičke analize 10 odabranih transformanata kvasca *S. vanrijae var. yarrowii* te 11 transformanata kvasca *S. occidentalis var. occidentalis*.



Slika 7. Rezultati hibridizacije DNA izolirane iz transformanata *S. occidentalis var. personii* i *S. capriottii*. M – 1kb DNA Ladder, NEB; λ – DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; jažice 3.-7. – plazmidna DNA korištena za transformaciju; K – negativna kontrola; 40

– DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS40cH; 52 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS52cH; 53 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS53cH; 54 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS54cH; 55 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS55cH; 56 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS56cH.



Slika 8. Rezultati hibridizacije DNA izolirane iz transformanata *S. vanrijae var. yarrowii* i *S. occidentalis var. occidentalis*. M – 1kb DNA Ladder, NEB; λ – DNA bakteriofaga λ pociješana endonukleazom HindIII; jažice 3.-6. – plazmidna DNA korištena za transformaciju; K – negativna kontrola; 40 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS40cH; 53 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS53cH; 54 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS54cH; 55 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS55cH; 56 – DNA transformanata koji sadrže plazmid pRS56cH.

Iz rezultata prikazanih na slikama 7 i 8 vidljivo je da su transformacije uspješno provedene za vrste *S. occidentalis var. personii*, *S. vanrijae var. yarrowii* i *S. occidentalis var. occidentalis*, dok za kvasac *S. capriottii* na membrani nije vidljiv signal. Obzirom da prilikom transformacije *S. capriottii* u kontrolnom uzorku koji je podvrgnut postupku elektroporacije bez dodatka DNA i zatim naciepljen na selektivnu podlogu s antibiotikom uopće nije primijećen porast kolonija, već samo u pojedinim uzorcima u koje je dodana plazmidna DNA (tablica 3),

vjerojatno je sam postupak unosa DNA u stanice bio uspješan, ali se radilo o vrlo nestabilnim transformantima. Nadalje, na temelju rezultata molekularne analize može se zaključiti da je prilikom transformacije kvasca *S. occidentalis var. personii* lineariziranim plazmidom pRS40cH, koji ne sadrži ishodište replikacije, došlo do integracije u genom, kao što je bilo očekivano. Osim toga, kod transformanata koji sadrže plazmide pRS52cH, pRS53cH, pRS54cH, pRS55cH i pRS56cH vidljive su vrpce koje odgovaraju očekivanim vrpcama za navedene plazmide. Iz toga je moguće zaključiti da se navedeni plazmidi u transformantima ove vrste kvasca održavaju u kružnom obliku. Osim toga, vidljivo je da su neki signali znatno slabijeg intenziteta što može biti indikacija da su plazmidi pRS52cH, pRS53cH i pRS54cH nestabilni u stanicama *S. occidentalis var. personii*, te da se izgube tijekom diobe stanica. Obzirom da se radi o različitim ishodištima replikacije, malo je vjerojatno da su sva ona aktivna u *S. occidentalis var. personii*. Ovakav rezultat mogao bi se objasniti time da neka od sekvenca koja se nalazi na zajedničkoj okosnici plazmida iz serije pRS poprima svojstva nestabilnog ishodišta replikacije u ovome kvascu. Naime, koristeći istu seriju plazmida za transformaciju nekonvencionalnog kvasca *Spathapsora passalidarum* u ranijim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama primijećeno je da regija *fl-ori* (ishodište replikacije filamentoznih bakteriofaga koje omogućuje izolaciju plazmida iz *E. coli* u jednolančanom obliku) u tome kvascu djeluje kao relativno slabo ishodište replikacije. U prethodnim neobjavljenim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama pokazano je da niti jedan od plazmida ove serije više nije bio replikativan u *S. passalidarum* kada je iz njih uklonjeno ishodište *fl-ori*. Stoga je moguće da ista sekvenca omogućava replikaciju plazmida i u *S. occidentalis var. personii*. Nadalje, rezultati transformacije kvasca *S. varriijae var. yarrowii* ukazuju na to da bi i u ovom kvascu neka zajednička sekvenca prisutna na svim plazmidima mogla djelovati kao nestabilno ishodište replikacije. Naime, kao što je vidljivo sa slike 6 i iz tablice 3, transformacija sa svim plazmidima iz serije pRS rezulturala je pojavom velikom broja kolonija, dok na kontrolnom uzorku u kojem nije dodana DNA nije bilo porasta kolonija. Dobivene kolonije su bile vrlo male, što već samo po sebi ukazuje na nestabilnost transformirajuće DNA u kolonijama tijekom rasta, izuzev nešto boljeg rasta kod transformanata dobivenih sa plazmidom pRS54cH koji nosi ishodište replikacije *SsARS2* iz *Scheffersomyces stipitis*. Međutim, molekularnom analizom DNA ovih transformanata po Southernu nije detektiran signal, dok je u pojedinim transformantima ove vrste dobivenim s različitim plazmidima detektiran identičan raspored vrpce koji ne odgovara niti jednom od korištenih plazmida, što ukazuje i na moguću prisutnost kontaminacije nekim drugim plazmidom koji se

koristi u laboratoriju. Nadalje, kod kvasca *S. occidentalis var. occidentalis* vidljivi su signali kod 4 transformanta koji odgovaraju očekivanim vrpcama za plazmid pRS54cH. Dobiveni signali ukazuju na to da je ishodište replikacije *SsARS2* iz *Scheffersomyces stipitis* aktivno u kvascu *S. occidentalis var. occidentalis*, te da se plazmid pRS54cH u transformiranim stanicama održava u kružnom obliku. To je u skladu s rezultatima Matanović i sur. (2022), gdje je pokazano da je ovo ishodište aktivno u nekim vrstama iz roda *Schwanniomyces*. Slabiji intenzitet signala ukazuje na potencijalnu nestabilnost plazmida pRS54cH u stanicama ove vrste. Obzirom da određeni broj transformanata nije dao signal na membrani, a na kontrolnim pločama nije bilo izraslih kolonija, moguće je zaključiti da se ovdje također radi o „abortivnim“ transformantima. Takvi transformanti prime transformirajuću DNA, ali se ona ne uspijeva stabilno replicirati u stanicama (Pâques i Haber, 1999). Ova je vrsta prethodno uspješno transformirana elektroporacijom, uz efikasnost od 10^5 transformanata po μg DNA, korištenjem *ade2* auktotrofnih mutanata te plazmidnog vektora koji uz ishodište replikacije 2μ izolirano iz kvasca *S. cerevisiae* sadrži sekvencu genomske DNA iz *S. occidentalis var. occidentalis* dugu 4,5 kb koja uključuje gen *ADE2* te autonomnu replicirajuću sekvencu (Costaglioli i sur., 1994). Wang i Lee (1997) su razvili sustav za transformaciju ove vrste koristeći Leu^- auktotrofne mutante, replikativni plazmid koji sadrži gen *LEU2* te ishodište replikacije 2μ izolirano iz kvasca *S. cerevisiae* kao i integrativni plazmid koji sadrži gen *LEU2* iz kvasca *S. cerevisiae*. Uspješnost transformacije bila je 10^3 transformanata po μg DNA, te je pokazano kako je ishodište replikacije 2μ aktivno ovoj vrsti no navedeni je replikativni plazmid pokazao izrazito nisku stabilnost. Među pojedinim drugim vrstama nekonvencionalnih kvasaca velike su razlike u optimalnoj metodi za transformaciju, efikasnosti transformacije koju je moguće postići, te vrsti DNA koju je potrebno koristiti za transformaciju, te je za svaku pojedinu vrstu kvasca odgovarajuće sekvence DNA i postupke transformacije potrebno nanovo optimizirati (Wang i sur., 2001). Prva uspješno provedena transformacija *Schwanniomyces vanrijae var. yarrowii* i *Schwanniomyces occidentalis var. personii* omogućit će daljnji razvoj metoda za genetičku transformaciju i modifikaciju genoma. Nadalje, ishodište replikacije iz *S. stipitis* koje je aktivno i u *S. occidentalis var. occidentalis* olakšat će razvoj replikativnih ekspresijskih vektora za ovaj biotehnološki vrlo zanimljiv kvasac.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu prethodno opisanih rezultata i rasprave moguće je donijeti sljedeće zaključke:

1. Uspješno je provedena prva poznata transformacija kvasaca *Schwanniomyces vanriijiae* var. *yarrowii* i *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*, što je potvrđeno i molekularnom analizom metodom hibridizacije DNA po Southernu.
2. U kvascu *S. occidentalis* var. *occidentalis* aktivno je ishodište replikacije iz *Scheffersomyces stipitis*.
3. Protokol za transformaciju kvasca *Brettanomyces bruxellensis* elektroporacijom primjenjiv je za transformaciju kvasca *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*, *Schwanniomyces capriottii* i *Schwanniomyces vanriijiae* var. *yarrowii*.

6. LITERATURA

- Agbogbo FK, Coward-Kelly G (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* **30**, 1515–1524. <https://doi.org/10.1007/S10529-008-9728-Z/TABLES/2>
- Akiyama SI, Suzuki T, Sumino Y, Nakao Y, Fukuda H (2014) Induction and Citric Acid Productivity of Fluoroacetate-sensitive Mutant Strains of *Candida lipolytica*. *Agric Biol Chem* **37**, 879–884. <https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10860763>
- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* **19**, 219–237. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1997.TB00299.X>
- Baudin A, Ozier-kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**, 3329. <https://doi.org/10.1093/NAR/21.14.3329>
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* **48**, 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>
- Burgers PMJ, Percival KJ (1987) Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal Biochem* **163**, 391–397. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90240-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90240-5)
- Cao M, Gao M, Lopez-Garcia CL, Wu Y, Seetharam AS, Severin AJ, i sur. (2017) Centromeric DNA Facilitates Nonconventional Yeast Genetic Engineering. *ACS Synth Biol* **6**, 1545–1553. https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.7B00046/SUPPL_FILE/SB7B00046_SI_001.PDF
- Cao M, Gao M, Ploessl D, Song C, Shao Z (2018) CRISPR–Mediated Genome Editing and Gene Repression in *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol J* **13**, 1700598. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700598>
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119–122. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90454-W](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90454-W)
- Costaglioli P, Meilhoc E, Masson JM (1994) High-efficiency electrotransformation of the yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Curr Genet* **27**, 26–30. <https://doi.org/10.1007/BF00326575>
- da Silva NA, Srikrishnan S (2012) Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **12**, 197–214. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2011.00769.X>
- de Mot R, van Dijck K, Donkers A, Verachtert H (1985) Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amylolytic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **22**, 222–226. <https://doi.org/10.1007/BF00253614>
- Dohmen RJ, Hollenberg CP (1996) *Schwanniomyces occidentalis*. . U: Wolf K (ured.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer/Berlin/Heidelberg, str. 117–137.

- Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, i sur. (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* **5**, 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
- Foureau E, Courdavault V, Navarro Gallón SM, Besseau S, Simkin AJ, Crèche J, i sur. (2013) Characterization of an autonomously replicating sequence in *Candida guilliermondii*. *Microbiol Res* **168**, 580–588. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.04.006>
- Garay LA, Sitepu IR, Cajka T, Chandra I, Shi S, Lin T, i sur. (2016) Eighteen new oleaginous yeast species. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**, 887–900. <https://doi.org/10.1007/S10295-016-1765-3>
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2579–E2586. https://doi.org/10.1073/PNAS.1208507109/SUPPL_FILE/PNAS.201208507SI.PDF
- Gellissen G (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 741–750. <https://doi.org/10.1007/S002530000464>
- Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, i sur. (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*– A comparison. *FEMS Yeast Res* **5**, 1079–1096. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSYR.2005.06.004>
- Gietz RD, Woods RA (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**, 816–831. <https://doi.org/10.2144/01304RV02>
- Gjuračić K, Zgaga Z (1996) Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* **253**, 173–181. <https://doi.org/10.1007/S004380050310>
- Gonçalves FAG, Colen G, Takahashi JA (2014) *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal* **2014**. <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
- Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- Hamada A, Yamaguchi K, Ohnishi N, Harada M, Nikumaru S, Honda H (2005) High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene. *Plant Biotechnol J* **3**, 43–55. <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2004.00098.X>
- Hegemann JH, Heick SB, Pöhlmann J, Langen MM, Fleig U (2014) Targeted gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Molecular Biology* **1163**, 45–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0799-1_5/COVER
- Ingledeu WM (1987) *Schwanniomyces*: A Potential Superyeast? *Crit Rev Biotechnol* **5**, 159–176. <https://doi.org/10.3109/07388558709086975>

- Ishchuk OP, Zeljko TV, Schifferdecker AJ, Wisén SM, Hagström ÅK, Rozpędowska E, i sur. (2016) Novel Centromeric Loci of the Wine and Beer Yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2. *PLoS One* **11**, e0161741. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161741>
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163. <https://doi.org/10.1128/JB.153.1.163-168.1983>
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829>
- Kawai S, Hashimoto W, Murata K (2010) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: Methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs* **1**, 395. <https://doi.org/10.4161/BBUG.1.6.13257>
- Klinner U, Schäfer B (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 201–223. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2003.10.002>
- Liachko I, Dunham MJ (2014) An autonomously replicating sequence for use in a wide range of budding yeasts. *FEMS Yeast Res* **14**, 364–367. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12123>
- Löbs AK, Schwartz C, Wheeldon I (2017) Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synth Syst Biotechnol* **2**, 198–207. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2017.08.002>
- Lyu Y, Wu P, Zhou J, Yu Y, Lu H (2021) Protoplast transformation of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol J* **16**, 2100122. <https://doi.org/10.1002/BIOT.202100122>
- Markham KA, Vazquez S, Alper HS (2018) High-efficiency transformation of *Yarrowia lipolytica* using electroporation. *FEMS Yeast Res* **18**, 81. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOY081>
- Matanović A, Arambašić K, Žunar B, Štafa A, Svetec Miklenić M, Šantek B, i sur. (2022) Toolbox for Genetic Transformation of Non-Conventional Saccharomycotina Yeasts: High Efficiency Transformation of Yeasts Belonging to the Schwanniomyces Genus. *Journal of Fungi* **8**, 531. <https://doi.org/10.3390/JOF8050531>
- Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D (2012) Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology* **824**, 329–358. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_17/FIGURES/1
- Middelhoven WJ, Niet MCH te, Rij NJWK van (1984) *Trichosporon adeninovorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy. *Antonie Van Leeuwenhoek* **50**, 369–378. <https://doi.org/10.1007/BF00394651>
- Miklenić M, Žunar B, Štafa A, Svetec IK (2015) Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res* **15**, 96. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOV096>
- Nevoigt E (2008) Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 379. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-07>

- Nonklang S, Abdel-Banat BMA, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, i sur. (2008) High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7514. <https://doi.org/10.1128/AEM.01854-08>
- Pâques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 349–404. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>
- Parekh S, Wayman M (1986) Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* **8**, 597–600. <https://doi.org/10.1007/BF01028092>
- Parekh SR, Parekh RS, Wayman M (1988) Fermentation of xylose and cellobiose by *Pichia stipitis* and *Brettanomyces clausenii*. *Appl Biochem Biotechnol* **18**, 325–338. <https://doi.org/10.1007/BF02930836>
- Patra P, Das M, Kundu P, Ghosh A (2021) Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnol Adv* **47**, 107695. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107695>
- Piontek M, Hagedorn J, Hollenberg CP, Gellissen G, Strasser AWM (1998) Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 331–338. <https://doi.org/10.1007/S002530051300>
- Potter H (1993) Application of electroporation in recombinant DNA technology. U: Wu R (ured.) *Methods in Enzymology*. Academic Press/Cambridge/Massachusetts, str. 461–478.
- Rebello S, Abraham A, Madhavan A, Sindhu R, Binod P, Karthika Bahuleyan A, i sur. (2018) Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiol Lett* **365**, 222. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNY222>
- Sanchez M, Iglesias FJ, Santamaria C, Dominguez A (1993) Transformation of *Kluyveromyces lactis* by Electroporation. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2087. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.7.2087-2092.1993>
- Saraya R, Krikken AM, Kiel JAKW, Baerends RJS, Veenhuis M, van der Klei IJ (2012) Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* **12**, 271–278. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2011.00772.X>
- Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I (2016) Synthetic RNA Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol* **5**, 356–359. <https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.5B00162>
- Spencer J, Ragout de Spencer A, Laluce C (2002) Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>
- Stöckmann C, Scheidle M, Dittrich B, Merckelbach A, Hehmann G, Melmer G, i sur. (2009) Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*, a re-assessment. *Microb Cell Fact* **8**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-22/FIGURES/5>

- Tsakraklides V, Brevnova E, Stephanopoulos G, Shaw AJ (2015) Improved Gene Targeting through Cell Cycle Synchronization. *PLoS One* **10**, e0133434. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0133434>
- van Ooyen AJJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MMA, Jacobs DI, Colussi PA, i sur. (2006) Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **6**, 381–392. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2006.00049.X>
- Verbeke J, Beopoulos A, Nicaud JM (2013) Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol Lett* **35**, 571–576. <https://doi.org/10.1007/S10529-012-1107-0>
- Wang TT, Choi YJ, Lee BH (2001) Transformation systems of non-Saccharomyces yeasts. *Crit Rev Biotechnol* **21**, 177–218. <https://doi.org/10.1080/20013891081719>
- Wang TT, Lee BH (1997) Transformation system for *Schwanniomyces occidentalis*. *Biotechnology Techniques* **11**, 307–309. <https://doi.org/10.1023/A:1018415311320>
- Wang TT, Lee CF, Lee BH (1999) The molecular biology of *Schwanniomyces occidentalis* klocker. *Crit Rev Biotechnol* **19**, 113–143. <https://doi.org/10.1080/0738-859991229215>
- Wartmann T, Kunze G (2000) Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 619–624. <https://doi.org/10.1007/S002530000444>
- Wésolowski-Louvel M (2011) An efficient method to optimize *Kluyveromyces lactis* gene targeting. *FEMS Yeast Res* **11**, 509–513. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2011.00741.X>
- Yang VW, Marks JA, Davis BP, Jeffries TW (1994) High-efficiency transformation of *Pichia stipitis* based on its URA3 gene and a homologous autonomous replication sequence, ARS2. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4245–4254. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4245-4254.1994>
- Yang Z, Blenner M (2020) Genome editing systems across yeast species. *Curr Opin Biotechnol* **66**, 255–266. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.08.011>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Ana Slišковиć) 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.

Vlastoručni potpis

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Ana Slišković) 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.

Slišković

Vlastoručni potpis