

Molekularno-genetička karakterizacija konstruiranih sojeva kvasaca *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus* te optimiranje metode transformacije *Scheffersomyces stipitis*

Horvat, Maja

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:159:443601>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Maja Horvat

MOLEKULARNO-GENETIČKA
KARAKTERIZACIJA
KONSTRUIRANIH SOJEVA
KVASACA *Scheffersomyces stipitis* i
***Kluyveromyces marxianus* TE**
OPTIMIRANJE METODE
TRANSFORMACIJE
Scheffersomyces stipitis

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.

Rad je napravljen u sklopu projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ IP-2018-01-9717), financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost; voditelj projekta: prof. dr. sc. B. Šantek.



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

MOLEKULARNO-GENETIČKA KARAKTERIZACIJA KONSTRUIRANIH SOJEVA KVASACA *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus* TE OPTIMIRANJE METODE TRANSFORMACIJE *Scheffersomyces stipitis*

Maja Horvat, univ. bacc.ing. biotechn.
0058210065

Sažetak: Nekonvencionalni kvasci *Kluyveromyces marxianus* i *Scheffersomyces stipitis* imaju značajan potencijal kao proizvodni organizmi u različitim bioprocesima. *S. stipitis* jedan je od kvasaca s najvišom sposobnošću fermentacije ksiloze u etanol, dok *K. marxianus* osim što je termofilan, brzo raste i može koristiti širok spektar različitih supstrata. Međutim u oba kvasca uvođenje ciljnih genetičkih modifikacija otežano je zbog česte ilegitimne (nehomologne) rekombinacije. Prvi cilj ovog rada bila je molekularno-genetička karakterizacija prethodno konstruiranih transformanata *K. marxianus* i *S. stipites*, koji proizvode L-laktat i 2,3-butanediol, metodom hibridizacije po Southern-u. U kvascu *S. stipitis* istražena je mogućnost transformacije metodom elektroporacije i metodom protoplastiranja te utjecaj koncentracije ribonukleinskog kompleksa pri korištenju sustava CRISPR/Cas9. Dobiveni rezultati ukazuju na zaključak da prethodno razvijena metoda protoplastiranja nije pogodna za transformaciju kvasca *S. stipitis* te da koncentracija ribonukleinskog kompleksa značajno utječe na uspješnost transformacije elektroporacijom.

Ključne riječi: *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces lactis*, nekonvencionalni kvasci, genetička transformacija

Rad sadrži: 67 stranica, 21 slika, 5 tablica, 94 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 23. 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

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF ENGINEERED *Scheffersomyces stipitis* and *Kluyveromyces marxianus* A YEAST STRAINS AND OPTIMIZATION OF THE *Scheffersomyces stipites* TRANSFORMATION METHOD

Maja Horvat, univ. bacc.ing. biotechn.
0058210065

Abstract: Non-conventional yeasts *Kluyveromyces marxianus* and *Scheffersomyces stipitis* have significant potential as production organisms in various bioprocesses. *S. stipitis* is one of the yeasts with the highest ability to ferment xylose into ethanol, while *K. marxianus*, in addition to being thermophilic, grows quickly and can use a wide range of different substrates. However, in both yeasts, the introduction of target genetic modifications is difficult due to frequent illegitimate (non-homologous) recombination. The first goal of this work was the molecular-genetic characterization of previously constructed transformants of *K. marxianus* and *S. stipites*, which produce L-lactate and 2,3-butanediol, using the Southern blotting hybridization method. In the yeast *S. stipitis*, the possibility of transformation by the electroporation method and the protoplasting method and the influence of the ribonucleic complex concentration when using the CRISPR/Cas9 system were investigated. The obtained results indicate the conclusion that the previously developed protoplasting method is not suitable for the transformation of the yeast *S. stipitis* and that the concentration of the ribonucleic complex significantly affects the success of the transformation by electroporation.

Keywords: *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces lactis*, non-conventional yeasts, genetic transformation

Thesis contains: 67 pages, 21 figures, 5 tables, 94 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: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Reviewers:

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

Thesis defended: September 23rd, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. NEKONVENCIONALNI KVASCI U BIOTEHNOLOGIJI I METODE ZA NJIHOVU GENETIČKU MODIFIKACIJU	2
2.1.1. Prednosti nekonvencionalnih kvasaca	2
2.1.2. Metode za genetičku transformaciju nekonvencionalnih kvasaca	3
2.1.3. Metode za ciljnu genetičku modifikaciju nekonvencionalnih kvasaca	6
2.2. BIOTEHNOLOŠKA SVOJSTVA I KONSTRUKCIJA SOJEVA KVASACA <i>Scheffersomyces stipitis</i>	14
2.3. BIOTEHNOLOŠKA VAŽNOST I KONSTRUKCIJA SOJEVA KVASACA <i>Kluyveromyces marxianus</i>	15
3. MATERJALI I METODE	17
3.1. MATERJALI	17
3.1.1. Plazmidi	17
3.1.2. Mikroorganizmi	22
3.1.3. Hranjive podloge i otopine	22
3.1.4. Kemikalije, enzimi i membrane	30
3.2. METODE	31
3.2.1. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture	31
3.2.2. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture	31
3.2.3. Izolacija genomske DNA iz kvasca	32
3.2.4. Taloženje DNA amonij acetatom i etanolom	33
3.2.5. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol	33
3.2.6. Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela	33
3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima	34
3.2.8. Priprema crRNA/tracrRNA/Cas9 ribonukleoproteinskog kompleksa (RNP)	34
3.2.9. Transformacija kvasca elektroporacijom	34
3.2.10. Transformacija kvasaca protoplastiranjem	35
3.2.11. Gel elektroforeza	36
3.2.12. Hibridizacija DNA po Southern-u	36
3.2.13. Lančana reakcija polimerazom (PCR – Polymerase Chain Reaction)	38
4. REZULTATI I RASPRAVA	40

4.1. MOLEKULARNA ANALIZA SOJEVA KVASACA <i>S. stipitis</i> I <i>K. marxianus</i> METODOM HIBRIDIZACIJE DNA PO SOUTHERN-U	40
4.1.1. Molekularna analiza sojeva kvasca <i>K. marxianus</i> koji proizvode L-laktat	41
4.1.2. Molekularna analiza sojeva kvasca <i>K. marxianus</i> koji proizvode 2,3-butandiol.....	42
4.1.3. Molekularna analiza sojeva kvasca <i>S. stipitis</i> koji proizvode L-laktat.....	44
4.2. MOGUĆNOSTI CILJANE INAKTIVACIJE GENA U KVASCU <i>S. stipitis</i> POMOĆU SUSTAVA CRISPR/Cas9	46
4.2.1. Izolacija i provjera strukture plazmida pRS54FcoHyg i pMiniT2-SsUH, te priprema disrupcijske kazete SsUH.....	47
4.2.2. Utjecaj koncentracije RNP kompleksa na uspješnost transformacije i zamijene gena <i>URA3</i> u <i>S. stipitis</i>	50
4.2.3. Optimizacija postupka transformacije kvasca <i>Scheffersomyces stipitis</i> protoplastiranjem	52
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	58

1. UVOD

Posljednjih godina, vrste kvasaca koje ne pripadaju konvencionalnim kvascima *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccaromyces pombe*, postaju sve važnije u industrijskim bioprocima. Nekonvencionalni kvasci kao što su *Kluyveromyces marxianus* i *Scheffersomyces stipitis* razmatrani su kao potencijalni domaćini zahvaljujući brojnim poželjnim karakteristikama. Kvasac *Scheffersomyces stipitis* jedan je od kvasaca s najvišom sposobnošću fermentacije ksiloze u etanol, no njegova primjena je otežana zbog korištenja alternativnog sustava kodona, rezistencije na najčešće korištene antibiotike, malog broja sojeva koji se uspješno transformiraju i integracije transformirajuće DNA ilegitimnom rekombinacijom. S druge strane kvasac *Kluyveromyces marxianus*, osim što može rasti na visokim temperaturama, odlikuje ga karakterističan brz rast i sposobnost korištenja širokog raspona supstrata što ga čini ekonomski poželjnim za komercijalne procese, no kao i kod kvasca *Scheffersomyces stipitis* česta ilegitimna rekombinacija čini uvođenje ciljnih genetičkih modifikacija izrazito teškim.

Transformacija je tehnika unosa strane DNA u stanicu koja rezultira genetičkom modifikacijom. Razvojem metoda genetičke transformacije kao što je protoplastiranje i elektroporacija otvorila su se vrata genetičkoj modifikaciji. Do nedavno, uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija u nekonvencionalnim kvascima isključivo se temeljilo na homolognoj rekombinaciji između genoma i homologne (transformirajuće) DNA, dok se danas sve češće koristi CRISPR/Cas9 sustav.

Prvi cilj ovog rada bila je provjera prethodno konstruiranih transformanata *Kluyveromyces marxianus* i *Scheffersomyces stipitis*, koji su dobri producenti L-laktata i 2,3-butanediola, metodom hibridizacije po Southern-u. Sa ciljem povećanja efikasnosti transformacije i genskog ciljanja kvasca *Scheffersomyces stipitis* ispitana je primjena CRISPR/Cas9 sustavom pri čemu je za transformaciju elektroporacijom korištena manja koncentracija RNP kompleksa nego u ranijim istraživanjima u laboratoriju. Posljednji cilj ovog rada bila je optimizacija protokola za transformaciju kvasca *Scheffersomyces stipitis* protoplastiranjem te određivanje uspješnost genskog ciljanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NEKONVENCIONALNI KVASCI U BIOTEHNOLOGIJI I METODE ZA NJIHOVU GENETIČKU MODIFIKACIJU

Osim konvencionalnih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, posljednjih godina sve je veći interes za primjenom drugih vrsta kvasaca, nekonvencionalnih kvasaca, u biotehnološkim procesima (Spencer i sur., 2002). Ovi kvasci imaju neke vrlo poželjne karakteristike kao što su osmotolerantnost, halotolerantnost, termotolerantnost, sposobnosti iskorištavanja različitih izvora ugljika, proizvodnje različitih spojeva i mnoge druge (Wagner i Alper, 2015). Međutim velik nedostatak nekonvencionalnih kvasaca je niska učinkovitost uvođenja ciljnih genetičkim modifikacija. Naime, kod nekonvencionalnih kvasaca najčešće je vrlo efikasna ilegitimna rekombinacija pri čemu se unesena transformirajuća DNA nasumično ugrađuje u genom za razliku od kvasca *S. cerevisiae* koji preferira homolognu rekombinaciju što rezultira visokom učinkovitosti genskog ciljanja (Vogl i sur., 2013). Prema tome, istraživači pokušavaju pronaći metode za poboljšavanje genskog ciljanja kako bi se otklonili nedostaci povezani s ilegitimnom rekombinacijom kao dominantnim mehanizmom popravka DNA u nekonvencionalnim kvascima. S tim ciljem, u posljednjih nekoliko godina sve se više primjenjuje sustav CRISPR/Cas9 za ciljanu modifikaciju genoma nekonvencionalnih kvasaca (Horwitz i sur., 2015).

2.1.1. Prednosti nekonvencionalnih kvasaca

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi koji imaju korisna fiziološka svojstva, otporni su na stresne uvjete, imaju mogućnost provođenja posttranslacijskih modifikacija i mogućnost uvođenja genetičkih modifikacija (Radecka i sur., 2015) te zbog toga imaju široku primjenu u biotehnologiji (Kim i sur., 2015). U mikrobnj kemijskoj proizvodnji koristi se mali broj modelnih mikroorganizama, od kojih su kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* dvije najistraživanije i najkorištenije vrste pa se oni smatraju konvencionalnim kvascima (Parapouli i sur., 2020). Lakoća genetičke manipulacije, zajedno s bogatstvom genetičkog i biokemijskog znanja omogućila je proizvodnju različitih spojeva pomoću konvencionalnih kvasaca iz jeftinih sirovina (Wagner i Alper, 2016.). Međutim, navedeni mikroorganizmi nisu idealni za širok raspon biotehnoloških zadataka zbog ograničenja u molekularnim i fiziološkim svojstvima. Primjerice, konvencionalni kvasci obično bolje rastu na

umjerenim temperaturama i zahtijevaju opsežne genetičke modifikacije kako bi mogli koristiti izvore ugljika koji nisu glukoza ili kako bi rasli u stresnim uvjetima (Hong i Nielsen, 2012) te imaju nizak prinos i neučinkovito izlučuju produkte (Buckholz i Gleeson, 1991). Navedeni izazovi mogu se riješiti korištenjem nekonvencionalnih kvasaca. Pojam nekonvencionalni kvasci odnosi se na sve ostale vrste kvasaca koje se razlikuju od navedenih konvencionalnih vrsta. Do danas je opisano nekoliko tisuća različitih vrsta nekonvencionalnih kvasaca, no samo se mali broj koristi u industriji (Radecka i sur., 2015). Neki od najpoznatijih nekonvencionalnih kvasaca su *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* i *Pichia pastoris*. Ovi nekonvencionalni kvasci razlikuju se od konvencionalnog kvasca *S. cerevisiae* po tome što su Crabtree negativni i preferiraju respiraciju umjesto fermentacije što je korisno za proizvodnju proteina i biosintezu kemikalija koje nisu etanol (Wagner i Alper, 2016). Također, razmatrani su kao potencijalni domaćini za proizvodnju heterolognih proteina i raznih biokemikalija zahvaljujući njihovim poželjnim fenotipovima kao što je termotolerancija, osmotolerancija, otpornost na inhibitore proizvedene iz različitih bioprocasa, korištenje širokog raspona izvora ugljika, kao i mogućnost izlučivanja velike količine proteina i lipida (Patra i sur., 2021). Unatoč prednostima, metaboličko inženjerstvo nekonvencionalnih kvasaca ostaje izazov zbog nedostataka informacija o njihovom metabolizmu i genomici te ograničenih alata za precizno uređivanje genoma, tj. genetičko inženjerstvo (Lobs i sur., 2017).

2.1.2. Metode za genetičku transformaciju nekonvencionalnih kvasaca

Transformacija je važna tehnika u kojoj se strana DNA uvodi u stanicu što rezultira genetičkom modifikacijom. Razvijeno je nekoliko metoda za transformaciju stanica nekonvencionalnih kvasaca uključujući metodu elektroporacije, metode protoplastiranja, metode pomoću litij acetata, biolističke metode i metode pomoću staklenih kuglica. Učinkovitost transformacije svakom od ovih metoda može se povećati optimizacijom protokola, iako je ona uglavnom niža nego kod konvencionalnog kvasca *S. cerevisiae* (Ito i sur., 1983).

Najčešće korištena metoda je metoda litijevim acetatom zbog brzine i učinkovite transformacije. Druga, dugotrajnija metoda transformacije je protoplastiranje, dok je najbrža i najjednostavnija metoda elektroporacije (Ausubel i sur., 2001).

2.1.2.1. Elektroporacija

Elektroporacija je fizička metoda za transformaciju stanica prokariota i eukariota koja koristi kratak impuls električne struje visokog napona pri čemu dolazi do privremenog povećanja permeabilnosti stanične membrane nastankom pora i time se stranim molekulama omogućuje ulazak u stanicu (IDT). Ova metoda zbog svoje jednostavnosti i efikasnosti ima mnoge primjene u biotehnologiji, medicini i prehrambenoj industriji.

Metoda elektroporacije prvi puta je opisana 1972. godine (Neumann i Rosenheck, 1972), a imenovali su je Neumann i sur. 1982. godine. Ova metoda dugo se koristila kao *in vitro* alat te su je Titomirov i sur. (1991) prvi puta proveli *in vivo* za isporuku genetičkom materijala. Danas, ona predstavlja važan alat u genetičkom inženjerstvu te je njena uporaba proširena za isporuku cjepiva i lijekova (Keane-Myers i Bell, 2014), genske i stanične terapije (Prud'homme i sur., 2006). Također, razvijene su tehnike za provedbu elektroporacije *in utero* kod miševa (Saito i sur., 2001) i *in ovo* kod pilića i zmija (Cárdenas i Borrell, 2021).

Elektroporacija se temelji na jednostavnom procesu. Stanice domaćina i željene molekule suspendirane su u slabo vodljivoj otopini koje se nalaze u kivetu za elektroporaciju. Kivete za elektroporaciju imaju metalne ploče s obje strane i omogućuju prolaz električne struje kroz suspenziju. Kiveta se postavlja u komoru elektroporatora formirajući zatvoreni električni krug. Kontrole na uređaju za elektroporaciju omogućuju korisniku postavljanje napona, valnog oblika i trajanje električnog impulsa prema tipu ciljane stanice. Električni impuls optimiziranog napona, najčešće između 1 do 2 kV, u trajanju od nekoliko mikrosekundi do nekoliko milisekundi prolazi kroz kivetu sa uzorkom. To destabilizira fosfolipidni dvosloj membrane i rezultira stvaranjem privremenih pora. Pore nastaju zbog nakupljanja naboja na membrani, odnosno transmembranskog signala, što uzrokuje povećanje propusnosti i omogućuje nabijenim molekulama poput DNA prolazak kroz pore membrane (Shigekawa i Dower, 1988.).

Stanica je propusna najprije na polu koji je okrenut prema pozitivnoj elektrodi, a tek potom permeabilizira pol stanice koji je okrenut prema negativnoj elektrodi. Iako se veća propusna površina nalazi na polu koji je okrenut prema pozitivnoj elektrodi, većina molekula ulazi u stanicu na polu koji je okrenut prema negativnoj elektrodi. Stupanj permeabilnosti membrane ovisi o jačini, trajanju i broju pulseva (Gabriel i Teissie, 1997). Nakon prolaska električnog impulsa, pore se počinju zatvarati (Saulis, 1997). Brzina zatvaranja pora razlikuje se od stanice do stanice, ali obično

je u rasponu od milisekunde do nekoliko minuta. U ovoj fazi stanice su osjetljive i s njima se mora pažljivo postupati sve dok se ne podijele (Saulis i sur., 1991).

Glavna prednost elektroporacije je mogućnost njene primjene za transformaciju svih vrsta stanica. Budući da je elektroporacija brza i jednostavna, može se transformirati veliki broj stanica u kratkom vremenu nakon optimizacije uvjeta elektroporacije. Glavni nedostatak elektroporacije velika je smrtnost stanica uzrokovana visokonaponskim impulsima i djelomično uspješan popravak membrane, zbog čega je potrebno korištenje većeg broja stanica.

2.1.2.2. Metoda protoplastiranja

Stanice kvasca čija je stanična stijenka gotovo potpuno uklonjena nazivaju protoplasti, odnosno sferoplasti (Eckhaut i sur., 2013). Metoda protoplastiranja temelji se na djelomičnom uklanjanju stanične stijenke mehaničkom ili češće enzimskom razgradnjom nakon čega se omogućuje ulazak strane DNA endocitozom (Peberdy, 1979). Za uspješnu transformaciju kvasaca drugim metodama, strana DNA mora proći kroz staničnu stijenku i membranu kako bi stigla u citosol i ušla u jezgru. Stanična stijenka elektrostatički i fizički ometa unos DNA te je njenim uklanjanjem olakšana genetička transformacija, fuzija stanica i mikroinjektiranje (Biot-Pelletier i Martin, 2004).

Ključni postupci za transformaciju protoplasta uključuju uklanjanje komponenata stanične stijenke enzimima i naknadnu obradu protoplasta kemijskim reagensima, kao što su kalcijevi ioni ili polietilen glikol (PEG) kako bi se omogućio unos nukleinskih kiselina u protoplaste (Li i sur., 2017). Stanična stijenka gljiva najčešće se sastoji od polimera kao što su dekstran, hitin, manoza i mano-proteini. Međutim, njen sastav razlikuje se ovisno o vrsti, okolini i načinu rasta stanica (Gow i sur., 2017). Prema tome, za učinkovito protoplastiranje važan je odabir enzima koji razgrađuju staničnu stijenku kao što su hitinaze, celulaze i proteaze. Osim toga, protoplasti su vrlo osjetljivi na osmotski tlak tijekom razgradnje stanične stijenke te tijekom same transformacije, pa se stanice protoplasta moraju nalaziti u izotoničnoj otopini specifičnih soli ili šećera kako bi se očuvao njihov integritet. Takve otopine nazivaju se osmotski stabilizatori i koriste se za održavanje stanične strukture i sprječavanje pucanja stanične membrane (Gallmetzer i sur., 1999). Vijabilni protoplast sposoban je za regeneraciju stanične stijenke, staničnu diobu i rast (Lalithakumari, 2000).

Protoplasti kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prvi su put uspješno transformirani 1978. godine (Kawai i sur., 2004). Unatoč visokoj uspješnosti transformacije, metoda protoplastiranja

nije uspjela postati raširen i popularan protokol zbog česte fuzije stanica koja dovodi do nastajanja diploidnih i poliploidnih transformanata iz ishodišnih haploidnih stanica (Harashima i sur., 1984), dugotrajnog i složenog postupka te uklapanja transformanata u regeneracijski agar, što onemogućuje direktno repliciranje kolonija na krutim hranjivim podlogama (Burke i sur., 1987). Unatoč svim nedostacima, ova metoda i dalje ima važnu primjenu u pojedinim genetičkim istraživanjima.

2.1.3. Metode za ciljnu genetičku modifikaciju nekonvencionalnih kvasaca

Jedinstvene fiziološke karakteristike nekonvencionalnih vrsta kvasca mogu omogućiti smanjenje proizvodnih troškova bioprocasa. Dobivanje potrebnih informacija o sekvencama genoma relativno jednostavno zbog brzog razvoja sekvenciranja cijelog genoma (Goodwin, i sur., 2016.), no genetičke modifikacije klasičnim metodama još uvijek su izazov uglavnom zbog popravka DNA prvenstveno ilegitimnom rekombinacijom, tj. nehomolognim sparivanjem krajeva (eng. non-homologous end joining, NHEJ) koje prevladava u nekonvencionalnim kvascima (Nonklang i sur. 2008). Za razliku od kvasca *S. cerevisiae*, ovi kvasci preferiraju mehanizam popravka DNA ilegitimnom rekombinacijom, dok rijetko koriste homolognu rekombinaciju (eng. „homologous recombination“, HR), što precizno uređivanje genoma čini neučinkovitim jer se homologna transformirajuća DNA ne integrira u ciljani lokus genoma (Klinner i Schafer, 2004). Uvođenje dvolančanog loma (eng. „Double Strand Break“, DSB) u ciljani lokus DNA olakšava uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija, bilo uvođenjem mutacija na mjestu loma DNA ili stimuliranjem popravka DNA homolognom rekombinacijom s transformirajućom DNA (Jasin i Rothstein 2013). U posljednjem desetljeću, razvijen je sustav CRISPR-Cas9 kao snažan i svestran alat za uređivanje genoma širokog spektra organizama (Hsu i sur., 2014) uključujući i nekonvencionalne kvasce.

2.1.3.1. Homologna rekombinacija

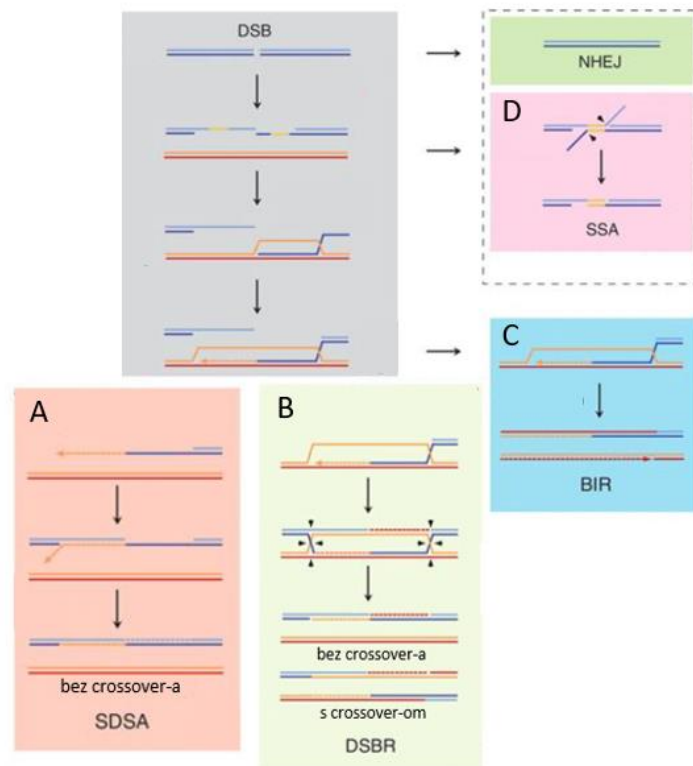
Homologna rekombinacija (eng. „homologous recombination“, HR) je mehanizam popravka DNA koji je prisutan u svim oblicima života koji osigurava vjeran popravak DNA prema predlošku, toleranciju na složena oštećenja uključujući dvolančane lomove i praznine i međulančano povezivanje DNA (eng. „Interstrand crosslinks“ ICLs). Osim svoje uloge u očuvanju

genoma, homologna rekombinacija ima važnu ulogu u replikaciji DNA i održavanju telomera (Li i Heyer, 2008).

Dvolančani lom u DNA može se popraviti jednim od dva osnovna mehanizma popravka, ilegitimnom rekombinacijom (eng. „non-homologous end joining“, NHEJ) i homolognom rekombinacijom. Popravak DNA homolognom rekombinacijom zahtjeva prisutnost donorske sekvence koja služi kao kalup za popravak loma, dok popravak DNA ilegitimnom rekombinacijom ne zahtjeva donorsku sekvencu već se provodi ligacijom krajeva oštećene DNA (Weninger i sur., 2016). Odabir mehanizma popravka dvolančanog loma ovisi o vrsti stanice, ploeditetu i fazi staničnog ciklusa. Kvasci pokazuju veliku varijabilnost u tome preferiraju li popravak homolognom ili ilegitimnom rekombinacijom kao glavnim mehanizmom popravka dvolančanog loma. Nekonvencionalni kvasci većinom preferiraju nehomolognu (ilegitimnu) rekombinaciju, dok je homologna rekombinacija najčešći mehanizam popravka u kvascu *S. cerevisiae* (Näätsaari i sur., 2012).

Popravak dvolančanog loma homolognom rekombinacijom događa se u tri faze: presinapsa, sinapsa i postsinapsa. Tijekom presinapse dolazi do degradacije 5'-jednolančanih krajeva što rezultira nastajanjem 3'-jednolančanih krajeva na čije se krajeve vežu proteini koji sudjeluju u homolognoj rekombinaciji te započinje potraga za homolognom donorskom DNA. Nakon pronalaska homologne DNA, 3'-jednolančani krajevi oštećene DNA ulaze i komplementarno se povezuju s neoštećenom DNA i započinje sinteza na 3'-jednolančanom kraju oštećene DNA. Ovisno o daljnjim događajima razlikujemo tri mehanizma popravka. U prvom slučaju dolazi do istiskivanja novosintetiziranog lanca iz donorske regije i komplementarnog sparivanja jednolančanih 3'-krajeva recipijentne regije pa se radi o popravku mehanizmom SDSA (eng. „Synthesis Dependent Strand Annealing“, slika 1A) (Ferguson i Holloman, 1996). U drugom slučaju dolazi i do komplementarnog sparivanja drugog 3'-jednolančanog kraja oštećene DNA s donorskom regijom prilikom čega nastaje Holliday-eva struktura koja može biti razriješena sa ili bez recipročne izmjene, a riječ je o popravku mehanizmom DSBR (eng. „Double Strand Break Repair“, slika 1B) (Szostak i sur., 1983). U trećem slučaju može doći do gubitka drugog kraja prelomljene DNA te se u tom slučaju sinteza nastavlja dvolančanim lomom potaknutom replikacijom (eng. „Break Induced Replication“, slika 1C) (McEachern i Haber, 2006). Poslijednji mehanizam popravka je SSA (eng. „Single Strand Annealing“, slika 1D) koji se javlja ukoliko se dvolančani lom dogodio između direktno ponovljenih sekvenca, pri čemu nakon 5'-3' procesiranja

dolazi do komplementarnog povezivanja 3'- jednolančanih krajeva što rezultira gubitkom DNA između ponovljenih regija i jedne ponovljene sekvencije (Symington, 2002).



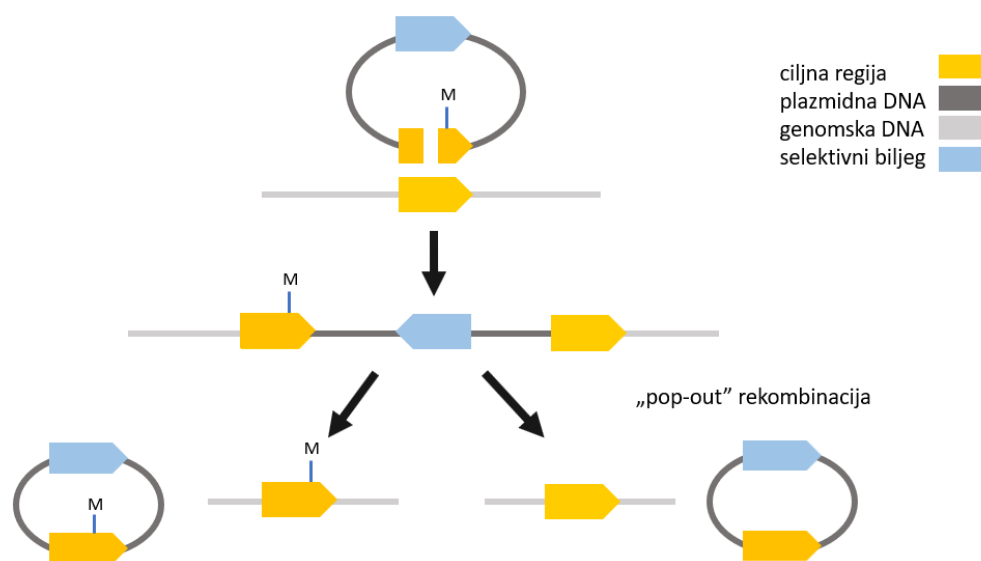
Slika 1. Popravak dvolančanog loma homolognom i ilegitimnom rekombinacijom. Popravak dvolančanoh loma homolognom rekombinacijom može se provesti mehanizmom popravka A) SDSA, B) DSBR, C) BIR i D) SSA. Detaljna objašnjenja nalaze se u tekstu (prema Krejci i sur., 2012)

Homologna rekombinacija omogućuje primjenu dva pristupa uvođenja ciljnih genetičkih modifikacija pomoću linearnih fragmenata DNA u kvascu *S. cerevisiae*, ali i u nekim drugim vrstama kvasaca: modifikacija gena u dva koraka i modifikacija gena u jednom koraku.

2.1.3.1.1. Modifikacija gena u dva koraka

Modifikacija gena u dva koraka provodi se uvođenjem željene modifikacije u regiju na integrativnom plazmidu koja je homologna ciljnoj sekvenci u genomu. Integrativni plazmid sadrži selektivni marker, a integracija u ciljnu sekvencu genoma usmjerena je uvođenjem dvolančanog loma u ciljnu regiju u plazmidu (slika 2). Popravak dvolančanog loma, osim homolognom rekombinacijom, može se popraviti i ilegitimnom rekombinacijom koja se događa s niskom učestalošću u *S. cerevisiae* (Svetec i sur., 2007). Tijekom transformacije stanica kvasaca dolazi do

komplementarnog sparivanja lineariziranog plazmida s homolognom regijom u genomu pri čemu su krajevi transformirajuće DNA okrenuti jedan prema drugome te dolazi do integracije plazmida (rekombinacija „krajevi unutra“, eng. „ends-in“). Rezultat integracije je duplikacija ciljne regije pri čemu jedna kopija sadrži željenu modifikaciju, a između se nalazi cijeloukupna okosnica integriranog plazmida zajedno sa selektivnim biljegom. Budući da su ciljne regije homologne, između njih se može odviti rekombinacija uz recipročnu izmjenu (eng. „crossing-over“) te dolazi do gubitka modificirane ili nemodificirane ciljne regije i plazmida sa selektivnim biljegom („pop out“ rekombinacija). Nakon toga potrebna je detaljna molekularna analiza za utvrđivanje prisutnosti željene modifikacije jer je vjerojatnost zadržavanja modificirane i nemodificirane verzije gena jednaka.

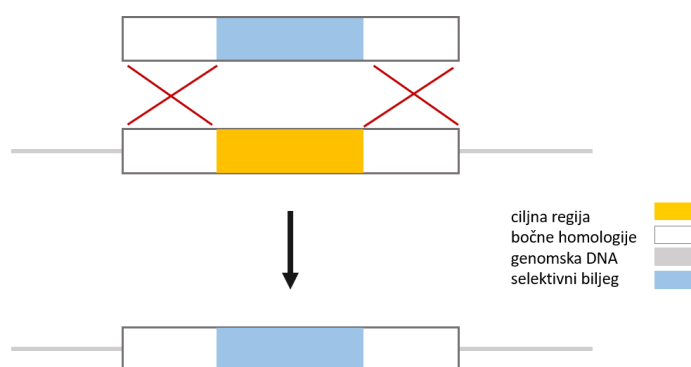


Slika 2. Shematski prikaz modifikacije gena u dva koraka rekombinacijom „krajevi unutra“. M – modifikacija koja se želi unijeti u genom

2.1.3.1.2. Modifikacija gena u jednom koraku

Modifikacija gena u jednom koraku temelji se na zamjeni ciljne regije u genomu s transformirajućom DNA. Transformirajuća DNA linearni je fragment DNA koji sadrži marker za selekciju koji je omeđen bočnim homolognim sekvencama s obje strane (slika 3). Tijekom transformacije dolazi do komplementarnog povezivanja homolognih regija transformirajuće DNA

s homolognim regijama koje okružuju ciljni gen u genomu pri čemu su krajevi okrenuti jedan od drugog pa se ovaj tip homologne rekombinacije naziva rekombinacija „krajevi van“ (eng. „ends-out“) ili zamjena gena (Rothstein, 1983). Posljedica zamijene ciljnog gena sa selektivnim markerom je inaktivacija tog gena, no zamjena gena može biti popraćena različitim neželjenim događajima kao što su ilegitimna rekombinacija, integracija transformirajućeg fragmenta pored cijele regije ili duplikacija cijelog kromosoma (Sveteć i sur. 2007; Štafa i sur., 2014). Modelni kvasac *S. cerevisiae* ima efikasan mehanizam homologne rekombinacije te pri bočnim homologijama duljine 40 pb gensko ciljanje omogućeno je u 10 % slučajeva (Baudin i sur., 1993) dok je produljenjem bočnih homologija uspješnost genskog ciljanja povećano do 90% (Pâques i Haber, 1999).

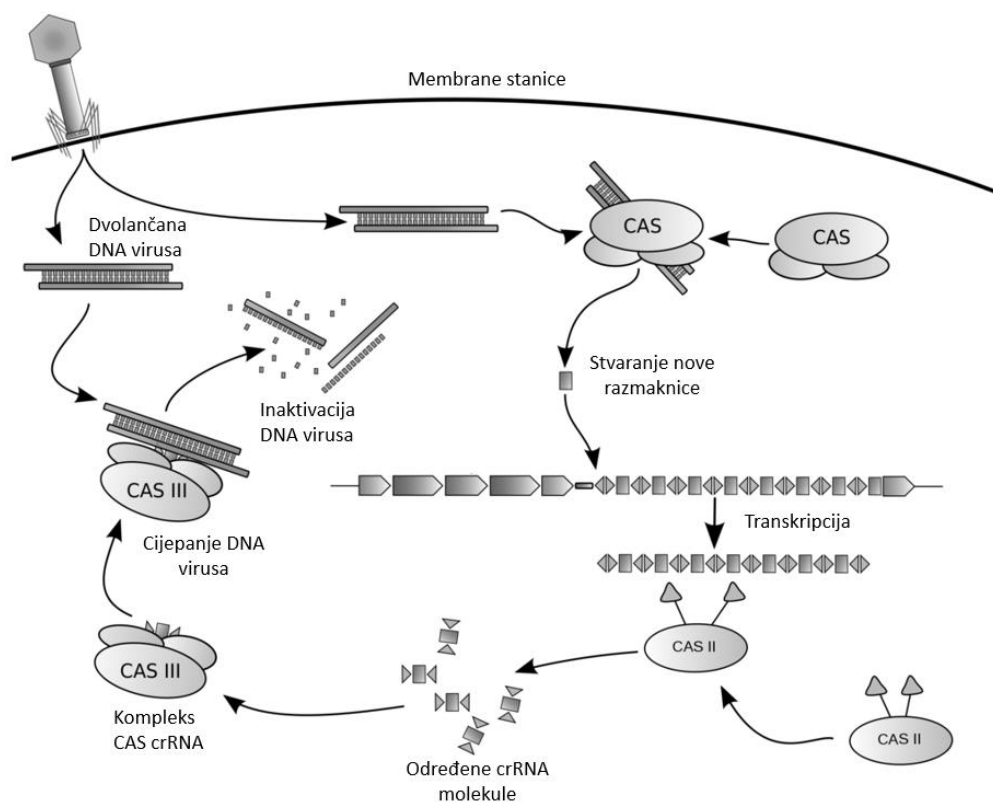


Slika 3. Shematski prikaz modifikacije gena u jednom koraku rekombinacijom „krajevi van“

2.1.3.2. SUSTAV CRISPR/Cas9

Sekvence CRISPR (eng. „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“) su kratka palindromska ponavljanja, međusobno razmaknuta kratkom sekvencom, virusnog ili plazmidnog podrijetla, a nalaze se unutar genoma prokariota. Ovaj sustav oblik je stečene imunosti i pronađen je gotovo polovici bakterijskih genoma i gotovo svima genomima arheja (Grissa i sur., 2007). Uređivanje genoma sustavom CRISPR/Cas9 temelji se na prirodnom imunološkom procesu obrane bakterija i arheja od infekcije virusom, konjugacije i prirodne transformacije tako što prepoznaje i degradira stranu DNA koja uđe u stanicu, omogućavajući bakterijama pamćenje i razgradnju virusne DNA pri ponovnoj infekciji (Lander i sur., 2016). Prva faza obrane od virusa uključuje prepoznavanje i izrezivanje kratke sekvence DNA iz virusne DNA pomoću proteina Cas1 i Cas2 te njeno ubacivanje u CRISPR lokus u bakterijskom genomu, stvarajući novu razmaknicu (eng. „protospacer“) čime se stvara „sjećanje“ na prošle infekcije. Protein Cas1 ima endonukleaznu

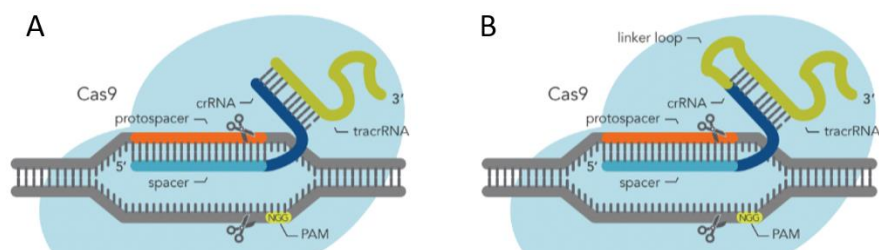
i integraznu aktivnost (Wiedenheft i sur., 2009), dok je protein Cas2 endoribonukleaza (Beloglazova i sur., 2008). Nadalje, ako ista vrsta virusa ponovo pokuša zaraziti bakteriju, CRISPR sekvenca se transkribira u pre-crRNA, koja se povezuje s Cas proteinima za daljnje procesiranje u zrele crRNA (eng., „CRISPR RNA“) koja sadrži jednu razmaknicu (eng. „spacer“) komplementarnu dijelu genoma virusa (Staals i sur., 2013). Takva RNA tvori kompleks s proteinom Cas3, ATP-ovisnom helikazom i translokazom (He i sur., 2020), koja u posljednjoj fazi cilja i razgrađuje stranu sekvencu DNA/RNA koji sadrže specifične sekvence od 2-5 baza na ciljnoj nukleinskoj kiselini, PAM (eng. „protospacer-adjacent motif“) (Gasiunas i sur., 2012). Bakterijski genom je zaštićen od CRISPR/Cas9 sustava jer ne ugrađuje PAM sekvencu, važnu za aktivnost Cas nukleaze, u genom (Marraffini i Sontheimer, 2010). Posljednji korak bakterijskog imunološkog procesa, vezanje gRNA s Cas nukleazom i cijepanje ciljne DNA osnova je za korištenje sustava CRISPR/Cas u svrhu modifikacije genoma u laboratorijima (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz stjecanja imunosti prokariota pomoću CRISPR/Cas sustava (prema Horvath i Barrangou, 2010)

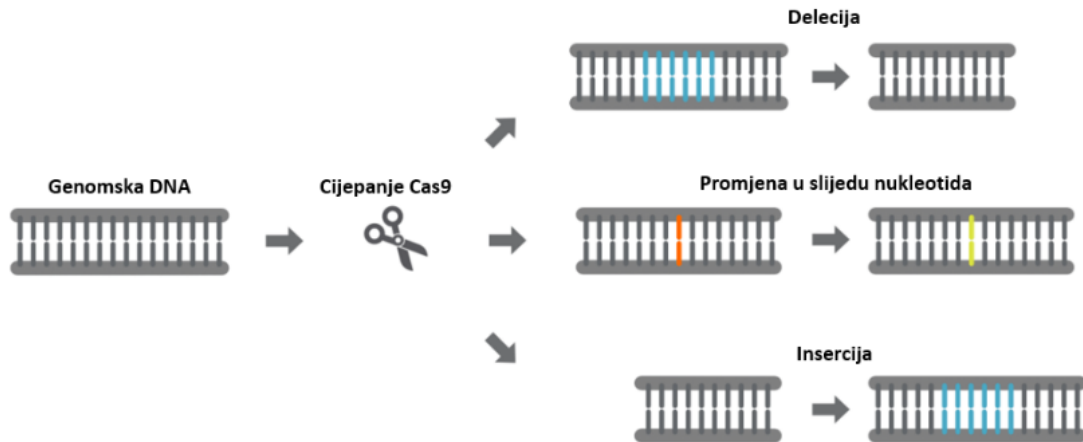
Proteklih nekoliko desetljeća razvijeni su alati za precizno uređivanje genoma kao što su TALENs (eng. „transcription activator-like effector nucleases“) (Reyon i sur., 2012), ZNFs (eng. „zinc finger nuclease“) i CRISPR/Cas9. Prednost CRISPR/Cas9 u odnosu na ostale alate za

precizno uređivanje gena je u tome što se za svaki eksperiment ne moraju dizajnirati proteini već se dizajnira gRNA, što je brže i jednostavnije (Cai i sur., 2019). Uređivanje genoma pomoću CRISPR/Cas sustava zahtijeva 2 komponente: enzim Cas i gRNA. Ove komponente se udružuju u ribonukleoproteinski (RNP) kompleks. Molekula gRNA komplementarno se povezuje sa ciljnom sekvencom DNA duljine 20 baza (eng. „protospacer“), u čijoj se blizini nalazi PAM sekvenca. PAM sekvenca dugačka je samo nekoliko baza, a njena prisutnost utječe na aktivnost Cas nukleaze. Nakon vezanja RNP kompleksa na ciljnu sekvencu DNA (eng. „protospacer“), Cas enzim cijepa ciljnu sekvencu u točno određenom mjestu, stvarajući jednolančani ili dvolančani lom, ovisno o korištenom Cas enzimu (IDT). Najčešće korištene Cas nukleaze (eng. „CRISPR associated enzyme“) su Cas9 i Cas12. Enzim Cas9 je nespecifična endonukleaza, koja je izolirana iz *Streptococcus pyogenes*, dok je enzim Cas12 (poznat i kao Cpf1) izoliran iz rodova *Acidaminococcus* ili *Lachnospiraceae*. Uz to, danas na tržištu postoji veliki izbor modificiranih nukleaza s poboljšanim funkcijama. Druga komponenta CRISPR/Cas9 sustava, gRNA može biti dizajnirana kao jednokomponentni, odnosno dvokomponentni sustav. Dvokomponentni sustav sastoji se od dvije molekule RNA, crRNA i tracrRNA. Molekula crRNA se sastoji od dijela komplementarnog ciljnoj sekvenci (eng. „spacer“), duljine 20 nukleotida, (prikazan na slici 5 svijetlo plavom bojom) i domene koja se hibridizira s tracrRNA (prikazan na slici 5 tamnoplavom bojom). Molekula tracrRNA (prikazan na slici 5 zelenom bojom) dijelom hibridizira s crRNA, a dijelom je vezana na protein Cas9. Nasuprot toga, jednokomponentni sustav sastoji se od molekula crRNA i tracrRNA koje su međusobno povezane petljom i tvore sgRNA (eng. „single guide RNA“). Prednost korištenja dvokomponentnog sustava je to što molekula tracrRNA za svaki eksperiment ostaje ista, dok se smjenjuje crRNA (IDT). RNP kompleks može se formirati unutar stanice, ako su u stanicu uneseni plazmidi ili virusi koji sadrže gene koji kodiraju za enzim Cas i gRNA, ili izvan stanice, ukoliko se za formiranje RNP kompleksa koriste izolirani Cas proteini i sintetizirane molekule gRNA (IDT).



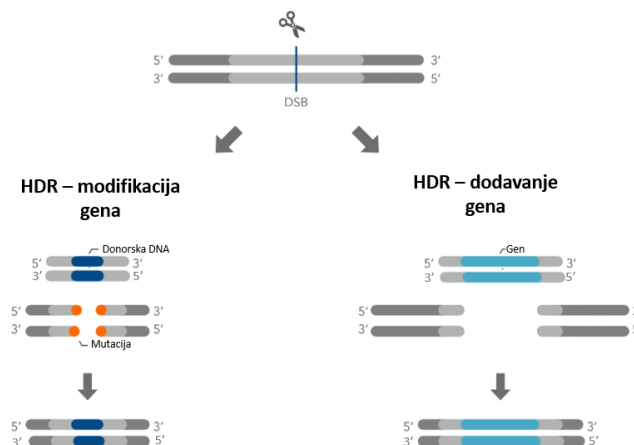
Slika 5. Usporedba sustava CRISPR/Cas9 s molekulom gRNA koja se sastoji od tracrRNA i crRNA (A) te molekulom sgRNA (B) (prema IDT)

Najčešća primjena CRISPR/Cas sustava je za disrupciju gena (eng. „knock-out“). Cas nukleaza uvodi dvolančani lom koji se popravlja ilegitimnom rekombinacijom. Nehomologno spajanje krajeva rezultira mutacijama, insercijama ili delecijama, koje rezultiraju pomakom okvira čitanja i inaktiviraju ciljni gen (slika 6.).



Slika 6. Mogući ishodi popravka dvolančanog loma nehomolognim spajanjem krajeva nakon djelovanja enzima Cas (prema IDT)

Osim inaktivacije gena, CRISPR/Cas9 koristi se i za precizno insertiranje gena (eng. „knock-in“), koje se temelji na popravku dvolančanog loma homolognom rekombinacijom (eng. „Homology Directed Repair“, HDR). Tijekom HDR u stanicu se transformacijom uvodi donorska DNA s djelovima homolognim DNA koji će se pri popravku ugraditi u genom i doći će do uvođenja željene mutacije (slika 7.) (IDT).



Slika 7. Mogući ishodi popravka dvolančanog loma homolognom rekombinacijom djelovanjem proteina Cas ukoliko je u stanicu unesen linearni fragment DNA koji se koristi za popravak loma (prema IDT)

Iako je glavna uloga CRISPR/Cas9 sustava brzo i jednostavno uvođenje dvolančanog loma na gotovo bilo koje ciljno mjesto u genomu, on se može koristiti i za utišavanje ili aktiviranje gena pri čemu se koristi Cas protein koji nema nukleaznu aktivnost (eng. „dead Cas“, dCas) fuzioniran s aktivatorom ili represorom te se može koristiti za vizualizaciju i epigenetičku modifikaciju (Polstein i Gersbach, 2015).

2.2. BIOTEHNOLOŠKA SVOJSTVA I KONSTRUKCIJA SOJEVA KVASACA *Scheffersomyces stipitis*

Scheffersomyces stipitis (prema ranijoj klasifikaciji *Pichia stipitis*), je homotaličan, najčešće haploidan kvasac (Kurtzman i sur., 1990). Pripada skupini kvasaca koji fermentiraju ksilozu, a izoliran je iz crijeva kukaca koji razgrađuju drvo (Nardi i sur., 2006). Genom je u potpunosti sekvencioniran (Jeffries i sur., 2007) i pripada „CUG“ grupi kvasaca koji pri translaciji kodona CUG ugrađuju serin umjesto leucina (Riley i sur., 2016).

Ksiloza je gradivna jedinica hemiceluloze, drugog najzastupljenijeg šećera u lignoceluloznoj biomasi (Gao i sur., 2017). Kvasac *S. stipitis* jedan je od kvasaca s najvećom sposobnošću fermentacije ksiloze (du Preez i sur., 1989) te se primjenjuje u proizvodnji etanola iz lignoceluloznih sirovina, bioobnovljivog izvora energije (Jeffries i sur., 2007). Osim iskorištavanja ksiloze, kvasac *S. stipitis* koristi i druge šećere iz lignoceluloznih hidrolizata i na taj način proizvoditi etanol. Fermentira ligninske dijelove, reducira acikličke enone u odgovarajuće alkohole i tvori različite estere i komponente arome. U industriji se koristi za proizvodnju mliječne kiseline i ksilitola (Conceicao i sur., 2003). Kvasac *S. stipitis* može biti koristan i u proizvodnji visoko vrijednih spojeva, kao što su flavonoida i alkaloida, proizvedeni putem šikiminske kiseline (Gao i sur., 2017).

U odnosu na konvencionalne kvasce, *S. stipitis* ima sporiju brzinu fermentacije, nisku toleranciju na etanol i potrebu za kisikom tijekom rasta. Tijekom uzgoja na lignoceluloznim sirovinama onemogućena je istovremena fermentacija glukoze i ksiloze, slabo je tolerantan na inhibitore prisutne u hidrolizatima te ima tendencija iskorištavanja proizvedenog etanola pri značajnoj količini ksiloze u mediju (Harner i sur., 2015). Među najvećim izazovima je niska učinkovitost transformacije i nedostatak alata za genetičku manipulaciju (Cao i sur., 2017). Ciljana

manipulacija genoma *S. stipitis* kompliciranija je u odnosu na konvencionalni kvasac zbog prirodne rezistencije većine sojeva na uobičajeno korištene antibiotike pa se samo mali broj sojeva može učinkovito transformirati. Nadalje, korištenje alternativnog sustava kodona (Riley i sur., 2016) i preferiranje ilegitimne rekombinacije dodatno otežava rad s ovim kvascem (Jeffries i Van Vleet, 2009).

Unatoč tome, Melake i sur. (1996) razvili su sustave za sporulaciju i parenje kvasaca *S. stipitis*. Lu i sur., (1998) razvili su sustave transformacije temeljene na selektivnim biljezima *URA3*, *LEU2*, *TRP5* i *HIS3*. Laplaza i sur. (2006) razvili su selektivni biljeg temeljen na rezistenciji na antibiotik zeomicin. Uređivanje genoma znatno je olakšano razvojem protokola za transformaciju, replikativnih i integrativnih vektora, rekombinacijskog *loxP/Cre* sustava (Laplaza i sur., 2006) te korištenjem nasumične mutageneze UV zračenjem, adaptivnom evolucijom, i fuzijom protoplasta (Shi i sur., 2014).

Nedavno je razvijen sustav CRISPR/Cas9 koji inaktivira ciljne gen uvodeći mutacije koje se temelje na mehanizmu popravka DNA ilegitimnom rekombinacijom (Cao i sur., 2017). Međutim, uvođenje takvih mutacija ne smatra se ciljanim uređivanjem genoma i dalje se istražuju metode modifikacije genoma koje se temelje na mehanizmu popravka DNA homolognom rekombinacijom kako bi se mogle ostvariti metode genetičkog inženjerstva kao što je ciljna integracija, mjesno specifične mutacije i funkcionalne zamjene. Učinkovitost homologne rekombinacije uspješno je povećana primjenom sustava CRISPR/Cas9 na sojevima kvasaca *S. stipitis* s inaktiviranim genima *KU70* i *KU80* (Cao i sur., 2018).

2.3. BIOTEHNOLOŠKA VAŽNOST I KONSTRUKCIJA SOJEVA KVASACA *Kluiveromyces marxianus*

Kluiveromyces marxianus (prema ranijoj klasifikaciji *Saccharomyces marxianus*), homotalični je kvasac, postoji i u haploidnom i u diploidnom obliku, dok u stresnim uvjetima ima tendenciju postati diploidan i stvarati spore (Lee i sur., 2018). Nazvan je po Louisu Marxu, osobi koja je prva izolirala ovaj kvasac iz grožđa (Lodder i Kreger-van Rij 1952). Može biti izoliran iz različitih izvora od mliječnih proizvoda do šećerne trske, se najčešće izolira iz sira i drugih mliječnih proizvoda (Radecka i sur., 2015). Smatra se ekstremno termotolerantnim mikrobom koji može rasti na temperaturama do 52 °C pa se može koristiti za proizvodnju bioetanola na višim

temperaturama, smanjujući ne samo kontaminaciju, već i troškove hlađenja u bioreaktorima (Nambu-Nishida i sur., 2017).

Kvasac *K. marxianus* klasificiran je kao aeroban, fakultativno fermentativan (ili respiratorno fermentativan) i Crabtree negativan (van Dijken i sur. 1993). Kvasac *K. marxianus* fermentira šećere u aerobnim uvjetima, dok je proizvodnja etanola isključivo povezana s fermentacijom šećera u uvjetima niske koncentracije kisika, a u strogo anaerobnim uvjetima kvasac ne može rasti (Visser i sur. 1990). *K. marxianus* koristi širok raspon različitih izvora ugljika, kao što su glukoza, laktoze, galaktoza, inulin, ksiloza, ksilitol, celobioza, laktoza i arabinoza (Nonklang i sur., 2008). Zbog mogućnosti fermentacije šećera koji se nalaze u biljnom (ksiloza i inulin) i mliječnom (laktoza) otpadu, konstruirani su sojevi kvasaca *K. marxianus* za proizvodnju bioetanola iz tokova sirove otpadne sirutke i hidrolizata lignocelulozne biomase kao izvora ugljika (Lobs i sur., 2017), no modificirani sojevi proizvode etanol u koncentraciji manjoj od konvencionalnog kvasca *S. cerevisiae* (Diniz i sur., 2017).

Ostale prednosti u odnosu na konvencionalni kvasac su karakterističan brz rast, otpornost na toksin furaldehid i širok raspon pH vrijednosti (pH 2,5–9). Trenutno se *K. marxianus* koristi u nekoliko industrijskih bioprocasa, kao što je proizvodnja etil acetata, rekombinantnih proteina i enzima (inulinaza i β -galaktozidaza) (Rouwenhorst i sur., 1988) te zbog toga što je ima GRAS status, proizvodi spojeve koji se koriste u prehrambenoj industriji poput spojeva arome i biosastojaka (Kim i sur., 2014).

Genom *K. marxianus* potpuno je sekvenciran (Jeong i sur., 2012), no zbog česte nehomologne integracije transformirajuće DNA ograničene su mogućnosti uređivanja genoma (Cheon i sur., 2014). Za konstrukciju modificiranih sojeva najčešće se koriste promotori iz *K. marxianus* (Yang i sur., 2015.), selekcijski markeri su obično acetamid (amdS), G418, higromicin B uz auksotrofne markere za uridin, leucin i triptofan te se najčešće transformira pomoću protokola litij acetata (Colussi i Taron, 2005). Konstruirani su sojevi *K. marxianus* koji nose višestruke integracije stranih gena pomoću metode loxP/Cre (Ribeiro i sur., 2007), dok su Nambu-Nishida i sur. (2017) razvili sojeve s inaktiviranim proteinima koji sudjeluju u ilegalnoj rekombinaciji kako bi se povećala razina homolognu integraciju u ovom kvascu. Sustav CRISPR/Cas9 uspješno je primijenjen u *K. marxianus* i korišten za karakterizaciju npr. funkcionalni geni u put biosinteze etil acetata (Nambu-Nishida i sur., 2017).

3. MATERJALI I METODE

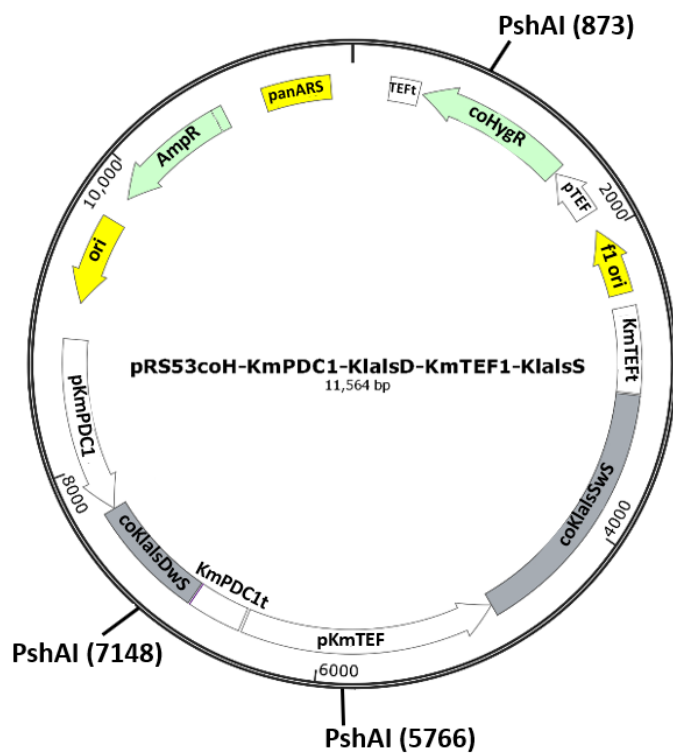
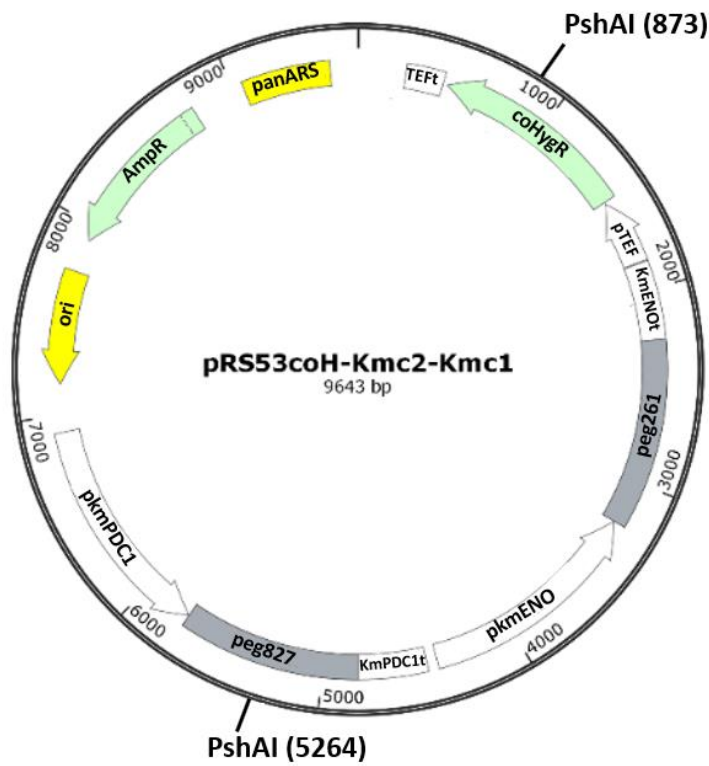
3.1. MATERJALI

3.1.1. Plazmidi

U ovom radu korišteno je 5 različitih plazmida koji sadrže bakterijsko ishodište replikacije *ori* i gen koji kodira za enzim β -laktamazu, gen *bla*, koji je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik ampicilin.

3.1.1.1. Plazmidi *pRS53coH-Kmc2-Kmc1* i *pRS53coH-KmPDC1-KlalsD-KmTEF1-KlalsS*

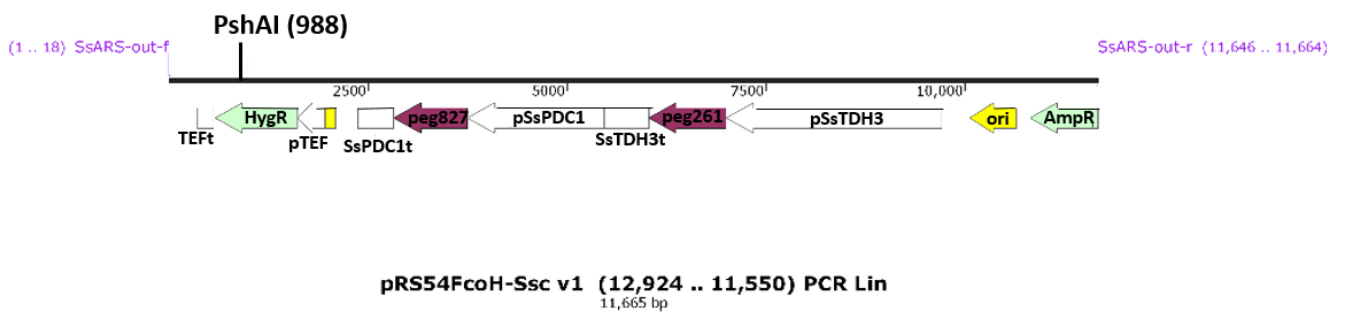
Na slici 8 prikazani su replikativni plazmidi *pRS53coH-Kmc2-Kmc1* i *pRS53coH-KmPDC1-KlalsD-KmTEF1-KlalsS* koji su predhodno konstruirani u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović, usmeno priopćenje). Ovi replikativni plazmidi sadrže regiju *panARS* koja omogućuje replikaciju plazmida u stanicama kvasca *Kluyveromyces marxianus* i gen *coHygR* s optimiziranim sastavom kodona za primjenu u nekonvencionalnim kvascima koji je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik higromicin. Plazmid *pRS53coH-Kmc2-Kmc1* sadrži dva dodatna gena *peg827* i *peg261* čijom ekspresijom u stanicama transformanata *Kluyveromyces marxianus* omogućena je proizvodnja L-laktata. Plazmid *pRS53coH-KmPDC1-KlalsD-KmTEF1-KlalsS* sadrži dva gena *coKlalsDws* i *coKlalsSws* čijom ekspresijom je omogućena proizvodnja 2,3 – butanediola u stanicama transformanata *Kluyveromyces marxianus*.



Slika 8. Mapa replikativnih plazmida pRS53coH-Kmc2-Kmc1 i pRS53coH-KmPDC1-KlalsD-KmTEF1-KlalsS s prikazanim regijama i restrikcijskim mjestima bitnim za ovaj rad

3.1.1.2. Plazmid pRS54FcoH-Ssc v1 PCR Lin

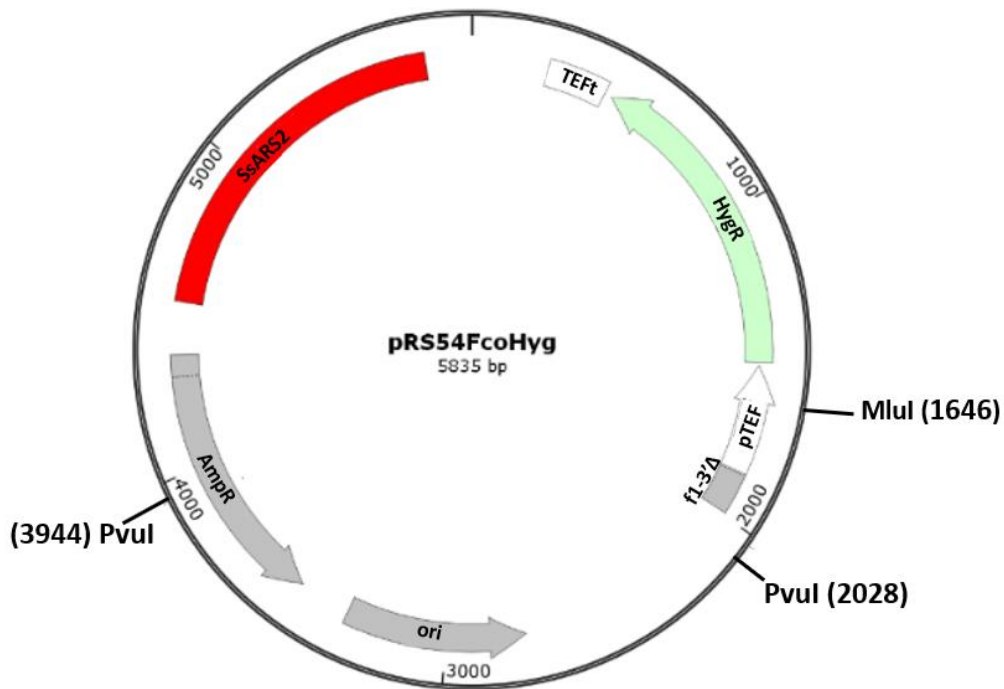
Integrativni plazmid pRS54FcoH-Ssc v1 PCR Lin konstruiran je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović, usmeno priopćenje). Ovaj plazmid sadrži kodon optimiziran gen *coHygR* koji omogućuje transformiranim stanicama kvasca rast na podlozi s antibiotikom higromicinom. Isto tako, sadrži dva gena *peg827i* *peg261* čijom ekspresijom omogućena je proizvodnja L-laktata u stanicama transformanata *S. stipitis*. Na slici 9 je plazmid prikazan u lineariziranom obliku u kojem je u ranijim istraživanjima korišten za transformaciju *S. stipitis*.



Slika 9. Mapa plazmida pRS54FcoH-Ssc v1 PCR Lin s prikazanim regijama i restriksijskim mjestima bitnim za ovaj rad

3.1.1.3. Plazmid pRS54FcoHyg

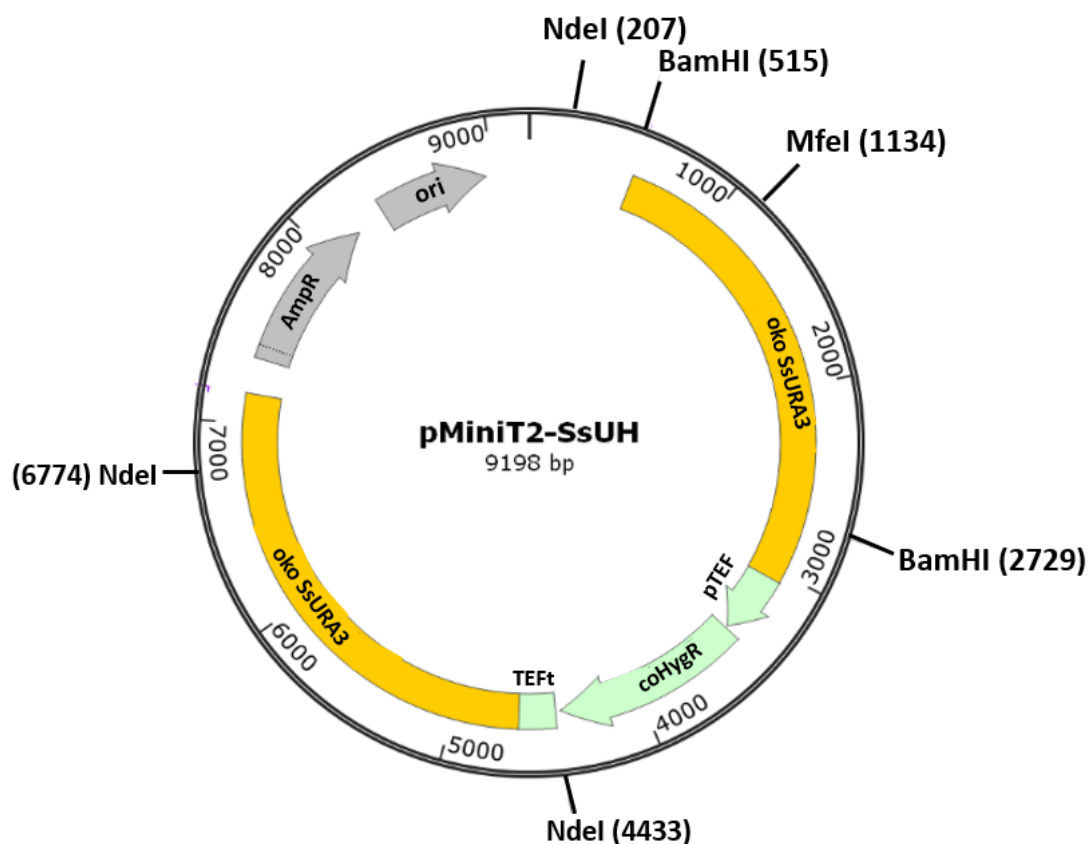
Na slici 10 prikazan je replikativni plazmid pRS54FcoHyg, koji je konstruiran u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović, usmeno priopćenje). Ovaj plazmid sadrži regiju *SsARS2*, koja omogućuje replikaciju plazmida u stanicama kvasca *Scheffersomyces stipitis* i kodon optimizirani gen *coHygR* koji je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik higromicin.



Slika 10. Mapa replikativnog plazmida pRS54FcoHyg s prikazanim regijama i restrikcijskim mjestima bitnim za ovaj rad

3.1.1.4. Plazmid pMiniT2-SsUH

Na slici 11 prikazan je integrativni plazmid pMiniT2-SsUH koji je konstruiran u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Žunar, usmeno priopćenje). Ovaj plazmid sadrži 2,5 kb uzvodno i nizvodno od otvorenog okvira čitanja *SsURA3* iz genoma kvasca *S. stipitis*, umnoženu lančanom reakcijom polimerazom. Otvoreni okvir čitanja gena *URA3* zamijenjen je kodon optimiziranom regijom *coHygR* koji je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik higromicin. Plazmid pMiniT2-SsUH koristi se kao kalup te korištenjem početnica *SsURA3-f* i *SsURA3-r* lančanom reakcijom polimerazom dobiva se fragment *SsUH* (6609 pb) koji se koristi za inaktivaciju gena *SsURA3* u genomu kvasca *S. stipitis*.



Slika 11. Mapa plazmida pMiniT2-SsUH s označenim regijama, restrikcijskim mjestima i početnicama bitnim za ovaj rad

3.1.1.4. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni za umnažanje fragmenta SsUH, iz plazmida pMiniT2-SsUH koji služi kao kalup za lančanu reakciju polimerazom, su: SsURA3-f (5'-CCACAGGTAAACAGCAAATG-3') i SsURA3-r (5'-CTGAGTTCTTATCTTTAGCTACAGAATT-3')

3.1.1.5. CRISPR/Cas9 ribonukleoproteinski kompleks (kompleks RNP)

Korišten je ribonukleoproteinski kompleks (RNP) koji je dio Alt-R CRISPR-Cas9 sustava od IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Io, SAD) te je sklopljen neposredno prije elektroporacije. Sustav se sastoji od 3 komponente: specifična crRNA, univerzalne tracrRNA i nukleaze Cas9. Sekvenca specifične crRNA korištene u ovom radu je: AltR1/rGrA rGrUrC rUrArC rArArG rArUrU rGrCrC rCrArA rGrUrU rUrUrArGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2. Komplementarnim

sparivanjem dijela regije crRNA i tracrRNA nastaje guide RNA (gRNA). Specifična crRNA komplementarno se sparuje s regijom otvorenog okvira čitanja, gena *SsURA3*.

3.1.2. Mikroorganizmi

3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje dvolančanih plazmida korišten je soj bakterije *E. coli* DH5 α genotipa

F'/endA1 hsdR17(rK-, mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NalR) relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR (ρ 80dlac Δ (lacZ)M15) (New England Biolabs, Ipswich, MA, SAD).

3.1.2.2. Kvasci

U ovom radu korišten je kvasac *Scheffersomyces stipitis* soj JCM 10742, te kvasac *Kluyveromyces marxianus* soj NBRC1777.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Hranjive podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 minuta pri 121 °C ili su pripremljene korištenjem sterilnih otopina i sterilne demineralizirane vode.

3.1.3.1. Podloga za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Za uzgoj bakterije *Escherichia coli* korištena je tekuća hranjiva podloga LB:

Bakto tripton	10,0 g
Kvašćev ekstrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Destilirana voda	do 1000,0 mL

Kruta LB podloga priprema se jednako kao i tekuća uz dodatak 15 g L⁻¹ agara prije autoklaviranja.

Podloga s ampicilinom za selekciju transformanata priprema se dodatkom, u sterilnim uvjetima, 2,5 mL L⁻¹ matične otopine antibiotika ampicilina (20 mg mL⁻¹) za krute podloge i 5 mL L⁻¹ za tekuće podloge nakon sterilizacije i hlađenja.

3.1.3.2. Podloga za uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus*

Za uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus* korištena je kompleksna (kompletna) podloga YPD:

Bacto pepton	20,0 g
Yeast extract	10,0 g
Glukoza	20,0 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Za pripremu krute podloge dodaje se 20 g L⁻¹ agara u tekući YPD prije autoklaviranja.

Kompleksna hranjiva podloga YPD s antibiotikom higromicinom za selekciju transformiranih stanica kvasaca priprema se dodatkom 900 µL L⁻¹ osnovne otopine antibiotika (BP2952-1MU, Fisher BioReagents), čija koncentracija iznosi 0,5 MU mL⁻¹, nakon sterilizacije i hlađenja podloge.

3.1.3.3. Regeneracijski agar

Za uzgoj kvasaca *Scheffersomyces stipitis* nakon transformacije kvašćevih stanica protoplastoranjem korišten je regeneracijski agar:

Yeast nitrogen base w/o AA/ammonium sulphate	0,67 g
amonij sulfat	2,0 g
glukoza	8,0 g
sorbitol	72,8 g
smjesa aminokiselina (drop out)	0,52 g
destilirana voda	do 400 mL

Za pripremu krute podloge dodaje se 10 g agara u tekući regeneracijski agar prije autoklaviranja.

Smjesa aminokiselina (drop out) dodana u regeneracijski agar ne sadrži uracil pa se u predhodno autoklaviran i ohlađen regeneracijski agar dodaje 8,3 mL L⁻¹ uracila.

Regeneracijski agar s antibiotikom higromicinom za selekciju transformiranih stanica kvasaca *Scheffersomyces stipitis* priprema se dodatkom 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ osnovne otopine antibiotika (BP2952-1MU, Fisher BioReagents), čija koncentracija iznosi 0,5 MU mL^{-1} , nakon sterilizacije i hlađenja podloge.

3.1.3.4. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8 M)

Otopina se priprema otapanjem 61,66 g amonijevog acetata u 100 mL destilirane vode.

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Ampicilin (20 mg mL^{-1})

Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C

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

18,61 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ otopi se u 80 mL destilirane vode, pH se podesi dodatkom NaOH (približno 2 g peleta) i dopuni se destiliranom vodom do 100 mL.

Fenol

Redestilirani fenol otapa se pri 67 °C i zasićen je jednakim volumenom TE pufera. Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci na 4 °C.

Glukoza (40 g L^{-1})

Otopina se sterilizira na 0,5 bara nadtlaka.

GTE-pufer

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

priprema se iz sterilnih otopina neposredno prije upotrebe.

Kalijev acetat (3 M; pH 4,8)

Otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat. Pripravljaju se tako da se u 60 mL 3 M otopine kalij acetata doda 11,5 mL ledene octene kiseline i 28,5 mL destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Kloroform/izoamilni alkohol

Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Ne sterilizira se i čuva se pri 4 °C.

Natrijev acetat (3 M; pH 4,8)

24,6 g bezvodnog natrijevog acetata otopi se u destiliranoj vodi, pH se podesi ledenom octenom kiselinom i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

NaOH/SDS

Natrijev hidroksid	0,2 mol L ⁻¹
SDS	10,0 g L ⁻¹

Ne sterilizira se i priprema se neposredno prije upotrebe.

RNaza (10 mg mL⁻¹)

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

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

Tris-Cl (1 M; pH 8,0 ili 7,4)	10 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	2 mL
sterilna destilirana voda	do 1000 mL

Priprema se iz sterilnih otopina.

Tris-HCl (1 M)

12,1 g Tris otopi se u 80 mL destilirane vode. Vrijednost pH se do željene vrijednosti podesi dodatkom koncentrirane klorovodične kiseline, nakon čega se volumen otopine dopuni do

100 mL. Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti su: pH 7,4 ~ 7,0 mL; pH 7,6 ~ 6,0; pH 8,0 ~ 4,2.

SCE

sorbitol	182,71 g
natrijev citrat dihidrat	33,50 g
EDTA dinatrijeva sol	45,00 g
sterilna destilirana voda	do 1000 mL

Otopina se ne sterilizira.

Sorbitol (1 M)

18,2 g sorbitola otopi se u 50 mL destilirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira autoklaviranjem i čuva se pri sobnoj temperaturi.

STE

SDS	5,0 g
Tris-Cl (1 M; pH 8,0)	100 mL
EDTA (0,05 M; pH 8,0)	100 mL
sterilna destilirana voda	do 1000 mL

Otopina se ne sterilizira.

Zimoliaza 20-T

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

3.1.3.5. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica

DTT/litij acetat

U sterilnim uvjetima doda se 3,5 mL 1 M DTT, 10 mL predhodno pripremljenog 1 M litij acetata i nadopuni se sterilnom destiliranom vodom do 100 mL.

Higromicin B – otopina, izoliran iz *Streptomyces hygroscopicus*, Sigma-Aldrich, 394 mg/ml

Litij acetat (1 M)

10,2 g litij acetata dihidrata otopi se u 70 mL destilirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri sobnoj temperaturi.

PEG

PEG ₆₀₀₀	4 g
kalcijev klorid (1 M)	0,2 mL
Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	0,2 mL
destilirana voda dodajemo)	do 20 mL (ne

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri sobnoj temperaturi.

SDS (10 g L⁻¹) Priprema se otapanjem u vodi i sterilizira autoklaviranjem.

Sorbitol (1 M)

18,2 g sorbitola otopi se u 50 mL destilirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira autoklaviranjem i čuva se pri sobnoj temperaturi.

TPC

sorbitol (1 M)	98 mL
kalcijev klorid (1 M)	1 mL
Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	1 mL

Ne sterilizira se i priprema se neposredno prije upotrebe.

3.1.3.6. Otopine za gel elektroforezu

Agarozni gel:

Agarozni gel se priprema otapanjem agaroze u TBE puferu (1,0 x), koji se priprema razrjeđivanjem 10 x TBE pufera. Koncentracija agaroze u gelu ovisi o veličini fragmenata DNA koje želimo razdvojiti na gelu a može biti od 7 do 20 g L⁻¹.

Boja za nanošenje uzorka (6 x)

Bromfenol plavo	0,03 %
Ksilen cijanol FF	0,03 %

Glicerol	60 %
SDS	1 %
100 mmol L ⁻¹ EDTA pH 8,0	

Otopina se čuva pri 4 °C.

Etidij – bromid

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

TBE pufer (10 x)

Tris	108,0 g L ⁻¹
borna kiselina	55,0 g L ⁻¹
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40,0 g L ⁻¹
destilirana voda	do 1000 mL

Pufer za gel – elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku i naknadno se razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Ne sterilizira se.

3.1.3.7. Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

Amonijev acetat (1 M)

Priprema se razrjeđivanjem 8 mol L⁻¹ amonijeva acetata.

HCl (0,25 M)

Priprema se razrjeđivanjem koncentrirane klorovodične kiseline (22 mL L⁻¹).

Natrijev hidroksid (0,4 M)

18,2 g natrij hidroksida otopi se u destiliranoj vodi i dopuni se do 100 mL.

Natrij hidroksid/amonijev acetat

natrijev hidroksid (0,5 M)

amonijev acetat (1,0 M)

Otopina A

SSC (20 x)	10,0 mL
SDS (100 g L ⁻¹)	1,0 mL
destilirana voda	89,0 mL

Otopina B

SSC (20 x)	0,5 mL
10 % SDS	1,0 mL
destilirana voda	98,5 mL

Otopina za predhibridizaciju – za 100 mL otopine

SSC (20 x)	25,0 mL
smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija („blocking reagent“)	1,0 g
natrijeva sol N-lauroil sarkozina (100 g L ⁻¹)	1,0 mL
SDS (100 g L ⁻¹)	200 µL

Otopina za hibridizaciju

Isti sastav kao i otopina za predhibridizaciju samo što sadrži 20-50 ng mL⁻¹ obilježene DNA (DNA-probe).

Pufer 1

Tris-HCl (0,1 M; pH 7,5)

natrijev klorid (0,15 M)

Pufer 2

Priprema se otapanjem smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija („blocking reagent“) u puferu 1 do 10 g L⁻¹.

Pufer 3

Tris (1 M; pH 9,7)	50,0 mL
natrijev klorid (5 M)	10,0 mL
magnezijev klorid (1 M)	25,0 mL

pH se podesi na vrijednost 9,5 dodatkom HCl i dopuni se destiliranom vodom do 500 mL.

Otopina za detekciju

Pufer 3	10 mL
x-fosfat	35 µL
NBT	45 µL

SSC (20 x)

natrijev klorid	175,35 g
natrijev citrat dihidrat	88,20 g
sterilna destilirana voda	do 1000 mL

3.1.4. Kemikalije, enzimi i membrane

Kemikalije, enzimi i membrane	Proizvođač
Agaroz	<i>Appligene</i> , Illkirch, Francuska
Apsolutni etanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Bromtimol plavo (BTP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
EDTA	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA, te odgovarajući puferi	<i>New Engand Biolabs</i> , Ipswich, MA, SAD <i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Etidij bromid	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Izopropanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Kemikalije za pripremu podloga	<i>Difco</i> , Detroit, SAD <i>Merck</i> , Darmstadt, Njemačka
Kemikalije za pripremu ostalih otopina	<i>Fluka</i> , Buchs, Švicarska <i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska <i>Alkaloid</i> , Skoplje, Makedonija

Membrane (najlonske, pozitivno nabijene) i komplet kemikalija za hibridizaciju DNA po Southern-u	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Natrijev acetat	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
PEG	<i>Fluka</i> , Buchs, Švicarska
Ribonukleaza A	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
Sorbitol	<i>Barr</i> , Zagreb, Hrvatska
Tris	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
Zimoliza (Zymolyaze 20-T)	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo, Japan
Zimoliza (zymolyaze 5-100)	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture

4 mL prekonoćne bakterijske kulture *Escherichia coli* centrifugira se 2 minute na 10 000 okretaja po minuti pri sobnoj temperaturi. Supernatant se odlije, a talog se osuši vakuum sisaljkom. Osušeni talog resuspendira se u 100 μ L GTE pufera i inkubira se 5 minuta na ledu. Nakon inkubacije, suspenziji se dodaje 200 μ L otopine natrij hidroksid/ SDS, otopina se promiješa okretanjem i ponovo se inkubira 5 minuta na ledu. Potom se dodaje 150 μ L kalij acetata (5 M; pH 4,8), otopina se promiješa blagim okretanjem i inkubira se 5 minuta na ledu. Nakon inkubacije slijedi centrifugiranje suspenzije 15 minuta na 11000 okretaja po minuti pri 4 °C. 450 μ L supernatanta prebaci se u čistu epicu te slijedi fenolizacija (poglavlje 3.2.5.) i taloženje amonij acetatom i etanolom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. Talog se otopi u 10 – 20 μ L TE puferu u koji je dodano 1 μ L RNaze te slijedi inkubacija 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C uz povremeno okretanje.

3.2.2. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture

Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena provedena je postupkom alkalne lize uz manje promjene. 500 mL prekonoćne kulture *Escherichia coli* centrifugira se 10 minuta na 5000 okretaja po minuti pri 4 °C kako bi se stanice istaložile. Supernatant se odlije, a talog se resuspendira u 5 mL GTE pufera i ostavi se 5 minuta na ledu. Lizozim se dodaje sterilnim nastavkom te se

suspenzija pomiješa laganim okretanjem i inkubira se 10 minuta na ledu. Nakon toga, se dodaje 10 mL otopine natrijev hidroksid/SDS, otopina se promiješa blagim okretanjem te se ponovo inkubira 10 minuta na ledu. Nakon inkubacije, dodaje se 7,5 mL natrijeva acetata (3 M; pH 4,8), smjesa se promiješa laganim okretanjem te se inkubira 15 minuta pri -20 °C. Sljedeći korak je centrifugiranje suspenzije 30 minuta na 6000 okretaja po minuti pri 5 °C. Dobiveni supernatant prebaci se u čistu kivetu i ponovo slijedi centrifugiranje pri istim uvjetima (30 minuta; 6000 okretaja po minuti; 5 °C). Dobiveni supernatant prebaci se u novu kivetu, odredi mu se volumen te se dodaje 0,6 V izopropanola te se otopina inkubira 15 minuta pri sobnoj temperaturi kako bi došlo do taloženja DNA. Potom slijedi centrifugiranje suspenzije 15 minuta na 6000 okretaja po minuti pri sobnoj temperaturi, supernatant se baca, a talog se osuši vakuum sisaljkom. Osušeni talog se otapa u 500 mL TE pufera te slijedi fenolizacija (poglavlje 3.2.5.). Plazmidna DNA taložena je amonij acetatom i etanolom (postupak opisan u poglavlju 3.2.4.) i otopljen je u 10 – 20 µL TE pufera uz dodatak RNaze. Gel elektroforezom provjerava se uspješnost izolacije plazmidne DNA.

3.2.3. Izolacija genomske DNA iz kvasca

4 mL kulture kvasaca uzgoji se do stacionarne faze te se centrifugira 3 minute na 4000 okretaja po minuti pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog resuspendira se u 1 mL destilirane vode i ponovo slijedi centrifugiranje pri istim uvjetima (5 minuta; 4000 okretaja po minuti; sobna temperatura). Talog stanica resuspendira se u 1 mL otopine SCE, ponavlja se centrifugiranje pri istim uvjetima te se dobiveni talog resuspendira u 130 µL otopine SCE (ukupni volumen 200 µL). Suspenziji se doda 20 µL enzima zimolijaze 20-T te slijedi inkubacija u vodenoj kupelji 1 h pri 37 °C. Potom se dodaje 800 µL otopine STE i slijedi inkubacija 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C. Nakon inkubacije, uzorci se hlade na ledu 10 minuta te se doda 200 µL kalijevog acetata (5 M; pH 4,8) kako bi se proteini istaložili. Ovako pripremljeni uzorci ostave se na ledu u hladnjaku najmanje 2 sata ili preko noći. Nakon inkubacije, slijedi centrifugiranje 30 minuta na 10000 okretaja po minuti pri 4 °C. 970 µL supernatanta prebaci se u novu kivetu i doda se 630 µL izopropanola te se otopina promiješa laganim okretanjem. Slijedi centrifugiranje 20 minuta na 10000 okretaja po minuti pri 4 °C. Supernatant se baca, a dobiveni talog se osuši vakuum sisaljkom i otopi se u 300 µL TE pufera. Potom se suspenzija inkubira 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C te se taloži amonij acetatom i etanolom kao što je opisano u poglavlju 3.2.4. Nakon taloženja uzorci se čuvaju 2 h pri -20 °C te se centrifugiraju 20 minuta na 11000 okretaja po minuti pri 4 °C. Dobiveni talog se otopi u 50 µL TE pufera i doda se 0.5 µL RNaze kako bi se razgradila prisutna RNA.

3.2.4. Taloženje DNA amonij acetatom i etanolom

Najčešće korišteni postupak taloženja DNA je taloženje pomoću amonij acetata i etanola. Postupak se provodi tako da se volumenu DNA doda 1/3 volumena amonijeva acetata (8 M) i 8/3 volumena 96 % etanola. Ovako pripremljena smjesa se potom najmanje inkubira 2 sata pri -20 °C nakon čega se centrifugira 20 minuta na 11000 okretaja po minuti pri 4 °C. Supernatant se baca, a talog se osuši vakuum sisaljkom i potom na zraku uz plamenik. Osušeni talog otopi se u 50 µL destilirane vode ili TE pufera.

3.2.5. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol

Otopinini DNA doda se jednak volumen smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol omjera 25:24:1 te se snažno promiješa i centrifugira 2 minute na 11000 okretaja po minuti. Nakon centrifugiranja dolazi do odvajanja faza te se gornja faza prenese u novu kivetu. Ovaj korak se ponavlja sve dok je vidljiv proteinski talog između dvije faze nakon centrifugiranja. Kada je sav proteinski talog uklonjen, gornja faza se prenese u novu kivetu i dodaje jednak volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol kako bi se uklonio zaostali fenol. Smjesa se snažno promiješa te se centrifugira 2 minute na 11000 okretaja po minuti te se nakon centrifugiranja gornja faza prenese u novu kivetu.

3.2.6. Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela

Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela provedena je prema uputama proizvođača (*New England Biolabs, SAD*) komercijalnog seta kemikalija Monarch DNA Gel Extraction Kit. Iz gela se izreže dio agaroznog gela koji sadrži željeni fragment DNA te se otopi u 4 volumena pufera za otapanje gela i inkubira se u vodenoj kupelji pri 50 °C uz povremeno okretanje dok se gel potpuno ne otopi. Uzorak se nanese na kolonu i centrifugira se 1 minutu na 16000 okretaja po minuti. Dio koji je prošao kroz kolonu se baca, a na kolonu se doda 200 µL pufera za ispiranje DNA te se centrifugira 1 minutu na 16000 okretaja po minuti (ovaj korak se ponavlja dva puta). Na matriks kolone dodaje se minimalno 6 µL pufera za eluciju DNA te se centrifugira pri istim uvjetima (1 minuta; 16000 okretaja po minuti) čime se DNA eluira s kolone.

3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima provedeno je prema uputama proizvođača restrikcijskih i modifikacijskih enzima (New England Biolabs Ipswich, MA, SAD; Roche Applied Science Indianapolis, IN, SAD).

3.2.8. Priprema crRNA/tracrRNA/Cas9 ribonukleoproteinskog kompleksa (RNP)

U ovom radu korišteni su ribonukleoproteinski (RNP) kompleksi koji su dio Alt-R CRISPR-Cas9 sustava od proizvođača IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Io, SAD). Ribonukleoproteinski kompleksi pripremljeni su prema uputama IDT (Integrated DNA Technologies, Inc) koji su modificirani prema protokolima za rad sa stanicama kvasaca opisanim u Varela i sur. (2020) i Grahl i sur. (2017), a sklopljeni su neposredno prije elektroporacije. Specifična crRNA i univerzalna tracrRNA otopljene su u puferu IDT duplex do konačne koncentracije 100 μM te su čuvane pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Guide RNA (gRNA) priprema se korištenjem ekvimolarne koncentracije crRNA i tracrRNA razrijeđene u puferu IDT duplex do konačne koncentracije 4 μM (po uzorku za transformaciju dodaje se 3,6 μL). Potom slijedi inkubacija 5 minuta pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ te se nakon inkubacije ostavlja na sobnoj temperaturi kako bi došlo do komplementarnog sparivanja crRNA i tracrRNA, odnosno formiranja guide RNA (gRNA). Neposredno prije uporabe, Cas9 nukleaza (60 μM) razrijeđena je u destiliranoj vodi do konačne koncentracije od 4 μM (po uzorku se koristi 3 μL). U slijedećem koraku se prethodno pripremljena gRNA pomiješa s razrijeđenom nukleazom Cas9 u omjeru 1,2:1 (3,6 μL gRNA i 3 μL nukleaze Cas9) te se inkubira na sobnoj temperaturi minimalno 5 minuta. Za transformaciju koristi se 6,6 μL pripremljenog kompleksa RNP po uzorku.

3.2.9. Transformacija kvasca elektroporacijom

Za transformaciju stanica kvasaca elektroporacijom korišten je protokol za transformaciju kvasaca *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Kolonija kvasaca *Scheffersomyces stipitis* porasla na krutoj hranjivoj podlozi, prenese se u 200 mL kompletne kompleksne tekuće YPD podloge i inkubira se na tresilici pri $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ do koncentracije stanica 7×10^7 st mL^{-1} . Suspenzija stanica centrifugira se 4 minuta na 4000 okretaja po minuti pri sobnoj temperaturi. Supernatant se baca, a talog se resuspendira u sterilnom deioniziranoj vodi nakon čega slijedi centrifugiranje pri istim uvjetima (ovaj korak se ponavlja dva puta). Potom se talog stanica resuspendira u 35 mL

sviježe pripremljene otopine DTT/LiAc te slijedi inkubacija 45 minuta 28 °C na tresilici pri 80 okretaja po minuti. Nakon inkubacije, suspenzija stanica se centrifugira 4 minute na 4000 okretaja po minuti pri 4 °C, a dobiveni talog se resuspendira u hladnoj, sterilnoj, deioniziranoj vodi te se ponovi centrifugiranje pri istim uvjetima. Talog stanica se resuspendira u hladnom sorbitolu (1 M) te se ponovi centrifugiranje pri istim uvjetima (ovaj korak ponavlja se dva puta). Dobiveni talog resuspendira se u hladnom sorbitolu (1 M) tako da ukupan volumen bude 500-700 µL. 50 µL suspenzije stanica prenese se u kivete i doda se 0,5 µL DNA za transformaciju te se uzorak inkubira 5 minuta u ledu. Uzorak se prenese u predhodno ohlađene kivete za elektroporaciju, sve zajedno se stavi u elektroporator i podvrgne pulsu električne struje (parametri elektroporacije 2 kV; 5 ms). Stanicama je potrebno što u kraćem roku dodati 1mL smjese YPD/sorbitol te se uzorci ostave na sobnoj temperaturi 20 minuta. Potom se doda još 1 mL YPD tekuće hranjive podloge nakon čega slijedi inkubacija minimalno 3 sata pri 28 °C na tresilici pri 180 okretaja po minuti. Nakon inkubacije stanice se centrifugiraju, talog se resuspendira u sterilnoj deioniziranoj vodi te se stanice nacjepljuju na selektivne podloge i inkubiraju 2 dana pri 28 °C.

3.2.10. Transformacija kvasaca protoplastiranjem

Transformacija kvasca *Scheffersomyces stipitis* provedena je prema protokolu za protoplastiranje kvasca *S. Cerevisiae* BY 4742 uz manje izmjene (Svetec i sur., 2007). Kolonija kvasaca *Scheffersomyces stipitis* porasla na krutoj hranjivoj podlozi nacjepljuje se u 400 mL kompletne kompleksne tekuće YPD podloge i inkubira se preko noći na tresilici pri 28 do 30 °C do koncentracije $1-2,5 \times 10^7$ st mL⁻¹. Suspenzija stanica se prebaci u kivete i centrifugira 5 minuta na 4000 okretaja po minuti. Supernatant se baca, a talog stanica se resuspendira u destiliranoj vodi te ponovno slijedi centrifugiranje 5 minuta na 4000 okretaja po minuti. Slijedi resuspendiranje taloga u sorbitolu i centrifugiranje 8 minuta na 4000 okretaja po minuti. Talog stanica se resuspendira u 25 mL sorbitola te se suspenzija prebaci u kivetu volumena 1,5 ml. U međuvremenu pripremi se 6 kiveta napunjenih s 500 µL 1 % SDS-a te se u prvu kivetu doda 100 µL suspenzije stanica koja se vorteksira. U kivetu sa stanicama dodaje se 200 do 250 µL zimolijaze 100T te se promiješa laganim okretanjem. Štopericom se mjeri vrijeme od trenutka dodavanja zimolijaze 100T te se svakih 3 do 5 minuta izuzima 100 µL uzorka i dodaje se u kivete s 1 % SDS-om. Protoplastiranje završava u trenutku kada se uzorak nakon dodatka u 1 % SDS raspukne, a otopina razbistri. Protoplastirane stanice se centrifugiraju 15 minuta na 2000 okretaja po minuti. Supernatant se baca, a talog stanica

se lagano resuspendira u sorbitolu te se ponovno centrifugiraju pri istim uvjetima. Talog se lagano resuspendira u 2 mL TPC-a te se suspenzija stanica prebaci u manju kivetu. Ponovo slijedi centrifugiranje 10 minuta pri 2000 okretaja po minuti. Talog stanica se resuspendira tako da konačna koncentracija bude 5×10^9 st mL^{-1} (koncentracija stanica potrebna za transformaciju). 100 μL suspenzije stanica se pomiješa s manje od 10 μL DNA te se inkubira 10 minuta. Po isteku vremena, u svaki uzorak se dodaje 1 mL PEG-a te slijedi inkubacija u trajanju od 20 minuta. Nakon inkubacije suspenzija stanica, DNA i PEG-a dodaje se u 75 mL regeneracijskog agra (poglavlje 3.1.3.3.) lagano se promiješa i izlije se u tri petrijevke. Stanice u petrijevkama inkubiraju se pri 28 °C 3 do 4 dana.

3.2.11. Gel elektroforeza

Agarozni gel (poglavlje 3.1.3.6.) otapa se i hladi na oko 60 °C te se izljevaju u nosač za gel na kojem je postavljen češalj za formiranje jažica. Nakon što se gel skrutne, češalj se izvadi i gel zajedno s nosačem za gel, postavlja se u kadicu za elektroforezu. Kadica za elektroforezu ispunjena je TBE puferom (1 x) na način da se iznad gela nalazi sloj pufera debljine 1 mm. Uzorci DNA za elektroforezu pripremaju se tako da se prvo pomiješaju s bojom za nanošenje uzoraka u omjeru 6:1 te se pipetom unesu u jažice gela. Elektroforeza se najčešće provodi pri naponu od 70 V u trajanju od 1 do 3 sata ovisno o koncentraciji agaroznog gela i veličini fragmenata DNA koji se razdvajaju. U ovom radu korišten je 0,8 % agarozni gel i TBE pufer (1 x). Nakon provedene elektroforeze, rezultat se mora vizualizirati namakanjem gela u otopini etidij-bromida 15 do 20 minuta te se gel izlaže ultraljubičastom (UV) svjetlu. Gel se fotografira kroz crveni filter.

3.2.12. Hibridizacija DNA po Southern-u

Hibridizacija DNA po Southern-u (eng. Southern Blotting) je metoda koja služi za detekcija specifičnih DNA fragmenata u uzorku. Cilj metode je specifično sparivanje neradioaktivno obilježene DNA-probe s komplementarnom sekvencom, a postupak uključuje gel elektroforezu, prijenos DNA s gela na membranu, hibridizaciju s probom i detekciju komplementarno sparene probe. DNA-proba sastoji se od molekule DNA koja sadrži dioksigeninom obilježen deoksiuridin-trifosfat (dUTP), a detekcija se ostvaruje aktivnošću alkalne fosfataze fuzionirane s dUTP-antitjelom.

Za provođenje metode hibridizacije DNA po Southern-u korišten je komplet kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA prema uputama proizvođača uz manje modifikacije (Gjuračić i Zgaga, 1996). Količine pufera za predhibridizacijsko ispiranje i vizualizaciju primjenjuju se za membrane površine 100 cm². Ispiranja se provode pri sobnoj temperaturi uz lagano protresanje, osim u slučaju ako u radu nije navedeno drugačije.

3.2.12.1. Priprema DNA probe

DNA probe korištene u ovom radu pripremljene su metodom nasumičnog započinjanja sinteze DNA (eng. random priming). DNA-proba za hibridizaciju uzoraka korištena je digoksigeninom obilježena proba *coHyg* koja hibridizira s genom *coHyg*, a obilježene DNA bakteriofaga λ i 1kb marker (NEB) korištene su kao standardi za određivanje veličine fragmenata.

3.2.12.2. Prijenos DNA na membranu

Prijenos DNA na membranu provodi se nakon provedbe gel elektroforeze i vizualizacije DNA na gelu. Prvo se gel inkubira 30 minuta u klorovodičnoj kiselini (0,25 M), nakon čega slijedi ispiranje gela u destiliranoj vodi i ponovo inkubacija gela 30 minuta u otopini natrijevog hidroksida (0,4 M) /amonijevog acetata (1 M) koja uzrokuje fragmentiranje DNA (depurinaciju) te se takva DNA lakše prenosi s gela na membranu. Postupak prijenosa DNA na membranu traje 90 minuta uz podtlak 15 kPa, a provodi se u uređaju za prijenos vakuumom (Pharmacia Biotech). Tijekom prijenosa gel je stavljen na membranu i uronjen u otopinu natrijeva hidroksida (0,4 M). Fragmenti DNA ostaju fiksirani na membrani na poziciji koja odgovara poziciji na gelu zahvaljujući pozitivnom naboju najlonske membrane. Po završetku prijenosa, membrana se ispiru u amonijevu acetatu (1 M) te se 20 minuta inkubira pri 120 °C kako bi se DNA dodatno fiksirala.

3.2.12.3. Predhibridizacija i hibridizacija

Predhibridizacija provodi se u zataljenoj plastičnoj vrećici koja sadrži 0,5 mL otopine za predhibridizaciju po 1 cm² membrane, a inkubacija traje 2-3 sata pri 70 °C uz lagano protresanje. Predhibridizacijska otopina zasićuje membranu i spriječava nespecifično vezanje probe na membranu. Nakon predhibridizacije slijedi hibridizacija pri čemu se otopina za predhibridizaciju zamjeni s oko 5-10 puta manjim volumenom otopine za hibridizaciju te inkubacijom membrane u otopini za hibridizaciju preko noći (18 h) u istim uvjetima kao i predhibridizacija. Otopina za

hibridizaciju sadrži iste komponente kao i hibridizacijska otopina uz dodatak DNA-probe sa dioksigeninom obilježenim deoksiuridintrifosfatom (DIG-dUTP).

3.2.12.4. Posthibridizacijsko ispiranje

Nakon završenog postupka hibridizacije, membrana se ispiru dva puta s 50 mL otopine A pri sobnoj temperaturi po 5 minuta. Zatim se ispiru dva puta s 25 mL otopine B pri temperaturi od 70 °C po 20 do 30 minuta.

3.2.12.5. Detekcija

Zadnji korak je detekcija u kojem se na DNA-probu veže antitijelo antiDIG-fosfataza te dodatkom supstrata 5-bromo-4-kloro-3'-indoil fosfat i indikatora (NBT) dolazi do reakcije i razvija se ljubičasto obojenje. Da bi došlo do željene reakcije i u konačnici i detekcije željenih DNA fragmenata na membrani, membrana se prvo kratko ispiru u 100 mL pufera 1. Nakon toga slijedi ispiranje 1 h u 100 mL pufera 2 te 30 minuta u puferu 2 koji sadrži 3 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze. Potom se membrana ispiru dva puta po 15 minuta u 100 mL pufera 1 te se kratko ispiru u puferu 3. Po završetku ispiranja, membrana se zatvara u plastičnu vrećicu s otopinom za detekciju koja sadrži 10 mL pufera 3 uz dodatak 35 µL x-fosfata (5-bromo-4-kloro-indolil-fosfat) i 45 µL NBT-a (nitrozo-plavi-tetrazolij) te slijedi inkubacija u mraku pri 37 °C do pojave tamno obojenih vrpca (20 minuta do 24 sata). Detekcija završava ispiranjem membrane destiliranom vodom i sušenjem membrane na zraku.

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

Lančana reakcija polimerazom koristi se za umnažanje disrupcijske kazete SsUH pri čemu se linearizira plazmid pMiniT2-SsUH koji se koristi kao kalup, Metoda lančane reakcije provodi se pomoću Q5 polimeraze i početnica SsURA3-f i SsURA3-r te se reakcijska smjesa pripremi prema uputama proizvođača (*New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA*). Uvjeti pri kojima se provodi PCR navedeni su u tablici X. Nakon provedbe lančane reakcije polimerazom utvrđuje se uspješnost reakcije gel-elektroforezom, a za transformaciju kvasca fragment SsUH se izolira iz gela.

Tablica 1. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom

Korak	Temperatura	Trajanje	
Početna denaturacija kalupa i aktivacija polimeraze Q5	95 °C	30 sekundi	
Denturacija kalupa DNA	95 °C	10 sekundi	Ponovljeno 29 puta
Komplementarno sparivanje početnica s kalupom	63 °C	10 sekundi	
Sinteza DNA	72 °C	4 minute	
Završna sinteza	72 °C	5 minuta	
Hlađenje	22 °C	2 minute	

4. REZULTATI I RASPRAVA

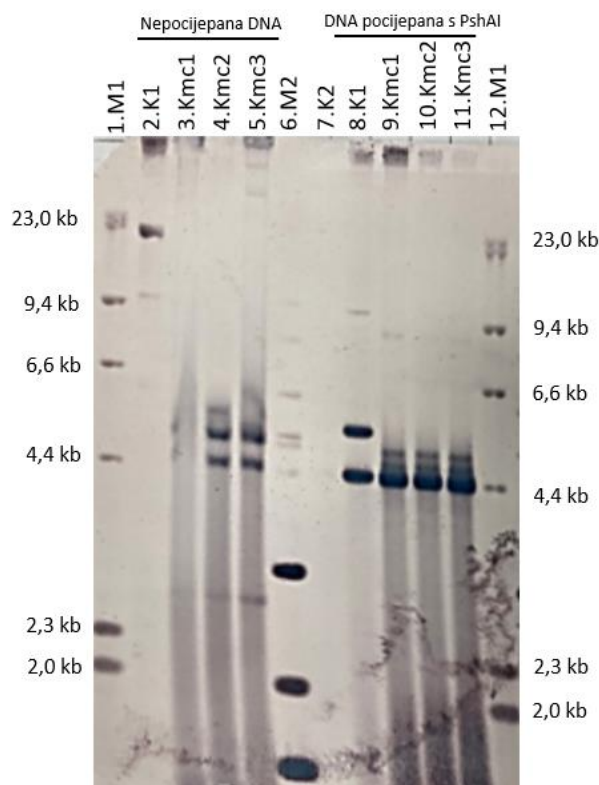
Cilj ovog rada bila je molekularna analiza sojeva nekonvencionalnih kvasaca *Kluyveromyces marxianus* i *Scheffersomyces stipitis* koji su konstruirani tijekom ranijih istraživanja u laboratoriju na način da su u njih uneseni odgovarajući geni kako bi se omogućila proizvodnja L-laktata i 2,3-butandiola (poglavlje 4.1.). Za sojeve koje je potrebno analizirati već je pokazano da su dobri producenti navedenih biokemikalija, a daljnja istraživanja u laboratoriju bila su usmjerena na dodatne modifikacije genoma koje bi mogle omogućiti povećanje prinosa željenih spojeva. To podrazumijeva i ciljanu inaktivaciju određenih gena, što je osobito izazovno u kvascu *Scheffersomyces stipitis*, obzirom na izrazito nisku učestalost homologne rekombinacije transformirajuće DNA s ciljnom regijom u genomu u ovom kvascu (manje od 1 %; Chen i sur, 2013.). Stoga je drugi cilj ovoga rada bio istražiti mogućnosti primjene sustava CRISPR/Cas9 u *S. stipitis* u svrhu inaktivacije ciljnih gena. Pri čemu je ribonukleoproteinski (RNP) kompleks crRNA/tracrRNA/Cas9 bio sastavljen *in vitro* i pokušano je njegovo unošenje transformacijom u stanice kvasca, a istražena je i mogućnost primjene različitih metoda transformacije kako bi se omogućio uspješan unos RNP kompleksa u stanice kvasca.

4.1. MOLEKULARNA ANALIZA SOJEVA KVASACA *S. stipitis* I *K. marxianus* METODOM HIBRIDIZACIJE DNA PO SOUTHERN-U

Kako bi se sojevi kvasaca *K. marxianus* (poglavlja 4.1.1. i 4.1.2.) i *S. stipitis* (poglavlje 4.1.3.) povrdgli molekularnoj analizi metodom hibridizacije DNA po Southernu, najprije je izolirana cjelokupna genomska DNA navedenih sojeva (kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.) koji proizvode L-laktat i 2,3-butandiol, te uz to i genomska DNA iz netransformiranih sojeva ovih kvasaca koji će poslužiti kao kontrole. Dodatno, iz bakterije *E. coli* izolirani su plazmidi (poglavlje 3.2.1.) koju su korišteni za transformaciju kvasaca *K. marxianus* i *S. stipitis* prilikom konstrukcije sojeva, a u ovom radu koristit će se kao kontrole, kako bi se mogla usporediti veličina vrpce vidljiva u izolatu plazmida iz *E. coli* u odnosu na onu koja se može detektirati u konstruiranim sojevima kvasaca. Nakon izolacije, DNA je pocijepana restriksijskom endonukleazom PshA1. Kao proba za hibridizaciju korištena je digoksigeninom obilježena regija *coHyg* (regija koja je komplementarna specifičnom DNA fragmentu u uzorku).

4.1.1. Molekularna analiza sojeva kvasca *K. marxianus* koji proizvode L-laktat

Kako bi se konstruirao soj kvasca *K. marxianus* koji proizvodi L-laktat, ovaj je kvasac transformiran plazmidom pRS53coH-Kmc2-Kmc1 (slika 8) koji je detaljno opisan u poglavlju 3.1.1.1. Ukratko radi se o replikativnom plazmidu koji nosi gene za dvije L-laktat dehidrogenaze. Za odabrane transformante KK1/1, KK1/3 i KK1/5 ranijim istraživanjima potvrđeno je da proizvode L-laktat. U ovom radu provedena je molekularna analiza hibridizacijom DNA po Southern-u kako bi se potvrdila prisutnost replikativnih plazmida u *K. marxianus* i analizirala njegova struktura. Provedena je hibridizacija DNA po Southernu s nepocijepanom genomskom DNA te DNA pocijepana enzimom PshAI, pri čemu je očekivana veličina vrpce pocijepanog plazmida 5,2 kb i 4,4 kb. Rezultat hibridizacije DNA po Southern-u prikazan je na slici 12.

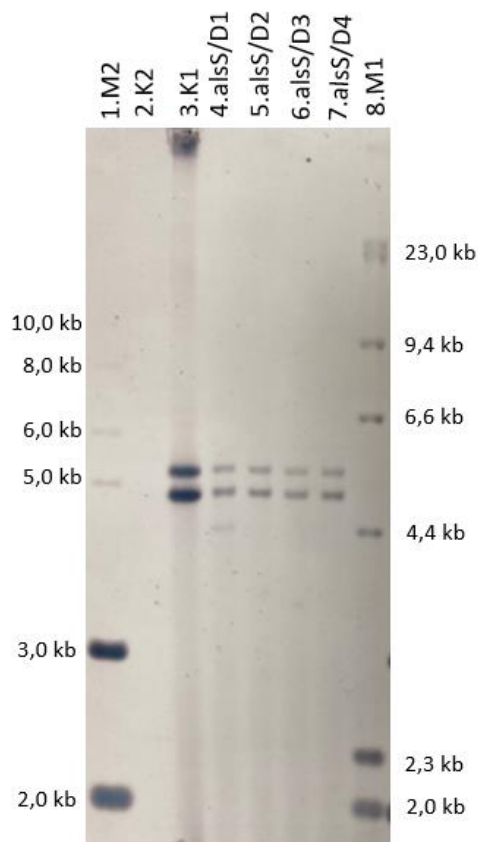


Slika 12. Rezultat hibridizacije pocijepane i nepocijepane DNA transformanata *K. marxianus* koji proizvode L-laktat metodom po Southernu. U jažicama 8, 9, 10 i 11 DNA je pocijepana s PshAI. M1 – standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana s HindIII); K1 - plazmid pRS53coH-Kmc2-Kmc1 izoliran iz bakterije *E.coli*; Kmc1-Kmc3 - DNA izolirana iz transformanata (KK1/1, KK1/3, KK1/5) koji sadrže plazmid pRS53coH-Kmc2-Kmc1; M2 – standard za gel-elektroforezu (1kb NEB); K2 – negativna kontrola (DNA netransformiranog soja *K.marxianus*). Kao sonda korištena je digoksinom obilježena regija *coHyg*

Rezultat hibridizacije DNA po Southern-u potvrdio je prisutnost strane DNA u transformantima *K. marxianus* koji proizvode L-laktat. U kontrolnom netransformiranom soju kvasca *K. marxianus* (kontrola K2 na slici 12) nije detektiran signal na membrani, dok je u uzorku u kojem je nanosena nepocijepana DNA transformanta detektiran signal čiji je broj i raspored vrpce tipičan za prisutnost kružnog plazmida u stanicama. Veličina vrpce kružnog plazmida izoliranog iz stanica kvasca različita je od veličine vrpce istog plazmida izoliranog iz *E. coli* (kontrola K1 na slici 12) što bi se moglo pripisati različitom stupnju superzavijenosti plazmida u stanicama kvasca i bakterije. Međutim, vidljivo je da veličina vrpce nakon cijepanja genomske DNA transformanta enzimom PshA1 nije u skladu s restriksijskom mapom plazmida. Naime, očekivana vrpca veličine 5,2 kb nije prisutna u DNA transformanta nego su prisutne dvije, nešto manje vrpce (manje od 5,2 kb, no veće od 4,4 kb). Vrpca veličine 4,4 kb jest vidljiva, ali je ona prisutna i u uzorcima nepocijepane DNA transformanta. Na temelju pojačanog intenziteta vrpce veličine 4,4 kb u pocijepanoj DNA transformanta, može se nagađati da je barem dio DNA unutar ove vrpce dobiven cijepanjem sa PshA1, ali obzirom da hibridizacija DNA po Southernu nije kvantitativna metoda, to se ne može sa sigurnošću tvrditi. Neovisno o tome, na temelju rezultata ove analize jasno je da struktura plazmida pRS53coH-Kmc2-Kmc1 u transformantima *K. marxianus* nije sukladna očekivanjima, tj. nije identična strukturi izvornog plazmida koji je korišten za transformaciju, te ju je potrebno rasvijetliti daljnjim istraživanjima. Međutim, važno je i primijetiti da je u sva tri nezavisna transformanta *K. marxianus* koji uspješno proizvode L-laktat struktura analiziranih plazmida međusobno identična. To ukazuje da slijed događaja koji dovodi do promijene strukture plazmida pRS53coH-Kmc2-Kmc1 nije nasumičan, a moguće uključuje i homolognu rekombinaciju s genomom kvasca, obzirom da dijelovi plazmida sadrže regije homologne regijama genoma kvasca (promotor i terminator gena PDC1, te promotor i terminator gena ENO1), kao što je vidljivo na slici 8.

4.1.2. Molekularna analiza sojeva kvasca *K. marxianus* koji proizvode 2,3-butandiol

Kako bi se konstruirali sojevi *K. marxianus* koji proizvode 2,3-butandiol kvasac je transformiran kružnim replikativnim plazmidom pRS53coH-KmPDC1-klalsD-KmTEF1-klalsS (slika 8). Dobiveni su transformirani sojevi (T5, T13, T15, T18) koji proizvode 2,3-butandiol i analizirani su hibridizacijom po Southern-u kako bi se potvrdila prisutnost replikativnog plazmida (slika 13).



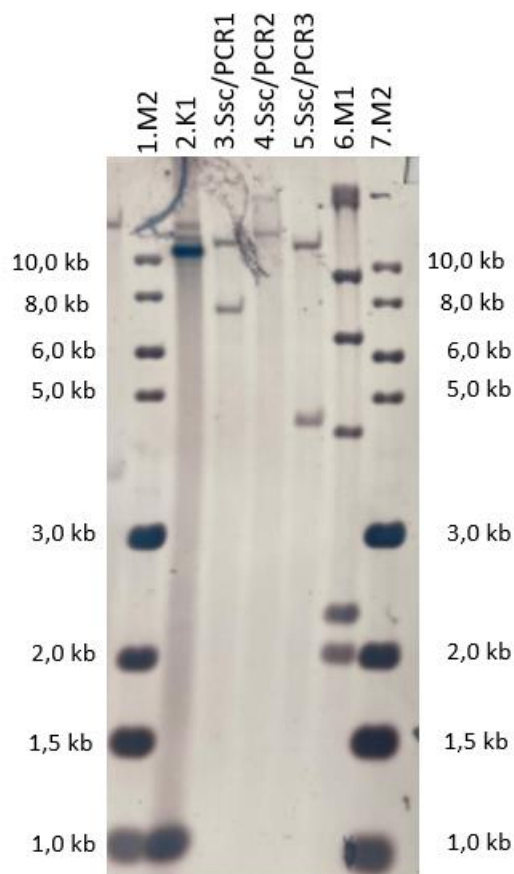
Slika 13. Rezultat hibridizacije DNA transformanata *K. marxianus* koji proizvode 2,3-butandiol pocijepane restrikcijskom endonukleazom PshAI metodom po Southernu. U jažicama 3, 4, 5, 6 i 7 DNA je pocijepana s PshAI. M2 – standard za gel-elektroforezu (1kb NEB); K2 – negativna kontrola (DNA netransformiranih soja *K.marxianus*); K1 - plazmid pRS53coH-KmPDC1-klalsD-KmTEF1-klalsS izoliran iz bakterije *E.coli*; alsS/D1-alsS/D4 - DNA izolirana iz transformanata (T5, T13, T15, T18) koji sadrže plazmid pRS53coH-KmPDC1-klalsD-KmTEF1-klalsS; M1 – standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana s HindIII). Kao sonda korištena je digoksigeninom obilježena regija *coHyg*

Rezultati hibridizacije po Southern-u plazmidne DNA pRS53coH-KmPDC1-klalsD-KmTEF1-klalsS izolirane iz *E.coli* i pocijepane enzimom PshA1 i genomskih DNA izoliranih iz transformanata (T5, T13, T15, T18) i pocijepanih enzimom PshA1 (slika 13) odgovaraju očekivanim veličinama od 5,2 kb i 4,9 kb što potvrđuje prisutnost, ali i očekivanu strukturu plazmida pRS53coH-KmPDC1-klalsD-KmTEF1-klalsS u sva četiri transformanta. Neobično je što se kod transformanta T5 koji se nalazi u jažici četiri hibridizira i dodatan fragment veličine 4,3 kb. Zbog toga je ovog transformanta potrebno dodatno analizirati.

4.1.3. Molekularna analiza sojeva kvasca *S. stipitis* koji proizvode L-laktat

Soj kvasca *Scheffersomyces stipitis* koji proizvodi L-laktat konstruiran je transformacijom s linearnim integrativnim plazmidom pRS54FcoH-Ssc koji je dobiven umnjažanjem pomoću PCR-a korištenjem početnica SsARS-out-f i SsARS-out-r (slika 9). Transformirajući fragment ne sadrži homologne krajeve, već se očekuje njegova ilegitimna integracija u genom kvasca. Dobiveni transformanti (T7, T8 i T9) uspješno proizvode L-laktat, te je njihova genomska DNA analizirana hibridizacijom po Southern-u kako bi se potvrdila prisutnost transformirajuće DNA. Pri tome je genomska DNA transformanata i kontrola (linearan plazmid pRS54FcoH-Ssc) pocijepana restriksijskim enzimom PshA1, a očekivane su dvije vrpce, pri čemu bi jedna trebala biti veća od 1 kb, a druga veća od 10,5 kb. Rezultati su prikazani na slici 14.

Rezultat hibridizacije po Southern-u potvrđuje prisutnost linearnog integrativnog plazmida pRS54FcoH-Ssc v1 PCR Lin u stanicama transformanata *S. stipitis* koji proizvode 2,3-butandiol. U skladu s očekivanjem u svakom od uzoraka u kojima je nanjena pocijepana genomska DNA transformanata vidljive su dvije vrpce, i to različitih veličina u svim transformantima što ukazuje na to da se linearni fragment pRS54FcoH-Ssc v1 PCR Lin ugradio nasumično u različite lokuse genoma ilegitimnom rekombinacijom.

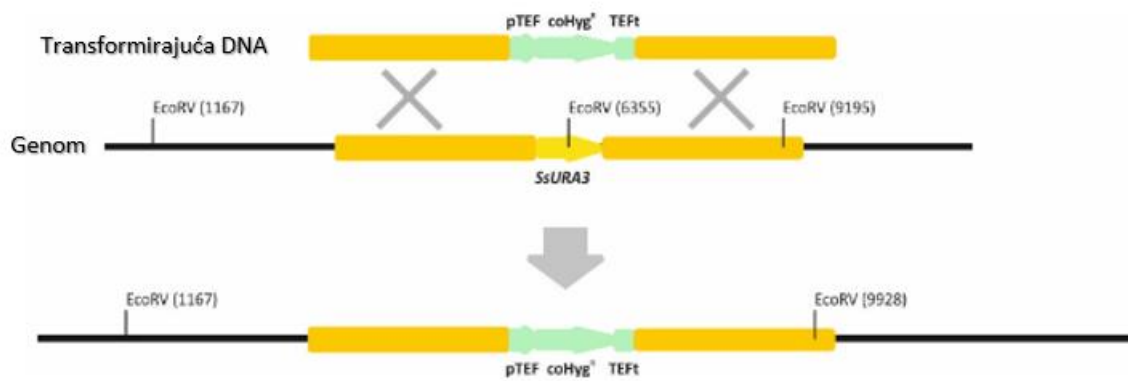


Slika 14. Rezultat hibridizacije DNA transformanata *S.stipitis* koji proizvode L-laktat pocijepane restrikcijom endonukleazom PshAI metodom po Southernu. U jažicama 2,3,4 i 5 DNA je pocijepana s PshAI. M2 – standard za gel-elektroforezu (1kb NEB); K1 - linearan plazmid pRS54FcoH-Ssc v1PCR Lin; Ssc/PCR1-Ssc/PCR3 – DNA izolirana iz transformanata (T7, T8 i T9) koji sadrže plazmid pRS54FcoH-Ssc v1PCR Lin; M1 – standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana s HindIII). Kao sonda korištena je digoksinom obilježena regija *coHyg*

U daljnjim istraživanjima u laboratoriju bit će potrebno inaktivirati pojedine gene u genomu kvasca *S. stipitis* kako bi se povećao prinos L-laktata. Obzirom da je učestalost homologne rekombinacije u ovom kvascu vrlo niska, potrebno je istražiti alternativne mogućnosti za preciznu modifikaciju genoma ovog kvasca.

4.2. MOGUĆNOSTI CILJANE INAKTIVACIJE GENA U KVASCU *S. stipitis* POMOĆU SUSTAVA CRISPR/Cas9

Sa ciljem istraživanja mogućnosti genskog ciljanja u kvascu *Scheffersomyces stipitis* u budućim istraživanjima, u ovom radu je istražena upotreba sustava CRISPR/Cas9 pri čemu je korištena specifična molekula crRNA koja se komplementarno sparuje sa sekvencom u otvorenom okviru čitanja gena *SsURA3*. Ova crRNA navodi RNP kompleks u komplementarnu regiju u genomu unutar koje Cas9 enzim uvodi dvolančani lom. Popravkom uvedenog loma prema homolognom kalupu koji uz to nosi selektivnim biljeg i koji se kotransformira u stanicu zajedno sa RNP kompleksom dolazi do inaktivacije gena *URA3* i ugradnje selektivnog biljega na ciljno mjesto. Kao disrupcijska kazeta korišten je fragment *SsUH* dobiven lančanom reakcijom polimerazom korištenjem početnica *SsURA3-f* i *SsURA3-r* s lineariziranim plazmidom pMiniT2-*SsUH*. Disrupcijska kazeta *SsUH* duljine je 6609 pb i sadrži regiju *coHygR* koja je omeđena s 2,5 kb dugačkim sekvencama uzvodno i nizvodno od otvorenog okvira čitanja. Pri uspješnom genskom ciljanju dolazi do zamjene otvorenog okvira čitanja gena *SsURA3* disrupcijskom kazetom *SsUH* i nastaju transformanti fenotipa $\text{Hyg}^R \text{Ura}^-$ kao što je prikazano na slici 15.

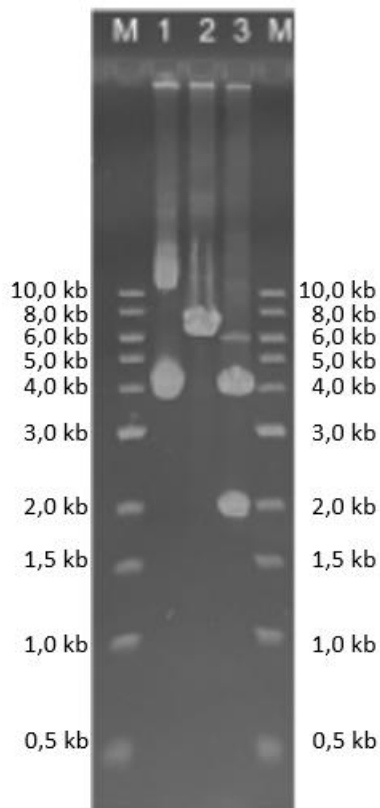


Slika 15. Shematski prikaz sustava za određivanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis*. Na slici je prikazana transformirajuća DNA, ciljna regija u genomu i rezultat uspješnog genskog ciljanja. Tamno žutom bojom prikazane su homologije duljine 2,5 kb koje rekombiniraju pri čemu dolazi do zamjene otvorenog okvira čitanja gena *SsURA3* genom *coHygR* (prema Čurković, 2021)

Sekvenca crRNA prethodno je odabrana koristeći program koji je integriran u IDT portal (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM) (Čurković, 2021). Specifična crRNA komplementarno se sparuje s univerzalnom tracrRNA i formira gRNA. U otopinu koja sadrži gRNA dodaje se razrijeđeni protein Cas9 i nastaje ribonukleoproteinski (RNP) kompleks. Nadalje, u ranijim istraživanjima provjerena je aktivnost kompleksa RNP *in vitro*, u vodi i puferu PBS, te je pokazano da RNP kompleks, koji sadrži gRNA, cijepa sekvencu *SsURA3* neovisno o mediju razrjeđivanja proteina Cas9 (Čurković, 2021). Međutim, u ranijim istraživanjima nije detektirana uspješna inaktivacija gena u *S. stipitis*, a jedan od mogućih razloga je korištenje prevelike koncentracije RNP kompleksa pri transformaciji, za što je pokazano kod nekih drugih organizama da može smanjiti uspješnost transformacije i učestalost željenog genetičkog događaja (Pohl i sur., 2021). Stoga je u ovom radu analiziran utjecaj smanjenja volumena kompleksa RNP na efikasnost transformacije u odnosu na IDT protokol koji je korišten u ranijim istraživanjima. Pri tome je kao disrupcijska kazeta pri transformaciji korišten fragment SsUH, koji nosi regije homologne genu *URA3* i selektivni biljeg koji omogućava rezistenciju na higromicin, a efikasnost transformacije je praćena transformacijom paralelnog uzorka s replikativnim plazmidom pRS54FcoHyg. U tu svrhu, najprije su izolirani plazmidi pRS54FcoHyg i pMiniT2-SsUH iz kojeg PCR-om umnožena disrupcijska kazeta SsUH (poglavlje 4.2.1.), a zatim je provedena elektroporacija (poglavlje 4.2.2.). Dodatno, provedeni su eksperimenti kojima je bio cilj optimizirati postupak protoplastiranja i transformacije protoplasta *S. stipitis* (poglavlje 4.2.3.).

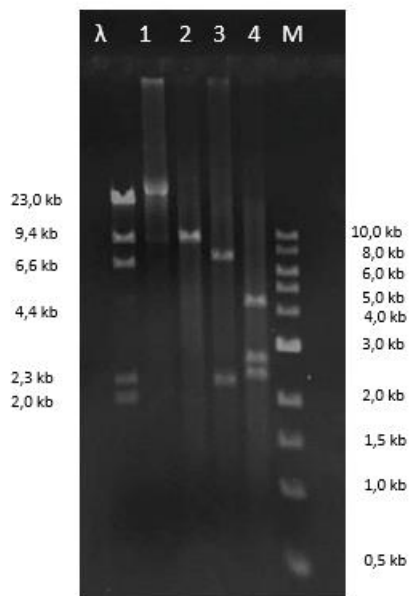
4.2.1. Izolacija i provjera strukture plazmida pRS54FcoHyg i pMiniT2-SsUH, te priprema disrupcijske kazete SsUH

Plazmidi pRS54FcoHyg i pMiniT2-SsUH prethodno su konstruirani i korišteni su za transformaciju u ovom radu. Navedeni plazmidi detaljno su opisani u poglavljima 3.1.1.3. i 3.1.1.4. te je njihova struktura potvrđena restrikcijском analizom (slika 16 i 17).



Slika 16. Rezultati restrikcijske analize plazmida pRS54FcoHyg. M – standard za gel-elektroforezu (1 kb NEB); 1 –kružni plazmid; 2 – plazmid pocijepan enzimom MluI; 3 – plazmid pocijepan enzimom PvuI

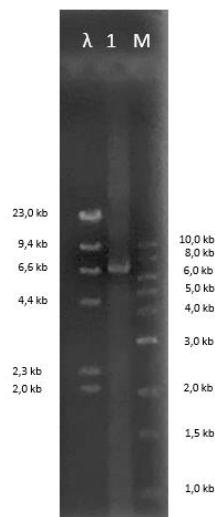
U uzorku jedan vidljive su dvije vrpce koje odgovaraju dvjema konformacijama nepocijepanog plazmida. Restrikcijska endonukleaza MluI cijepa plazmid na jednom mjestu pri čemu nastaje fragment veličine 5,8 kb koji je vidljiv u uzorku 2. U uzorku 3 nalazi se plazmid pocijepan endonukleazom PvuI, koja cijepa plazmid na dva mjesta te su na gelu vidljive dvije vrpce veličine 3,9 i 1,9 kb čime je potvrđena struktura plazmida pRS54FcoHyg.



Slika 17. Rezultati restrikcijske analize plazmida pMiniT2-SsUH. λ – standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana s HindIII); 1 – kružni plazmid pMiniT2-SsUH; 2 – plazmid pMiniT2-SsUH pocijepan enzimom MfeI; 3 – plazmid pMiniT2-SsUH pocijepan enzimom BamHI; 4 – plazmid pMiniT2-SsUH pocijepan enzimom NdeI; M – standard za gel-elektroforezu (1 kb NEB)

Restrikcijski enzim MfeI cijepa plazmid pMiniT2-SsUH na jednom mjestu te je na gelu vidljiva jedna vrpca veličine 9,2 kb. U jažici 3 plazmid je pocijepan restrikcijskom endonukleazom BamHI koja cijepa plazmid na dva mjesta čime nastaju fragmenti veličine 2,2 i 7,0 kb, a cijepanjem enzimom NdeI u jažici 4 nastaju tri fragmenta veličine 2,3; 2,6 i 4,2 kb čime je potvrđena struktura plazmida pMiniT2-SsUH.

Nakon što je disruptivna kazeta SsUH umnožena lančanom reakcijom polimerazom, potvrđena je uspješnost njenog umnažanja gel elektroforezom (slika 18) koji je dodatno pročišćen izolacijom iz agaroznog gela (poglavlje 3.2.6.).



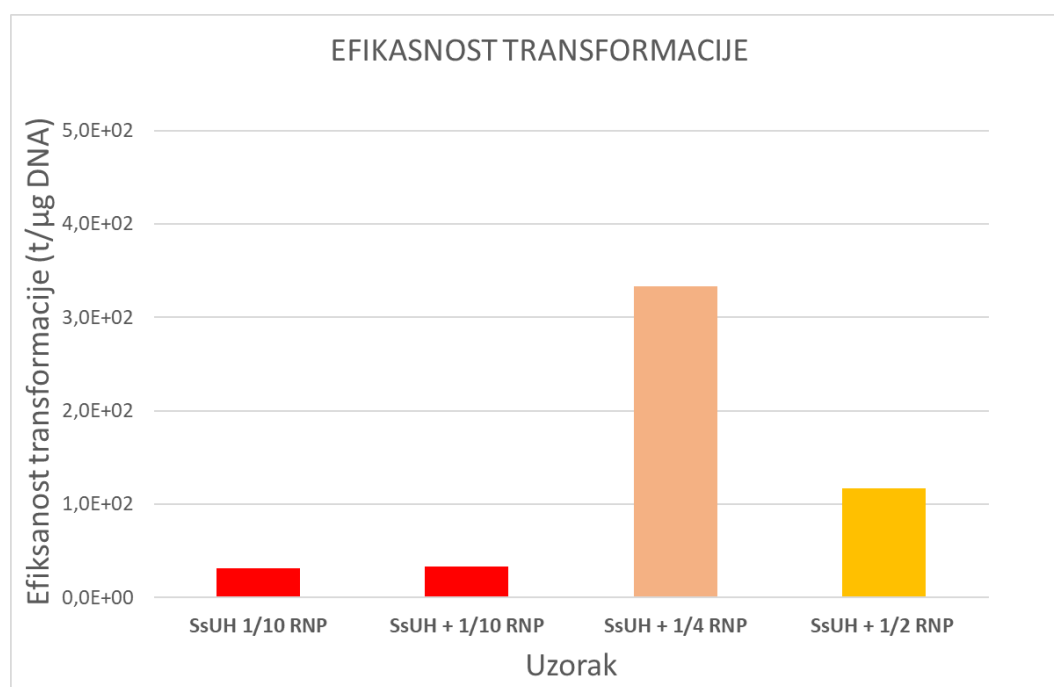
Slika 18. Provjera uspješnosti sinteze disrupcijske kazete SsUH lančanom reakcijom polimerazom. Λ – standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana s HindIII); 1 – fragment SsUH; M – standard za gel-elektroforezu (1kb NEB)

4.2.2. Utjecaj koncentracije RNP kompleksa na uspješnost transformacije i zamijene gena *URA3* u *S. stipitis*

U odnosu na ranija istraživanja, korištena je jedna desetina, jedna četvrtina i jedna polovina koncentracije kompleksa RNP. Transformacija je provedena sa 600 ng disrupcijske kazete SsUH, a za provjeru uspješnosti transformacije korišteno je 1 ng replikativnog plazmida pRS54FcoHyg. Elektroporacija je provedena prema protokolu za transformaciju kvašćevih stanica elektroporacijom (poglavlje 3.2.9.) te su korišteni parametri koji su omogućili najvišu efikasnost transformacije (Čurković, 2021). Korišten je elektroporator Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad), vrijednost električnog pulsa iznosila je 2,0 kV te je nakon električnog pulsa stanicama dodana smjesa YPD/sorbitol i stanice su inkubirane 3 sata prije nacjepljivanja. Transformanti dobiveni transformacijom podvrgnuti su daljnjoj analizi fenotipa precjepljivanjem na hranjivu podlogu koja sadrži higromicin i repliciranjem na podlogu koja ne sadrži uracil, kako bi se utvrdio postotak transformanata kod kojih je došlo do uspješne zamijene gena, odnosno genskog ciljanja pri čemu nastaje fenotip Hyg^R Ura⁻, dok transformanti fenotipa Hyg^R Ura⁺ nastaju nekim od aberantnih genetičkih događaja. Broj dobivenih transformanata u svakom od uzoraka prikazani su u tablici 2, a utjecaj koncentracije RNP kompleksa na efikasnost transformacije prikazan je na slici 19.

Tablica 2. Broj transformanata nakon transformacije disrupcijskom kazetom SsUH pri čemu je korištena gRNA u sklopu kompleksa RNP

Uzorci	Broj transformanata
pRS54FcoHyg	1582
SsUH + 1/10 RNP	15
SsUH + 1/10 RNP	17
SsUH + 1/4 RNP	176
SsUH + 1/2 RNP	36



Slika 19. Ovisnost efikasnosti transformacije o udjelu RNP

Kao što je vidljivo iz prikazanih rezultata, efikasnost transformacije najveća je ukoliko se koristi 1/4 RNP od preporučene koncentracije prema protokolu proizvođača kompleksa (IDT). Međutim, niti u jednom od dobivenih transformanata nije došlo do željene zamjene gena, odnosno do genskog ciljanja jer su svi transformanti fenotipa Hyg^R Ura⁺ i prema tome možemo zaključiti da je uspješnost genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis* manja od 0,2 %.

4.2.3. Optimizacija postupka transformacije kvasca *Scheffersomyces stipitis* protoplastiranjem

Kako bi se optimizirao postupak transformacije kvasca *Scheffersomyces stipitis* protoplastiranjem i pri tome odredili parametri koji omogućuju višu efikasnost transformacije, korišten je protokol za protoplastiranje kvasca *S. Cerevisiae* BY 4742 uz manje izmjene (Svetec i sur., 2007). Analiziran je utjecaj osmotskog stabilizatora, 1M sorbitola, i 1% SDS-a na preživljenje stanica kvasca *S. stipitis* te je ispitana osjetljivost kvasca na antibiotik higromicin kako bi se mogli selekcionirati transformanti. U svim eksperimentima proveden je postupak koji se provodi pri transformaciji protoplastiranjem (poglavlje 3.2.10.), ali su izostavljeni koraci protoplastiranja i transformacije. Od tako pripremljenih stanica *S. stipitis* pripremljeno je četvrto razrjeđenje u 1M sorbitolu. Slijedi inkubacija 0, 10, 20 i 30 minuta te su potom neprotoplastirane, netransformirane stanice nacijepljene na krutu kompleksnu kompletnu YPD podlogu. Preživljenje stanica *S. stipitis* u 1M sorbitolu kao osmotskom stabilizatoru (tablica 3) neznatno se smanjuje tijekom 20 minuta inkubacije. Potvrđena je stabilnost stanica kvasca *S. stipitis* u sorbitolu te se u daljnjim eksperimentima transformacijama 1M sorbitol koristi kao osmotski stabilizator tijekom pripreme i regeneracije protoplasta.

Tablica 3. Preživljenje kvasca *S. stipitis* u 1M sorbitolu. Prikazan je broj poraslih kolonija na dvije paralelno nacijepljene YPD podloge, prosječan broj poraslih kolonija, te preživljenje stanica u 1M sorbitolu.

Vrijeme (minute)	Broj poraslih kolonija		Prosječan broj poraslih kolonija	Preživljenje [%]
	Podloga 1	Podloga 2		
0	566	585	575,5	100
10	342	420	381	66
20	382	350	366	64
30	462	410	436	75

Uz to, pripremljeno je četvrto razrjeđenje neprotoplastiranih, netransformiranih stanica kvasca u sterilnoj deioniziranoj vodi (800 µl) uz dodatak 100 µL 1 % SDS-a . Stanice su zatim inkubirane 0, 5, 10 i 15 minuta te su nacijepljene na krutu kompleksnu kompletnu YPD podlogu.

Rezultati prikazani u tablici 4 ukazuju da 1 %-tna otopina SDS-a , već nakon inkubacije od 5 minuta inkubacije uništava staničnu membranu neprotoplastiranih stanica.

Tablica 4. Preživljenje kvasca *S. stipitis* u 1 % SDS-u. Prikazan je broj poraslih kolonija na dvije paralelno naciepljene YPD podloge, prosječan broj poraslih kolonija, te preživljenje stanica tretiranih s 1%-tnim SDS-om.

Vrijeme (minute)	Broj poraslih kolonija		Prosječan broj poraslih kolonija	Preživljenje [%]
	Podloga 1	Podloga 2		
0	331	368	349,5	100
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
15	0	0	0	0

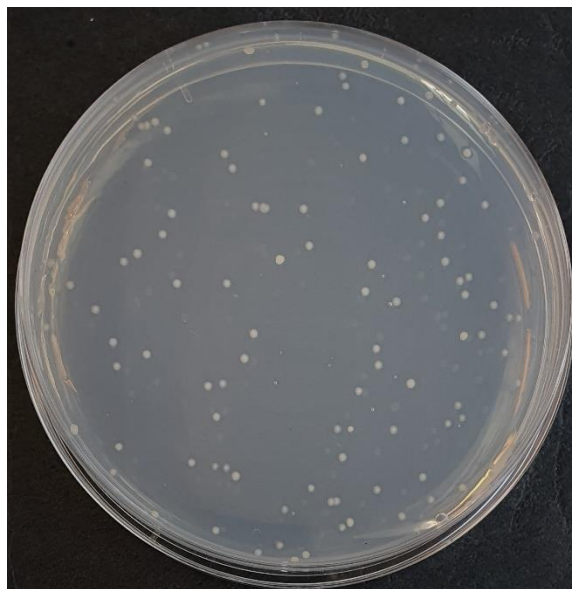
Bilo je potrebno ispitati i osjetljivost kvasca na antibiotik higromicin kako bi se odredila koncentracija antibiotika pogodna za selekciju transformanata. Osjetljivost na higromicin ispitana je na stanicama koje su tretirane na isti način kako se tretiraju stanice pri transformaciji protoplastiranjem (poglavlje 3.2.10.), ali su izostavljeni koraci protoplastiranja i transformacije. Prethodno pripremljenim neprotoplastiranim stanica kvasca *S. stipitis* ispitana je osjetljivost na različite koncentracije antibiotika higromicina (200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL, 1100 µg/mL, 1200 µg/mL, 1400 µg/mL, 1600 µg/mL) u krutom regeneracijskom agaru. Kao što je prikazano u tablici 5, higromicin je djelovao inhibitorno na rast neprotoplastiranih stanica pri koncentraciji 1100 µg/mL , te je ova koncentracija korištena za selekciju transformanata u daljnjim transformacijama.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja osjetljivosti kvasaca *S. stipitis* na antibiotik higromicin u regeneracijskom agaru. Prikazana je srednja vrijednost broja poraslih kolonija u tri nezavisna eksperimenta na regeneracijskom agaru s određenom koncentracijom higromicina. Plavom bojom označeni su brojevi poraslih kolonija na podlozi s koncentracijom higromicina koja je odabrana za daljnji rad.

Koncentracija higromicina [µg/mL]	Broj poraslih kolonija
0	3256,5
200	63,5
400	11,5
600	4
800	3,5
1000	1
1100	0
1200	0,25
1400	0
1600	0

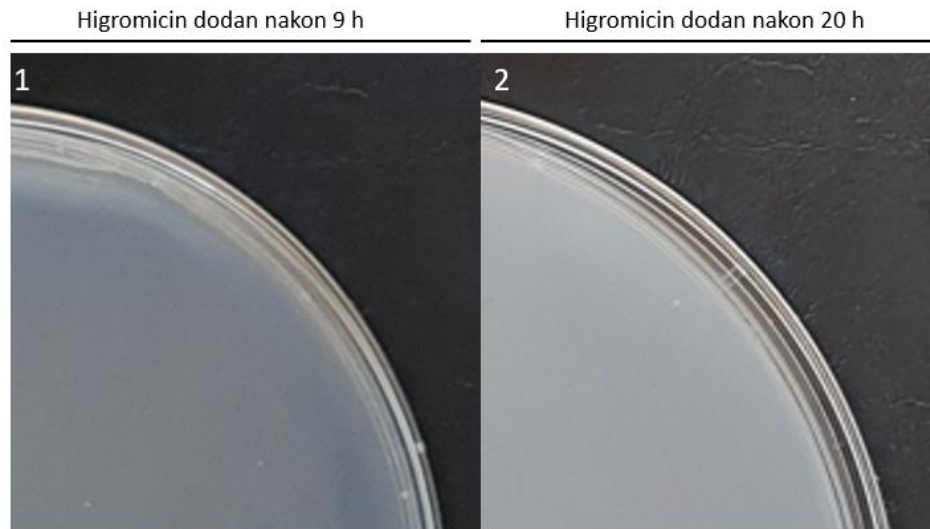
Nakon optimizacije pojedinih parametara postupka transformacije protoplastiranjem, provedena je transformacija protoplastiranjem, koristeći 1, 5, 10, 100, 180 i 360 ng replikativnog plazmida pRS54FcoHyg, te 200 i 1000 ng disruptijske kazete SsUH kako bi se provjerilo rezultira li cijeloukupni postupak vijabilnim transformantima. Nažalost, nisu dobiveni transformanti niti u jednom od navedenih uzoraka. Uz navedene parametre pratilo se preživljenje stanica kvasca *S. stipitis* prilikom protoplastiranja koje je u svim provedenim eksperimentima bilo više od 92%. Postotak preživljenja kvasaca *S. stipitis* ukazuje da su stanice uspješno regenerirale staničnu stijenku (slika 20) i nastavile uobičajeni životni ciklus. Prema tim rezultatima zaključujemo da

odabrana koncentracija higromicina koja inhibira rast neprotoplastiranih stanica (1100 µg/mL), istovremeno inhibira rast i protoplastiranih stanica.



Slika 20. Uspješna regeneracija stanične stijenke kvasca *Scheffersomyces stipitis* nakon provedene metode protoplastiranja i regeneracije u agaru bez higromicina.

Smanjenjem koncentracije antibiotika higromicina i produljenjem vremena nakon kojeg se na regeneracijski agar razmazuje higromicin dolazi do regeneracije protoplastiranih stanica kvasaca *S. stipitis* što se vidi kao zamućenje hranjive podloge (slika 21). Prema ovim rezultatima zaključujemo da odabrani parametri ne pogoduju regeneraciji protoplasta pa tako ni regeneraciji potencijalnih transformanata. U budućim istraživanjima potrebno je ispitati širi raspon parametara koncentracije antibiotika i vremena nakon kojeg se antibiotik razmazuje na krute hranjive podloge kako bi se omogućila regeneracija protoplasta i istovremeno omogućila selekcija transformanata.



Slika 21. Prikaz djela hranjive podloge sa regeneracijskim agarom nakon provedenog postupka transformacije protoplasta *S. stipitis* sa 1 μg disrupcijske kazete SsUH. Nakon 9 i 20 sati regeneracije na agar je dodan higromicin tako da njegova koncentracija iznosi 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ni u jednom slučaju na podlozi nisu selekcionirani transformanti, ali je na podlozi 2 (dodatak higromicina nakon 20 sati) vidljivo zamućenje.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata, te prikazanih rezultata i diskusije mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. U skladu s očekivanjem, linearna transformirajuća DNA, u genom kvasca *S. stipitis* ugrađuje se ilegitimnom (nehomolognom) rekombinacijom, najvjerojatnije u nasumično mjesto u genomu.
2. U kvascu *K. marxianus*, replikativni plazmid korišten za proizvodnju 2,3-butandiola, u skladu s očekivanjem stabilno se replicira, međutim struktura replikativnog plazmida plazmid za proizvodnju L-laktata se značajno promijenila. Nestabilnost plazmida za proizvodnju L-laktata u kvascu *K.marxianus*, najvjerojatnije je posljedica homologne rekombinacije jer je u tri različita transformanta zabilježena ista strukturna promjena plazmida.
3. Prethodno razvijena metoda protoplastiranja nije pogodna za transformaciju kvasca *S. stipitis*, a koncentracija ribonukleinskog kompleksa koji se koristi u sustavu CRISPR/*Cas9* značajno utječe na uspješnost transformacije elektroporacijom.

6. LITERATURA

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, i sur. (2001) Current Protocols in Molecular Biology. 4. izd., John Wiley and Sons, New York.

Biot-Pelletier D, Martin VJJ (2014) Evolutionary engineering by genome shuffling. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 3877–3887. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5616-8>

Buckholz RG, Gleeson MAG (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology* **9**, 1067–1072. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1067>

Burke DT, Carle GF, Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**, 806–812. <https://doi.org/10.1126/science.3033825>

Cai P, Gao J, Zhou Y (2019) CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. *Microb Cell Factories* **18**, 63-72. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1112-2>

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>

Cao M, Gao M, Ploessl D, Song C, Shao Z (2018) CRISPR-mediated Genome Editing and Gene Repression in *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol. J* **13**, e1700598. <https://doi.org/10.1002/biot.201700598>

Cárdenas A, Borrell V (2021) A protocol for *in ovo* electroporation of chicken and snake embryos to study forebrain development. *STAR Protoc* **2**, 100692. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100692>

Chen Z, Sun H, Li P, He N, Zhu T, Li Y (2013) Enhancement of the Gene Targeting Efficiency of Non-Conventional Yeasts by Increasing Genetic Redundancy. *PLoS One* **8**, e57952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057952>

Cheon Y, Kim JS, Park JB, Heo P, Lim JH, Jung GY, i sur. (2014) Dae-Hyuk KweonA biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. *J Biotechnol* **182**, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.010>

Colussi PA, Taron CH (2005) *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl Environ Microbiol* **71**,7092–7098. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7092-7098.2005>

Conceicao GJA, Moran PJS, Rodrigues JAR (2003) Highly efficient extractive biocatalysis in the asymmetric reduction of an acyclic enone by the yeast *Pichia stipitis*. *Tetrahedron-Asymmetr* **14**, 43–45. [https://doi.org/10.1016/s0957-4166\(02\)00798-x](https://doi.org/10.1016/s0957-4166(02)00798-x)

Čurković, L. (2021) Poboljšanje postupka transformacije kvasca *Scheffersomyces stipitis* elektroporacijom (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Diniz R, Villada J, Alvim M, Vidigal P, Vieira N, Maceiras M, i sur. (2017) Transcriptome analysis of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 under ethanol stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **101**, 6969–6980. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8432-0>

du Preez JC, van Driessel B, Prior BA (1989) Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fedbatch cultures at controlled low dissolved-oxygen levels. *Appl Microbiol Biot* **30**, 53–58. <https://doi.org/10.1007/bf00255996>

Eckhaut T, Lakshmanan PS, Deryckere D, Van Bockstaele E, Van Huylenbroeck J (2013) Progress in plant protoplast research. *Planta*. **238**, 991–1003. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1936-7>

Ferguson DO, Holloman WK (1996) The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5419–5424. <https://doi.org/10.1073/pnas.110152897>

Gabriel B, Teissie J (1997) Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys J* **73**, 2630–2637. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78292-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78292-4)

Gallmetzer M, Burgstaller W, Schinner F (1999) An optimized method for the isolation of protoplasts from *Penicillium simplicissimum* to produce sealed plasma membrane vesicles. *Mycologia* **91**, 206–212. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061009>

- Gao M, Cao M, Suástegui M, Walker J, Rodriguez Q, Wu Y, i sur. (2017) Innovating a nonconventional yeast platform for producing shikimate as the building block of high-value aromatics. *ACS Synthetic Biology* **6**, 29-38. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00132>
- 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 USA* **109**, e2579-e2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gjuračić K, Zgaga Z (1996) Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **253**, 173-181. <https://doi.org/10.1007/s004380050310>
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* **17**, 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gow NAR, Latge JP, Munro CA (2017) The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* **5** <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Grahl N, Demers E, Crocker AW, Hogan DA (2017) Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non-*albicans* *Candida* Species. *mSphere* 2ee00218-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17>
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007) The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* **8**, 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>
- Harashima S, Takagi, A, Oshima Y (1984) Transformation of protoplasted yeast cells is directly associated with cell fusion. *Mol Cell Biol* **4**, 771-778. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.4.771-778.1984>
- Harner NK, Wen X, Bajwa PK, Austin GD, Ho CY, Habash MB, i sur. (2015) Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1535-z>
- Hong KK, Nielsen J (2012) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. *Cell Mol Life Sci* **69**, 2671–2690. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0945-1>

Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167 – 170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>

Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

IDT (2021) The CRISPR Basics Handbook. IDT – Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages> Pristupljeno 8. kolovoza 2022.

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163–168. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.163-168.1983>

Jasin M, Rothstein R (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, :a012740. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>

Jeffries TW i Van Vleet JR (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res* **9**, 793–807. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00525.x>

Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, i sur. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* **25**, 319–326. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>

Jeong H, Lee D-H, Kim SH, Kim H-J, Lee K, Song JY, i sur. (2012) Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. *Eukaryot Cell* **11**, 1584–1585. <https://doi.org/10.1128/EC.00260-12>

Kawai S, Pham TA, Nguyen HT, Nankai H, Utsumi T, Fukuda Y, i sur. (2004) Molecular insights on DNA delivery into *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.011>

Keane-Myers AM, Bell M (2014) Evolution of electroporated DNA vaccines. U: Li S, Cutrera J, Heller R, Teissie J, (ured.) *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, str. 269-278.

Kim H, Yoo, SJ, Kang, HA (2015) Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Res.* **15**, 1-16. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>

- Kim TY, Lee SW, Oh MK (2014) Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Enzym Microb Technol* **61**, 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.011>
- Klinner U, Schafer 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>
- Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X (2012) Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, **40**, 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>
- Kurtzman CP (1990) *Candida shehatae*—genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **57**, 215–222. <https://doi.org/10.1007/bf00400153>
- Lalithakumari D (2000) Isolation of fungal protoplasts of filamentous fungi. U: Lalithakumari D. (ured.) Fungal protoplast: a biotechnological tool. CRC Press, Florida, str. 1-54.
- Lander ES (2016) The heroes of CRISPR. *Cell* **164**, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>
- Laplaza JM, Torres BR, Jin YS, Jeffries TW (2006) *Sh ble* and Cre adapted for functional genomics and metabolic engineering of *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb Tech* **38**, 741–747. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.024>
- Lee MH, Lin JJ, Lin YJ, Chang JJ, Ke HM, Fan WL, i sur. (2018) Genome-wide prediction of CRISPR/Cas9 targets in *Kluyveromyces marxianus* and its application to obtain a stable haploid strain. *Sci Rep* **8**, 7305. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25366-z>
- Li D, Tang Y, Lin J, Cai W (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories* **16**, 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>
- Li X, Heyer W-D (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**, 99-113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- Lobs AK, Schwartz C, Wheeldon I (2017) Genome and metabolic engineering in nonconventional yeasts: current advances and applications. *Synth Syst Biotechnol Article in press* <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>

- Lodder J, Kreger-van Rij NJW (1952) The yeasts: a taxonomic study. NHPC, Amsterdam.
- Lu P, Davis BP, Hendrick J, Jeffries TW (1998) Cloning and disruption of the beta-isopropylmalate dehydrogenase gene (*LEU2*) of *Pichia stipitis* with *URA3* and recovery of the double auxotroph. *Appl Microbiol Biot* **49**, 141–146. <https://doi.org/10.1007/s002530051150>
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010) Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* **463**, 568 – 571. <https://doi.org/10.1038/nature08703>
- McEachern MJ, Haber JE (2006) Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem* **75**, 111–35. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133234>
- Melake T, Passoth V, Klinner U (1996) Characterization of the genetic system of the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Curr Microbiol* **33**, 237–242. <https://doi.org/10.1007/s002849900106>
- Miklenić M, Žunar B, Štafa A, Svetec IK (2015) Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res* **15**, fov096–100. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov096>
- Näätäsaari L, Mistlberger B, Ruth C, Hajek T, Hartner FS, Glieder A (2012) Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE* **7**, e39720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039720>
- Nambu-Nishida Y, Nishida K, Hasunuma T, Kondo A (2017) Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- And thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Sci. Rep.* **7**, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08356-5>
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA, Nguyen NH, Suh SO, Blackwell M (2006) Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. *Arthropod Struct Dev* **35**, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2005.06.003>
- Neumann E, Rosenheck K (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membrin Biol* **10**, 279-290. <https://doi.org/10.1007/BF01867861>

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**, 841-845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>

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 Microb* **74**, 7514–7521. <https://doi.org/10.1128/AEM.01854-08>

Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* **6**, 1-31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

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**, 107695-107723. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>

Peberdy JF (1979) Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. *Annu Rev Microbiol* **33**, 21–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.000321>

Pohl C, Kiel AJKW, Driessen AJM, Bovenberg RAL, Nygård Y (2016) CRISPR/Cas9 Based Genome Editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synth Biol* **5**, 754–764. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00082>

Polstein LR, Gersbach CA (2015) A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous geneactivation. *Nat Chem Biol* **11**, 198 – 200. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1753>

Prud'homme GJ, Glinka Y, Khan AS i Draghia-Akli R (2006) Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr Gene Ther* **6**, 243-273. <https://doi.org/10.2174/156652306776359504>

Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res* **15**, fov053-65. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>

Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK (2012) FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* **30**, 460–465. <https://doi.org/10.1038/nbt.2170>

Ribeiro O, Gombert AK, Teixeira JA, Domingues L (2007) Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.* **131**, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.027>

Riley R, Haridas S, Wolfe KH, Lopes MR, Hittinger CT, Göker M, et al. (2016) Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 9882–9887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603941113>

Rouwenhorst RJ, Visser LE, Baan AA, Scheffers WA, Van Dijken JP (1988) Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl Environ Microb* **54**, 1131–1137. <https://doi.org/10.1128/aem.54.5.1131-1137.1988>

Saito T, Nakatsuji N (2001) Efficient Gene transfer into the embryonic mouse brain using *in vivo* electroporation. *Dev Biol* **240**, 237–246. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0439>

Saulis G (1997) Pore disappearance in a cell after electroporation: theoretical simulation and comparison with experiments. *Biophys J* **73**, 1299–1309. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78163-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78163-3)

Saulis G, Venslauskas MS, Naktinis J (1991) Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *J Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem* **321**, 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(91\)85564-6](https://doi.org/10.1016/0022-0728(91)85564-6)

Shi J, Zhang M, Zhang L, Wang P, Jiang L, Deng H (2014) Xylose-fermenting *Pichia stipitis* by genome shuffling for improved ethanol production. *Microb Biotechnol* **7**, 90–9. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12092>

Shigekawa K, Dower WJ (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**, 742–751.

Spencer JFT, Ragout de Spencer AL, Laluce C (2002) Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>

Staals RHJ, Agari Y, Maki-Yonekura S, Zhu Y, Taylor DW, van Duijn E, i sur. (2013). Structure and Activity of the RNA-Targeting Type III-B CRISPR-Cas Complex of *Thermus thermophilus*. *Mol Cell* **52**, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.013>

Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 630–670. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002>

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25–35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90331-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8)

Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E (1991) *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta - Gene Struc Exp* **1088**, 131-134. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90162-F](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90162-F)

van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**, 343–352. <https://doi.org/10.1007/BF00871229>

Varela C, Bartel C, Onetto C, Borneman A (2020) Targeted gene deletion in *Brettanomyces bruxellensis* with an expression-free CRISPR-Cas9 system. *Appl Microbiol Biot* **104**, 7105 – 7115. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10750-5>

Visser W, Scheffers WA, Batenburg-van der Vegte WH, van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3785–3792. <https://doi.org/10.1128/aem.56.12.3785-3792.1990>

Vogl T, Hartner FS, Glieder A (2013) New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 1094-1101. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.024>

Wagner JM, Alper HS (2015) Synthetic biology and molecular genetics in nonconventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genet Biol* **89**, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>

Wagner JM, Alper HS (2016) Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genet Biol* **89**, 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>

Weninger A, Killinger M, Vogl T (2016) Key methods for synthetic biology: genome engineering and DNA assembly. U: Glieder A, Kubicek CP., Mattanovich D, Wiltschi B i Sauer M (ured.) *Synthetic Biology*. Springer, Cham, str. 101–141.

Wiedenheft B, Zhou K, Jinek M, Coyle SM, Ma W, Doudna JA (2009) Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure* **17**, 904 – 912. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.03.019>

Yang C, Hu S, Zhu S, Wang D, Gao X, Hong J (2015) Characterizing yeast promoters used in *Kluyveromyces marxianus*. *World J Microbiol Biotechnol* **31**, 1641–1646. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1899-x>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Maja Horvat) 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