

Genetičke modifikacije nekonvencionalnih kvasaca u svrhu proizvodnje 2,3-butandiola i L-laktata

Matanović, Angela

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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:159:079520>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Angela Matanović

**GENETIČKE MODIFIKACIJE
NEKONVENCIONALNIH KVASACA U
SVRHU PROIZVODNJE 2,3-
BUTANDIOLA I L-LAKTATA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Angela Matanović

**GENETIČKE MODIFIKACIJE
NEKONVENCIONALNIH KVASACA U
SVRHU PROIZVODNJE 2,3-
BUTANDIOLA I L-LAKTATA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Angela Matanović

GENETIC MODIFICATIONS OF NON- CONVENTIONAL YEASTS FOR PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL AND L-LACTATE

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Prof. Ivan-Krešimir Svetec, PhD

Zagreb, 2024

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

GENETIČKE MODIFIKACIJE NEKONVENCIONALNIH KVASACA U SVRHU PROIZVODNJE 2,3-BUTANDIOLA I L-LAKTATA

Angela Matanović, mag. ing. biotechn.

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

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

Sažetak: Lignocelulozne sirovine pogodne su za uspostavu održivih bioprocasa budući da su obnovljive i široko dostupne. Kao potencijalni radni mikroorganizmi za održivu proizvodnju biokemikalija ističu se nekonvencionalni kvasci *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus* prvenstveno zahvaljujući sposobnosti fermentacije ksiloze koja čini velik udio suhe tvari lignoceluloznih sirovina. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti može li se ciljanim genetičkim modifikacijama ovih kvasaca, koji prirodno ne proizvode L-laktat i 2,3-butandiol, konstruirati producente navedenih biokemikalija. U svrhu proizvodnje L-laktata konstruirani su sojevi kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus* s eksprimiranim genima *ldhL1* i *ldhL2* koji u bakteriji *Lactobacillus gasseri* kodiraju za L-laktat dehidrogenaze. Za proizvodnju 2,3-butandiola u kvascima su eksprimirani geni *alsS* i *alsD* koji u bakteriji *Bacillus subtilis* kodiraju za α -acetolaktat sintazu i α -acetolaktat dekarboksilazu. Kako bi se povećao prinos L-laktata i 2,3-butandiola, u konstruirane sojeve kvasca *K. marxianus* unesene su i dodatne modifikacije usmjerene na inhibiciju kompetitivnih metaboličkih puteva. Nizom eksperimenata utvrđeno je da su producenti L-laktata i 2,3-butandiola kvasaca *K. marxianus* i *S. stipitis* uspješno konstruirani. Od konstruiranih sojeva, najbolji producent L-laktata je soj kvasca *K. marxianus* s eksprimiranim genima *ldhL1* i *ldhL2* te inaktiviranim genom *PDC1* koji fermentacijom glukoze proizvodi L-laktat s efikasnošću od 87 %, dok je najbolji producent 2,3-butandiola soj kvasca *K. marxianus* koji eksprimira gene *alsS* i *alsD* te iz glukoze proizvodi 2,3-butandiol s efikasnošću od 62 %.

Broj stranica: 154

Broj slika: 89

Broj tablica: 13

Broj literaturnih navoda: 168

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nekonvencionalni kvasci, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, genetičke modifikacije, L-laktat, 2,3-butandiol

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Igor Slivac, redoviti profesor
2. dr. sc. Božidar Šantek, redoviti profesor u trajnom zvanju
3. dr. sc. Martina Sudar, docentica

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

GENETIC MODIFICATIONS OF NON-CONVENTIONAL YEASTS FOR PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL AND L-LACTATE

Angela Matanović, MSc

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

Supervisors: Prof. Ivan-Krešimir Svetec, PhD

Abstract: Lignocellulosic raw materials are suitable for establishing sustainable bioprocesses as they are renewable and widely available. Non-conventional yeasts such as *Scheffersomyces stipitis* and *Kluyveromyces marxianus* stand out as potential working microorganisms for sustainable biochemical production, primarily due to their ability to ferment xylose, which constitutes a large proportion of the dry matter of lignocellulosic raw materials. Therefore, the aim of this study was to investigate whether it is possible to construct producers of these biochemicals by targeted genetic modifications of these yeasts, which do not naturally produce L-lactate and 2,3-butanediol. For the purpose of producing L-lactate, yeast strains *S. stipitis* and *K. marxianus* were constructed with the expressed genes *ldhL1* and *ldhL2*, which code for L-lactate dehydrogenase in the bacterium *Lactobacillus gasseri*. For the production of 2,3-butanediol, the genes *alsS* and *alsD*, which code for α -acetolactate synthase and α -acetolactate decarboxylase in the bacterium *Bacillus subtilis*, were expressed in yeast. In order to increase the yield of L-lactate and 2,3-butanediol, additional modifications aimed at inhibiting competitive metabolic pathways were introduced into the constructed yeast strains *K. marxianus*. Through a series of experiments, it was established that the producers of L-lactate and 2,3-butanediol yeasts *K. marxianus* and *S. stipitis* were successfully constructed. Of the engineered strains, the best producer of L-lactate is the yeast strain *K. marxianus* with the expressed *ldhL1* and *ldhL2* genes and the inactivated *PDC1* gene, which produces L-lactate with an efficiency of 87 % through glucose fermentation, while the best producer of 2,3-butanediol is the yeast strain *K. marxianus* that expresses the *alsS* and *alsD* genes and produces 2,3-butanediol from glucose with an efficiency of 62 %.

Number of pages: 154

Number of figures: 89

Number of tables: 13

Number of references: 168

Original in: Croatian

Keywords: non-conventional yeasts, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, genetic modifications, L-lactate, 2,3-butanediol

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. PhD Igor Slivac, Full Professor
2. PhD Božidar Šantek, Full Professor
3. PhD Martina Sudar, Assistant Professor

Thesis deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Genetičke modifikacije nekonvencionalnih kvasaca u svrhu proizvodnje 2,3-butandiola i L-laktata“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanjem mentora na sjednici održanoj 26. travnja 2022., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktora znanosti na sjednici održanoj 19. srpnja 2022.

Informacije o mentoru

Dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec, redoviti profesor na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, rođen je 5. siječnja 1971. u Splitu. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu (PBF), smjer biokemijsko inženjerstvo upisao je 1989. godine, a diplomirao 1995. godine te stekao zvanje inženjera prehrambene tehnologije. Magistrirao je 2000. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, studij molekularne i stanične biologije, a doktorirao je 2005. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u području biotehničkih znanosti odnosno u području molekularne biotehnologije. Bio je pročelnik Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, voditelj je diplomskog studija Molekularna biotehnologija te nositelj predmeta kao što su Molekularna genetika, Genetičko inženjerstvo, Genetika eukariota i GMO u proizvodnji hrane. Do sada je bio mentor četiri obranjena doktorata i većeg broja završnih i diplomskih radova. Njegov znanstveni interes vezan je uz molekularnu genetiku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i nekonvencionalnih kvasaca uključujući genetičku rekombinaciju i primjenu metoda genetičkog inženjerstva u svrhu konstrukcije potencijalno biotehnološki interesantnih sojeva. Sudjelovao je u nekoliko znanstveno-istraživačkih projekata financiranih od Ministarstva znanosti Republike Hrvatske i Hrvatske zaklade za znanost te je imao ulogu mentora na jednom projektu financiranog iz fondova Europske unije. Kao gostujući znanstvenik u nekoliko je navrata boravio u Institut national de la santé et de la recherche médicale, U571 (Pariz, Francuska) i Mediterranean Institute For Life Sciences (Split, Hrvatska). Aktivno se bavi problematikom genetički modificiranih organizama te je član Vijeća za GMO Republike Hrvatske, a bio je član Odbora za ograničenu uporabu GMO u zatvorenom sustavu pri Ministarstvu zdravlja Republike Hrvatske i član Znanstvenog odbora za hranu i hranu za životinje koja sadrži GMO pri Hrvatskoj agenciji za hranu. Također je aktivni član nekoliko stručnih i znanstvenih udruga, te je bio predsjednik Hrvatskog genetičkog društva, član je Upravnog odbora Društva nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu te je član upravnog odbora, bivši predsjednik i osnivač Hrvatske udruge genetičkih inženjera (HUGI).

SAŽETAK

L-laktat i 2,3-butandiol platformske su kemikalije, odnosno osnovne kemikalije koje se koriste kao polazni spojevi za proizvodnju brojnih kemijskih proizvoda na bazi ugljika. Ove kemikalije mogu se proizvesti kemijskom sintezom ili mikrobnom fermentacijom. Iako se većina kemikalija još uvijek proizvodi kemijskom sintezom iz fosilnih goriva, zbog njihova iscrpljivanja i štetnog utjecaja na okoliš razvijaju se tehnologije koje omogućavaju uspostavu održivih procesa proizvodnje kemikalija iz obnovljivih izvora energije. Značajnu pozornost pritom privlače procesi proizvodnje biokemikalija mikrobnom fermentacijom sekundarnih lignoceluloznih sirovina koje su jeftine, obnovljive i lako dostupne. Unatoč tome što je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan od najduže i najčešće korištenih mikroorganizama u biotehnologiji, ovom kvascu nedostaju određene karakteristike koje su potrebne za učinkovito prevođenje alternativnih supstrata u željene biokemikalije zbog čega raste interes za nekonvencionalnim kvascima. Unutar ove izuzetno heterogene skupine mikroorganizama, kvasci *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus* ističu se zahvaljujući sposobnosti fermentacije ksiloze i kofermentacije glukoze i ksiloze koje su ključne za efikasno iskorištavanje lignoceluloznih sirovina zbog čega su i korišteni kao polazni sojevi za konstrukciju producenata L-laktata i 2,3-butandiola. Budući da kvasci *S. stipitis* i *K. marxianus* prirodno ne proizvode industrijski značajne koncentracije L-laktata i 2,3-butandiola, potrebno ih je genetički modificirati. U svrhu proizvodnje L-laktata u ovim su kvascima eksprimirani geni *ldhL1* i *ldhL2* iz bakterije *Lactobacillus gasseri* koji kodiraju za L-laktat dehidrogenaze, dok su za proizvodnju 2,3-butandiola korišteni geni *alsS* i *alsD* koji u bakteriji *B. subtilis* kodiraju za α -acetolaktat sintazu i α -acetolaktat dekarboksilazu. Kako bi se povećao prinos L-laktata i 2,3-butandiola, dobiveni sojevi kvasca *K. marxianus* dodatno su genetički modificirani s ciljem zaustavljanja kompetitivnih metaboličkih puteva. Nizom eksperimenata pokazano je da su producenti L-laktata i 2,3-butandiola kvasaca *K. marxianus* i *S. stipitis* uspješno konstruirani, pri čemu najviši prinos L-laktata fermentacijom glukoze postiže soj kvasca *K. marxianus* s eksprimiranim genima *ldhL1* i *ldhL2* te inaktiviranim genom *PDC1* ($Y_{P/S} = 0,87 \text{ g g}^{-1}$), dok najviši prinos 2,3-butandiola ostvaruje soj kvasca *K. marxianus* koji eksprimira gene *alsS* i *alsD* ($Y_{P/S} = 0,31 \text{ g g}^{-1}$).

Ključne riječi: nekonvencionalni kvasci, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, genetičke modifikacije, L-laktat, 2,3-butandiol

**GENETIC MODIFICATIONS OF NON-CONVENTIONAL YEASTS FOR
PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL AND L-LACTATE**

Angela Matanović

Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

BACKGROUND: Production of valuable chemicals from cheap, renewable and readily available raw materials, such as secondary lignocellulosic raw materials, is one of the main challenges in industrial biotechnology. Although the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most commonly used microorganisms in biotechnological processes, due to the inability to grow on hydrolysates of lignocellulosic raw materials and the absence of the ability to metabolize xylose, it is not suitable for the use of lignocellulose. Alternative microorganisms suitable for sustainable production of biochemicals are nowadays intensively researched, with significant attention directed towards non-conventional yeasts due to their natural ability to tolerate various extreme conditions, and their ability to ferment a wide range of carbon sources. For the stated reasons, the aim of this work was the construction of strains of non-conventional, xylose-fermenting yeasts *Scheffersomyces stipitis* and *Kluyveromyces marxianus* that can potentially be used for the sustainable production of L-lactate and 2,3-butanediol. The listed biochemicals represent important molecules that are used in the chemical industry as precursors for the synthesis of numerous other molecules, but also in numerous other branches of industry.

METHODS AND RESULTS: In this work, the yeast strains *S. stipitis* JCM 10742T and *K. marxianus* NBRC1777 were genetically transformed to construct strains for the production of L-lactate and 2,3-butanediol. But first, the necessary expression plasmids and plasmids for the inactivation of native yeast genes were constructed using the usual methods and protocols described in Green and Sambrook (2012). The genes *ldhL1* and *ldhL2* encoding L-lactate dehydrogenase in the bacterium *Lactobacillus gasseri* were used during the construction of expression plasmids for the production of L-lactate. The genes *alsS* and *alsD* encoding acetolactate synthase and acetolactate decarboxylase in the bacterium *Bacillus subtilis*, the *BDH1* gene encoding 2,3-butanediol dehydrogenase in the yeast *K. marxianus*, and the *noxE* gene encoding NADH-oxidase in the bacterium *Lactococcus lactis* were used during the construction of expression plasmids for the production of 2,3-butanediol. Since for the efficient

production of L-lactate and 2,3-butanediol it is necessary to direct as many intermediate products of glycolysis and the pentose phosphate pathway as possible to the synthesis of the mentioned compounds, plasmids were constructed that enable the inactivation of the *PDC1* (encoding pyruvate decarboxylase) and *GPD1* (encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase) genes in the yeast *K. marxianus* to prevent the production of ethanol and glycerol.

Yeasts were transformed with the mentioned plasmids, or fragments of these plasmids, by the electroporation method according to the protocol developed for the genetic transformation of the non-conventional yeast *D. bruxellensis*, with minor changes (Miklenić et al., 2015). In total, 11 different strains were constructed in the work, 2 strains of *S. stipitis* yeast and 9 strains of *K. marxianus* yeast, which was confirmed by molecular-genetic analysis using the Southern blot DNA hybridization method or PCR (polymerase chain reaction) method. Through a series of fermentation experiments in different growing conditions, it was established that the strains constructed in this work are significantly better producers of L-lactate or 2,3-butanediol than wild strains. The UPLC (ultra-performance liquid chromatography) method was used to measure the concentration of substrates and products in the media.

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF STUDY: *S. stipitis* and *K. marxianus* strains for the production of L-lactate and 2,3-butanediol were successfully constructed, and this is the first time that these yeasts have been genetically modified to produce 2,3-butanediol. Also, it was shown that by applying classical methods of genetic engineering, it is possible to inactivate the native genes of the yeast *K. marxianus* with 80 % success rate using fragments containing approximately 1.2 kb long homologous ends. The engineered strains have significant biotechnological potential, especially *K. marxianus* strains, since they achieve the highest yields of both L-lactate and 2,3-butanediol. Thus, the strain of this yeast that expresses the *ldhL1* and *ldhL2* genes and has the inactivated *PDC1* gene achieves a L-lactate yield of 0.87 g g⁻¹, while the strain that expresses the *alsS* and *alsD* genes achieves a 2,3-butanediol yield of 0.31 g g⁻¹ glucose. By optimizing the cultivation parameters, it is likely possible to further improve the production of these biochemicals.

(154 pages, 89 figures, 13 tables, 168 references, original language: Croatian)

Keywords: non-conventional yeasts, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, genetic modifications, L-lactate, 2,3-butanediol

Supervisor: Prof. Ivan-Krešimir Svetec, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Obnovljivi i ekološki prihvatljivi izvori energije.....	4
2.1.1. Lignocelulozna biomasa	4
2.2. Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji biokemikalija	7
2.2.1. Životni ciklus i ciljane genetičke modifikacije kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .7	
2.2.1.1. Životni ciklus	8
2.2.1.2. Uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija	8
2.2.1.3. Nedostaci kvasca <i>S. cerevisiae</i> u industrijskoj biotehnologiji	10
2.2.2. Nekonvencionalni kvasci	11
2.2.2.1. Kvasac <i>Scheffersomyces stipitis</i>	13
2.2.2.2. Kvasac <i>Kluyveromyces marxianus</i>	14
2.3. Proizvodnja biokemikalija	15
2.3.1. Laktat	16
2.3.1.1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću mikroorganizama	17
2.3.1.1.1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću bakterija	18
2.3.1.1.2. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću kvasaca	20
2.3.1.1.2.1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću nekonvencionalnih kvasaca	24
2.3.2. 2,3-butandiol	26
2.3.2.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću mikroorganizama	27
2.3.2.1.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću bakterija	28
2.3.2.1.2. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasaca	31
3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. Materijali.....	34
3.1.1. Plazmidi	34
3.1.1.1. Plazmidi korišteni za transformaciju kvasaca.....	38
3.1.1.1.1. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata	38
3.1.1.1.2. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola.....	39
3.1.1.1.3. Plazmidi za inaktivaciju nativnih gena kvasca <i>K. marxianus</i>	41
3.1.2. Oligonukleotidi	41
3.1.3. Mikroorganizmi	43
3.1.3.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	43
3.1.3.2. Kvasci <i>Scheffersomyces stipitis</i> i <i>Kluyveromyces marxianus</i>	43
3.1.4. Hranjive podloge i otopine.....	45
3.1.4.1. Hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	45

3.1.4.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca.....	46
3.1.4.2.1. Hranjive podloge s antibioticima	46
3.1.4.3 Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA.....	47
3.1.4.4. Otopine za transformaciju bakterijskih i kvašćevih stanica.....	48
3.1.4.5. Otopine za agaroznu gel elektroforezu	49
3.1.4.6. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southernu.....	49
3.1.4.7. Kemikalije, enzimi i membrane	50
3.2. Metode	51
3.2.1. Uzgoj bakterije <i>E. coli</i>	51
3.2.2. Uzgoj kvasaca <i>S. stipitis</i> i <i>K. marxianus</i>	51
3.2.2.1. Uzgoj kvasaca <i>S. stipitis</i> i <i>K. marxianus</i> u svrhu proizvodnje L-laktata i 2,3-butandiola.....	51
3.2.3. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA	52
3.2.3.1. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom.....	52
3.2.3.2. Pročišćavanje DNA fenolizacijom.....	52
3.2.3.3. Izolacija dvolančanih plazmida.....	52
3.2.3.3.1. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture.....	52
3.2.3.3.2. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture.....	53
3.2.3.4. Izolacija kvašćeve DNA	53
3.2.3.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela	54
3.2.4. Cijepanje i modifikacija DNA	54
3.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	54
3.2.6. Elektroforeza u agaroznom gelu	54
3.2.7. Hibridizacija DNA po Southernu.....	55
3.2.7.1. Prijenos DNA na membranu	55
3.2.7.2. Predhibridizacija i hibridizacija	55
3.2.7.3. Posthibridizacijsko ispiranje	55
3.2.7.4. Detekcija	55
3.2.8. Transformacija bakterije <i>E. coli</i>	56
3.2.9. Transformacija stanica kvasca	56
3.2.10. Mjerenje pH	57
3.2.11. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)	57
4. REZULTATI.....	58
4.1. Konstrukcija plazmida	58
4.1.1. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata	58
4.1.1.1. Konstrukcija plazmida pRS54FcoH-Ssc.....	58
4.1.1.2. Konstrukcija plazmida pRS53coH-Kmc2 i pRS53coH-Kmc2-Kmc1.....	58

4.1.2. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola.....	58
4.1.2.1. Konstrukcija plazmida pM-STaS-coN i pRS54FcoH-SPaD	59
4.1.2.2. Konstrukcija plazmida pRS53coH-KPaD-KTaS, pRS53coN-KEB i pUC-KPhnE-coK	59
4.1.3. Plazmidi za inaktivaciju nativnih gena kvasca <i>K. marxianus</i>	59
4.1.4. Plazmid sa skraćenom regijom <i>f1 ori</i>	59
4.2. Konstrukcija sojeva za proizvodnju L-laktata	59
4.2.1. Konstrukcija soja kvasca <i>S. stipitis</i> za proizvodnju L-laktata.....	59
4.2.2. Konstrukcija sojeva kvasca <i>K. marxianus</i> za proizvodnju L-laktata.....	59
4.2.2.1. Konstrukcija sojeva KL1 i KL2	59
4.2.2.2. Konstrukcija soja KL2p	59
4.3. Konstrukcija sojeva za proizvodnju 2,3-butandiola.....	60
4.3.1. Konstrukcija soja kvasca <i>S. stipitis</i> za proizvodnju 2,3-butandiola.....	60
4.3.2. Konstrukcija sojeva kvasca <i>K. marxianus</i> za proizvodnju 2,3-butandiola	60
4.3.2.1. Konstrukcija soja KB2	60
4.3.2.2. Konstrukcija soja KB3	60
4.3.2.3. Konstrukcija soja KB2p	60
4.3.2.4. Konstrukcija soja KB2g	60
4.3.2.5. Konstrukcija soja KB2N	60
4.3.2.6. Konstrukcija soja KB2Ng	60
4.4. Proizvodnja L-laktata pomoću kvasaca <i>Scheffersomyces stipitis</i> i <i>Kluyveromyces marxianus</i>	61
4.4.1. Proizvodnja L-laktata pomoću kvasca <i>S. stipitis</i>	61
4.4.1.1. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze.....	61
4.4.1.1.1. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD	61
4.4.1.1.2. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD s dodatkom kalcijeva karbonata ili etanola	61
4.4.1.2. Proizvodnja L-laktata fermentacijom ksiloze	61
4.4.1.2.1. Proizvodnja L-laktata u hranjivim podlogama YPX20 i YPX50	61
4.4.1.2.2. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPX20 s dodatkom etanola ..	61
4.4.1.3. Proizvodnja L-laktata kofermentacijom glukoze i ksiloze	61
4.4.2. Proizvodnja L-laktata pomoću kvasca <i>K. marxianus</i>	62
4.4.2.1. Proizvodnja L-laktata pomoću sojeva KL1 i KL2	62
4.4.2.1.1. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze.....	62
4.4.2.1.1.1. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD	62
4.4.2.1.1.2. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD s dodatkom kalcijeva karbonata.....	62
4.4.2.1.2. Proizvodnja L-laktata fermentacijom ksiloze	62

4.4.2.1.3. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze i ksiloze	62
4.4.2.2. Proizvodnja L-laktata pomoću soja KL2p	62
4.4.2.2.1. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze.....	62
4.4.2.2.2. Proizvodnja L-laktata fermentacijom ksiloze	63
4.4.2.2.3. Proizvodnja L-laktata kofermentacijom glukoze i ksiloze	63
4.5. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasca <i>Scheffersomyces stipitis</i> i <i>Kluyveromyces marxianus</i>	63
4.5.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasca <i>S. stipitis</i>	63
4.5.1.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze	63
4.5.1.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze	63
4.5.1.3. Proizvodnja 2,3-butandiola kofermentacijom glukoze i ksiloze.....	63
4.5.2. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasca <i>K. marxianus</i>	63
4.5.2.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2	63
4.5.2.1.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze	64
4.5.2.1.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze	64
4.5.2.1.3. Proizvodnja 2,3-butandiola kofermentacijom glukoze i ksiloze.....	64
4.5.2.2. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB3	64
4.5.2.3. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2p	64
4.5.2.4. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2g	64
4.5.2.4.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze	64
4.5.2.4.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze	64
4.5.2.5. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2N	64
4.5.2.6. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2Ng	65
4.5.2.6.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze	65
4.5.2.6.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze	65
5. RASPRAVA	66
5.1. Konstrukcija sojeva.....	66
5.2. Proizvodnja biokemikalija pomoću kvasca <i>S. stipitis</i>	66
5.2.1. Utjecaj ekspresije gena <i>ldhL1</i> i <i>ldhL2</i> na proizvodnju L-laktata	66
5.2.2. Utjecaj ekspresije gena <i>alsS</i> i <i>alsD</i> na proizvodnju 2,3-butandiola.....	67
5.3. Proizvodnja biokemikalija pomoću kvasca <i>K. marxianus</i>	67
5.3.1. Utjecaj ekspresije gena <i>ldhL1</i> i <i>ldhL2</i> na proizvodnju L-laktata	67
5.3.2. Utjecaj inaktivacije gena <i>PDC1</i> na proizvodnju L-laktata	67
5.3.3. Utjecaj ekspresije gena <i>alsS</i> , <i>alsD</i> i <i>BDH1</i> na proizvodnju 2,3-butandiola.....	67
5.3.4. Utjecaj zaustavljanja kompetitivnih metaboličkih puteva na proizvodnju 2,3-butandiola.....	67
5.3.5. Utjecaj ekspresije gena <i>noxE</i> na proizvodnju 2,3-butandiola.....	67

6. ZAKLJUČCI.....	68
7. POPIS LITERATURE	69
8. PRILOZI	85
8.1. Popis kratica.....	85
9. ŽIVOTOPIS.....	86

1. UVOD

Uspostava održive proizvodnje biokemikalija ključna je za postizanje dugoročne ravnoteže između industrijskih aktivnosti i očuvanja okoliša. Važna odlika održivih bioprocasa jest efikasno korištenje jeftinih, obnovljivih i lako dostupnih sirovina, a u takve se sirovine ubrajaju i ostaci šumskih i poljoprivrednih sirovina, odnosno sekundarne lignocelulozne sirovine. Iako su ove sirovine bogate fermentabilnim šećerima, njihovu biotehnološku primjenu otežava nužna i energetski zahtjevna hidroliza koja rezultira nastankom inhibitora rasta i fermentacije.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najbolje je istražen eukariot te iznimno čest radni mikroorganizam u bioprocima. Širokoj primjeni ovog kvasca, i u biotehnologiji i u znanstvenim istraživanjima, značajno doprinosi jednostavno i vrlo efikasno uvođenje preciznih modifikacija u njegov genom klasičnim metodama genetičkog inženjerstva koje se osnivaju na unošenju transformirajuće DNA u stanicu i njenoj homolognoj rekombinaciji s genomom. No, prirodni metabolizam kvasca *S. cerevisiae* nije prikladan za uspostavu održivih bioprocasa baziranih na lignocelulozi budući da ne može rasti na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina te nema sposobnost metaboliziranja ksiloze koja može činiti i do 20 % suhe tvari lignocelulozne biomase (Liu, 2006; Mittelman i Barkai, 2017). Kako bi se prevladali nedostaci ovog, u biotehnologiji rutinski korištenog kvasca, intenzivno se istražuju i razvijaju drugi, nekonvencionalni kvasci koji su metabolički i fiziološki prikladniji za pojedine biotehnološke procese, a njihovu primjenu značajno je ubrzao i olakšao razvoj sustava CRISPR/Cas (*engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein*) koji omogućava ciljanu modifikaciju genoma gotovo svih organizama, prevladavajući time glavnu prednost kvasca *S. cerevisiae*.

Nekonvencionalni kvasci dobivaju sve veći biotehnološki značaj zbog specifičnih karakteristika poput prilagodljivosti na različite uvjete okoline, sposobnosti korištenja raznovrsnih supstrata i proizvodnje korisnih spojeva. Tako se u literaturi kao dobri kandidati za iskorištavanje lignoceluloznih sirovina mogu pronaći kvasci *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Spathaspora passalidarum* te neke vrste iz roda *Schwanniomyces*, prvenstveno zbog sposobnosti fermentacije ksiloze (Kurtzman, 2011a; Long i sur., 2012; Papini i sur., 2012; Du i sur., 2019).

L-laktat i 2,3-butandiol iznimno su važni spojevi s primjenom u brojnim industrijama, posebice u kemijskoj gdje se koriste kao prekursori za proizvodnju brojnih drugih molekula. S obzirom na važnost navedenih kemikalija, osnovni cilj ovog rada bila konstrukcija sojeva

nekonvencionalnog kvasca koji bi mogli imati primjenu u održivoj proizvodnji L-laktata i 2,3-butandiola. Za konstrukciju producenata navedenih biokemikalija odabrani su kvasci *S. stipitis* i *K. marxianus*, a budući da odabrani nekonvencionalni kvasci prirodno ne proizvode industrijski značajne koncentracije L-laktata i 2,3-butandiola, nužno ih je genetički modificirati. Prema literaturnim podacima, proizvodnja L-laktata i 2,3-butandiola se u kvascima može potaknuti ekspresijom odgovarajućih heterolognih gena te se dodatno može povećati pojačanom ekspresijom nekih nativnih gena i zaustavljanjem kompetitivnih metaboličkih puteva (Young Lee i sur., 2015; Kim i Hahn, 2015). Tako su u ovom radu za ekspresiju heterolognih i pojačanu ekspresiju nativnih gena konstruirani prikladni ekspresijski plazmidi s jakim promotorima i terminatorima gena izoliranih iz kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus*, dok su za zaustavljanje kompetitivnih metaboličkih puteva konstruirani plazmidi iz kojih je moguće izrezati fragmente za inaktivaciju nativnih gena kvasca *K. marxianus* klasičnim metodama genetičkog inženjerstva. Navedenim plazmidima, ili fragmentima ovih plazmida, transformirani su kvasci s ciljem konstrukcije producenata L-laktata ili 2,3-butandiola.

Za proizvodnju L-laktata konstruirana su 4 različita soja, a to su soj kvasca *S. stipitis* koji eksprimira gene *ldhL1* i *ldhL2* (kodiraju za L-laktat dehidrogenaze) iz bakterije *Lactobacillus gasserii* te tri različita soja kvasca *K. marxianus* od kojih jedan eksprimira gen *ldhL2*, drugi eksprimira gene *ldhL1* i *ldhL2*, a treći eksprimira gene *ldhL1* i *ldhL2* te ima inaktiviran gen *PDC1* (kodira za piruvat dekarboksilazu) kako bi se zaustavila alkoholna fermentacija. Za proizvodnju 2,3-butandiola konstruirano je ukupno 7 različitih sojeva, po jedan soj kvasca *S. stipitis* i *K. marxianus* koji eksprimira gene *alsS* (kodira za kodira za α -acetolaktat sintazu) i *alsD* (kodira za α -acetolaktat dekarboksilazu) te 5 sojeva kvasca *K. marxianus* koji, osim što ekspimiraju gene *alsS* i *alsD*, imaju i dodatne modifikacije. Jedan od tih 5 sojeva pojačano eksprimira nativni gen *BDH1* (kodira za 2,3-butandiol dehidrogenazu), a drugi ima inaktiviran gen *PDC1*. Genetičke modifikacije u preostala 3 konstruirana soja kvasca *K. marxianus* unesene su s ciljem smanjenja proizvodnje glicerola. Tako je u jednom soju inaktiviran gen *GPD1* (kodira za glicerol-3-fosfat dehidrogenazu), u drugom soju je eksprimiran gen *noxE* (kodira za NADH-oksidadu) iz bakterije *Lactococcus lactis*, a u trećem je inaktiviran gen *GPD1* i eksprimiran gen *noxE*.

Uzgojem konstruiranih sojeva pri različitim uvjetima istražen je utjecaj unesenih genetičkih modifikacija na proizvodnju L-laktata i 2,3-butandiola pomoću kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus*, a dobiveni rezultati pokazuju da su producenti L-laktata i 2,3-butandiola uspješno konstruirani, pri čemu najviši prinos L-laktata fermentacijom glukoze postiže soj

kvasca *K. marxianus* s eksprimiranim genima *ldhL1* i *ldhL2* te inaktiviranim genom *PDC1* ($Y_{P/S} = 0,87 \text{ g g}^{-1}$), dok najviši prinos 2,3-butandiola ostvaruje soj kvasca *K. marxianus* koji eksprimira gene *alsS* i *alsD* ($Y_{P/S} = 0,31 \text{ g g}^{-1}$).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Obnovljivi i ekološki prihvatljivi izvori energije

Obnovljivom energijom smatra se energija dobivena iz prirodnih izvora koji se obnavljaju brže nego što se troše (Rybár i sur., 2015). Njihovo iskorištavanje smanjuje ovisnost o fosilnim goriva (ugljenu, nafti i prirodnom plinu), što doprinosi smanjenju negativnih učinaka na okoliš. Najvažniji tipovi obnovljive energije su energija Sunca, energija vjetra, geotermalna energija, energija vode te energija biomase (Alrikabi, 2014).

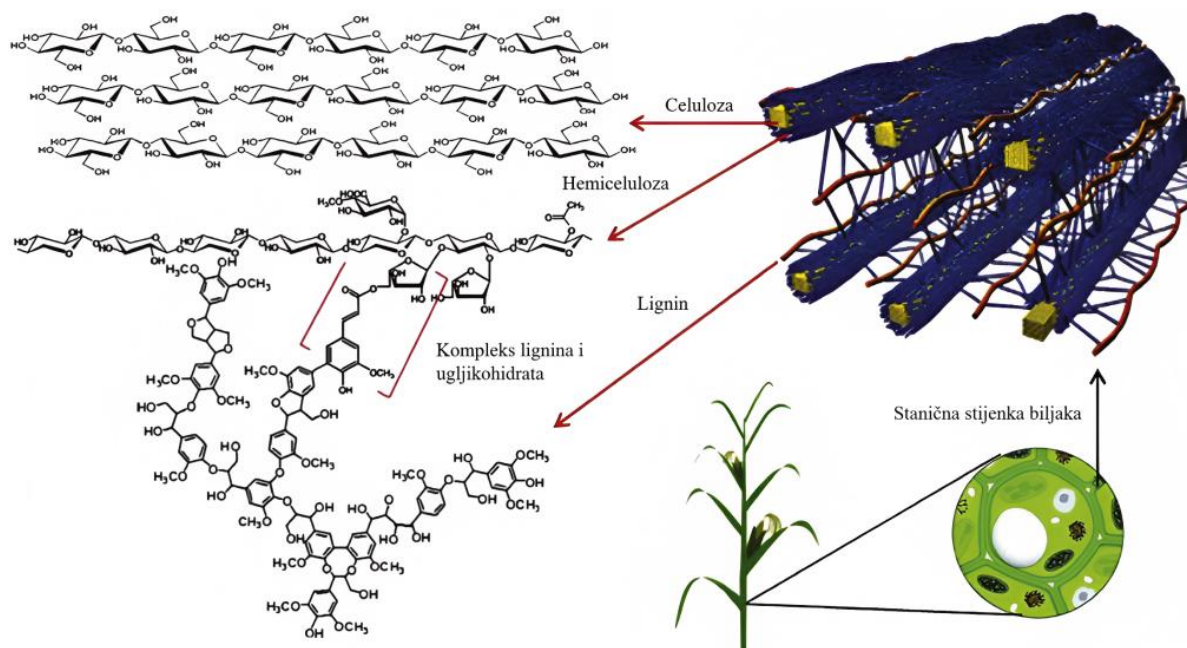
U Europskoj uniji otprilike 60 % obnovljive energije potječe upravo iz biomase koja se, osim za dobivanje energije, može koristiti i za proizvodnju hrane za ljude i životinje te za proizvodnju biomaterijala i biokemikalija (Muscat i sur., 2020). No, kapacitet planeta za proizvodnju biomase je ograničen zbog čega se suvremena civilizacija suočava s izazovom kako zadovoljiti potrebe rastućeg svjetskog stanovništva u pogledu hrane i energije, istovremeno očuvajući prirodne resurse naše planete (Muscat i sur., 2020). Održavanje ravnoteže između ove dvije potrebe postaje ključno za postizanje održive budućnosti.

2.1.1. Lignocelulozna biomasa

Biomasa predstavlja organsku materiju u kojoj je energija sunčeve svjetlosti pohranjena u obliku kemijske energije (Alrikabi, 2014). Postoje četiri glavne skupine biomase, a to su drvenaste, zeljaste, vodene biljke i životinjska gnojiva (Mckendry, 2002). Osnovna građevna jedinica biomase biljnog podrijetla je lignoceluloza (Slika 1), koju najvećim dijelom čine polimeri celuloza, hemiceluloza i lignin, a sadrži i manji udio pepela te ekstraktivnih komponenti (Volynets i sur., 2017; Yousuf i sur., 2019). Navedeni polimeri međusobno su povezani različitim kemijskim vezama što biljnu staničnu stijenku čini izrazito kompleksnom i krutom. Udio svakog pojedinog polimera značajno varira ovisno o izvoru biomase, no u prosjeku celuloza čini od 40 do 50 %, hemiceluloza od 25 do 30 %, a lignin od 15 do 20 % lignocelulozne biomase (Anu i sur., 2020).

Celuloza je najčešći i najdostupniji organski polimer na svijetu, a sastoji se od molekula glukoze povezanih β -1,4 glikozidnim vezama (Doğan i sur., 2014). Hemiceluloza je heteropolimer koji sadrži heksoze (glukozu, manozu, galaktozu i ramnozu), pentoze (ksilozu i arabinozu) i acetilirane šećere povezane β -1,4 i β -1,3 glikozidnim vezama (Yousuf i sur., 2019; Doğan i sur., 2014). Treća važna komponenta je lignin, odnosno polifenolni polimer sastavljen

najviše od p-kumaril-alkohola, koniferil-alkohola i sinapil-alkohola (Abdel-Hamid i sur., 2013).



Slika 1. Sastav i struktura lignocelulozne biomase. Detaljno objašnjenje nalazi se u tekstu. Preuzeto i prilagođeno iz Volynets i sur. (2017).

U zamjeni fosilnih goriva čistim, obnovljivim izvorima energije važnu ulogu ima tzv. bijela biotehnologija koja koristi mikroorganizme i njihove enzime za proizvodnju industrijski važnih tvari kao što su biokemikalije, biomaterijali, biogoriva i farmaceutici (Madzak, 2021). Za ekonomičnu proizvodnju velikih količina kemikalija potrebna je jeftina sirovina. No, osim što treba biti jeftina, sirovina treba biti takva da omogućava visok prinos i produktivnost, ne rezultira nastankom nusprodukata te ima nizak udio kontaminacija tako da predtretman sirovine nije zahtjevan (Savithra Krishna i sur., 2018). Upotreba rafiniranih ugljikohidrata snižava trošak pročišćavanja produkta, ali nije ekonomski isplativa. Nekad se mogu koristiti jeftinije sirovine poput škrobnih (kukuruz, krumpir, riža, pšenica), no ove sirovine se mogu koristiti i za ljudsku prehranu zbog čega je poželjno razviti procese u kojima se kao supstrati koriste ne-prehrambene sirovine (Parapouli i sur., 2020). Dakle, u svrhu proizvodnje biogoriva i biokemikalija teži se razvoju ekološki prihvatljivijih industrijskih procesa što uključuje iskorištavanje otpadne biomase pa se tako u literaturi mogu pronaći radovi u kojima se drveni otpad poput piljevine (Tulashie i sur., 2023) i poljoprivredni ostaci kao što su kukuruzni klipovi (Ping i sur., 2013) te pšenična i rižina slama (Saini i sur., 2015; Takano i Hoshino, 2018) koriste upravo u tu svrhu. Općenito gledano, razvoj održive proizvodnje treba usmjeriti ka uporabi otpadnih lignoceluloznih sirovina koje su bogate ugljikohidratima, jeftine i dostupne.

Ugljikohidrati prosječno čine oko 70 % suhe tvari lignocelulozne biomase što jasno ukazuje na njen biotehnološki potencijal (Yousuf i sur., 2020). Najzastupljeniji šećer u lignoceluloznim sirovinama je glukoza, a na drugom mjestu je najčešće ksiloza (Chaabane i Marchal, 2013). Upotreba lignoceluloznih sirovina u proizvodnji biokemikalija uglavnom uključuje predtretman sirovine, tretman enzimima, fermentaciju te procese izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija (Chen i sur., 2017).

Predtretman sirovine povećava dostupnost ugljikohidrata enzimima. Metode predobrade lignoceluloznih sirovina mogu se podijeliti u četiri skupine: fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode (Chen i sur., 2017). Prije odabira metode predobrade treba analizirati toksičnost, zbrinjavanje otpada te troškove koje svaka pojedina metoda zahtijeva (Tu i Hallett, 2019). Nakon predtretmana, slijedi enzimska hidroliza celulazama i hemicelulazama koja ugljikohidratne polimere razgrađuje do monosaharida. Za razgradnju celuloze potrebne su endoglukanaze, egzoglukanaze i β -glukozidaze, dok u razgradnji hemiceluloze sudjeluju ksilanaze, β -ksilozidaze i enzimi koji uklanjaju razgranate ugljikohidratne strukture (Puseenam i sur., 2015). Dobiveni monosaharidi se u koraku fermentacije pomoću mikroorganizama konvertiraju u željene biokemikalije koje se zatim izdvajaju i pročišćavaju do željenog stupnja čistoće.

Tijekom obrade lignoceluloznih sirovina dolazi do nastanka različitih nusproizvoda koji mogu negativno utjecati na rast mikroorganizama i fermentaciju. Ovi spojevi najčešće se dijele u tri skupine, a to su derivati furana, slabe kiseline i fenolni spojevi (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000). Derivati furana nastaju razgradnjom monosaharida dobivenih hidrolizom celuloze i hemiceluloze. Tako razgradnjom pentoza nastaje furfural (2-furaldehid), dok razgradnjom heksoza nastaje 5-hidroksimetil furfural. Ovi spojevi inhibiraju rast i fermentaciju kvasca *S. cerevisiae* (Jönsson i sur., 2013). Furan aldehidi izravno utječu na glikolitičke i fermentativne enzime kao što su glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, piruvat dehidrogenaza i alkohol dehidrogenaza (Jung i Kim, 2015). Osim toga, djeluju citotoksično na mikroorganizme, blokiraju sintezu RNA i proteina, oštećuju staničnu stijenku i DNA te induciraju nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (Jung i Kim, 2015).

Daljnjom razgradnjom derivata furana nastaju mravlja i levulinska kiselina, dok deacetilacijom hemiceluloze nastaje octena kiselina (Cunha i sur., 2019). Navedene kiseline su slabe kiseline koje u nedisociranom obliku difuzijom ulaze u stanicu gdje dolazi do disocijacije i snižavanja pH što u konačnici može uzrokovati smrt stanice. Hidrolizom lignina nastaju fenolni spojevi za koje se smatra da interakcijama s membranom uzrokuju gubitak njene

funkcije (Jung i Kim, 2015). Reprezentativan fenolni inhibitor, vanilin, ima vrlo jak inhibitorni učinak na kvasac *S. cerevisiae* (Zhao i sur., 2023).

Inhibitorni spojevi koji nastaju razgradnjom lignoceluloznih sirovina otežavaju razvoj bioprocesa u kojima se lignoceluloza koristi kao supstrat. Kako bi se to prevladalo, intenzivno se selekcioniraju i razvijaju različiti mikroorganizmi prikladniji za rast na lignoceluloznim sirovinama. Raznolikost mikroorganizama pruža mogućnosti za optimizaciju biotehnoloških procesa i bolje iskorištavanje njihovih metaboličkih potencijala. Najznačajniji industrijski mikroorganizmi su bakterije, kvasci i plijesni (Ditu i Gheorghe, 2017) među kojima se posebno ističu kvasci. Naime, zahvaljujući tome što su eukarioti, u kvascima se pojedini proteini posttranslacijski modificiraju i upućuju u sekretorni put, odnosno izlučuju van stanice (Madzak, 2021). Stoga je metodama genetičkog inženjerstva moguće konstruirati soj kvasac koji u okolinu izlučuje željeni protein, odnosno enzim.

2.2. Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji biokemikalija

Pojam "kvasac" nema taksonomsko značenje već označava grupu jednostaničnih eukariotskih mikroorganizama (Tullio, 2022). Kvasci filogenetski pripadaju koljenima *Ascomycota* i *Basidiomycota* unutar carstva *Fungi* (Kurtzman i Boekhout, 2017).

Često se pojam "kvasac" smatra sinonimom za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jer je on najpoznatiji i najčešće korišteni kvasac, a ujedno je i najistraženiji, odnosno najbolje okarakterizirani eukariot (Glick, 1996). Uz *S. cerevisiae*, tijekom povijesti intenzivno je istraživani i kvasac *Schizosaccharomyces pombe* koji se vegetativno razmnožava poprečnom diobom, a ne pupanjem, zbog čega se već dugi niz godina koristi za proučavanje staničnog ciklusa i temeljnih procesa eukariotske stanice (Hoffman i sur., 2015). Ova dva kvasca (*S. cerevisiae* i *S. pombe*) se zbog svoje široke primjene, kako u industriji, tako i u znanstvenim istraživanjima, nazivaju konvencionalnim kvascima, dok se sve ostale vrste kvasaca, njih približno 1500, smatraju nekonvencionalnim (Wolf i sur., 2012; Sibirny, 2023).

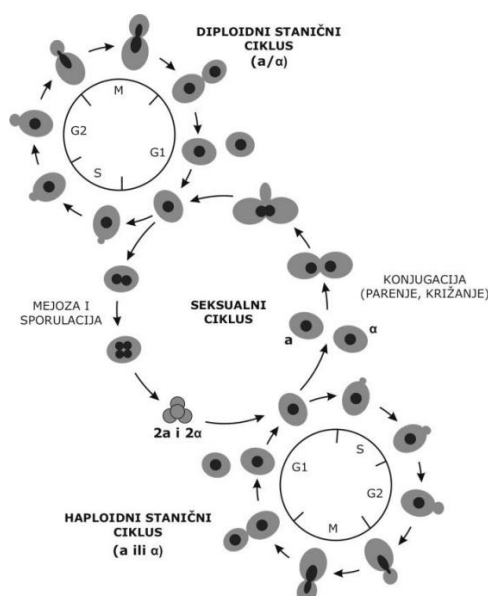
2.2.1. Životni ciklus i ciljane genetičke modifikacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* jedan je od najduže i najčešće korištenih mikroorganizama u biotehnologiji. Osim primjene u tradicionalnim biotehnološkim procesima poput proizvodnje piva, vina i kruha, koristi se i u proizvodnji biokemikalija, biogoriva i biofarmaceutika, a jedan

je od najčešće korištenih eukariota u znanstvenim istraživanjima. Genom kvasca *S. cerevisiae* prvi je potpuno sekvencioniran eukariotski genom (Engel i sur., 2014).

2.2.1.1. Životni ciklus

Haploidni genom kvasca *S. cerevisiae* velik je oko 13.000.000 parova baza, DNA u jezgri organizirana je u 16 kromosoma i sadrži oko 5.800 gena (Parapouli i sur., 2020). Ovaj kvasac može postojati u haploidnom i diploidnom obliku pri čemu se mitotički razmnožava pupanjem pa je moguće razlikovati stanicu majku i stanicu kćer (Slika 2). Diploidni i haploidni stanični ciklus povezani su seksualnom reprodukcijom jer diploidna stanica može ući u mejozu te nastaju 4 haploidne spore (dvije a - i dvije α -tipa parenja). Potom spore daju haploidne stanice koje, ako su različitog tipa parenja, mogu konjugirati te ponovno nastaje diploidna stanica (Svetec i Zgaga, 2010).



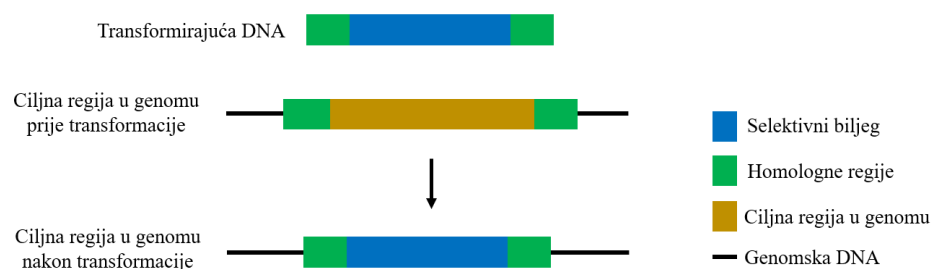
Slika 2. Životni ciklus kvasca *S. cerevisiae*. Objašnjenje slike nalazi se u tekstu. Preuzeto iz Svetec i Zgaga, 2010.

2.2.1.2. Uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija

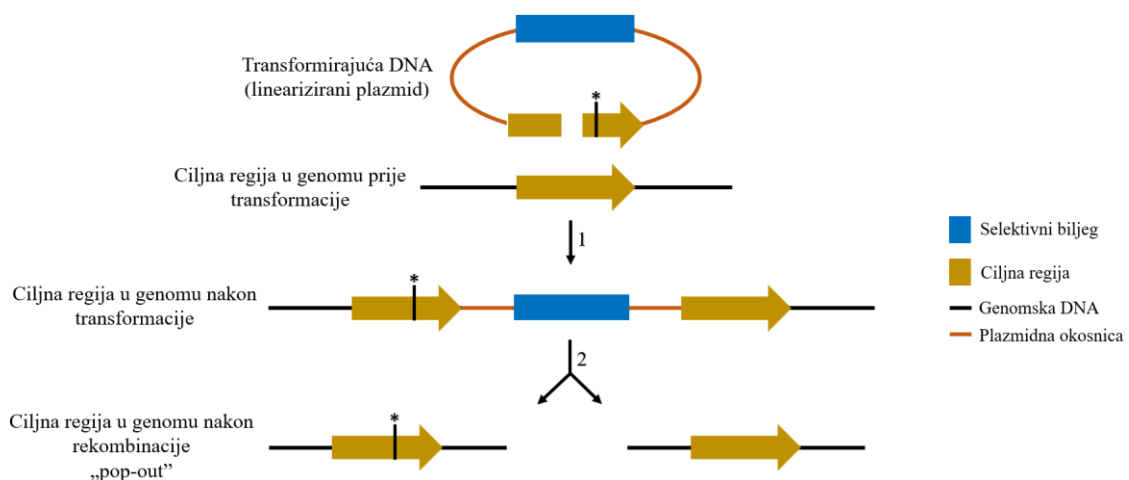
Jedna od najznačajnijih karakteristika kvasca *S. cerevisiae* za primjenu u biotehnološkim procesima je mogućnost jednostavnog i vrlo efikasnog modificiranja genoma klasičnim metodama genetičkog inženjerstva koje se osnivaju na unosu transformirajuće DNA (DNA unesena u stanicu transformacijom koja uzrokuje promjenu genotipa i fenotipa stanice) i izuzetno efikasnom popravku dvolančanog loma DNA homolognom rekombinacijom. Naime, u većini eukariotskih organizama dvolančani lom DNA (prekid oba lanca) popravljja se

nehomolognom (ilegitimnom rekombinacijom), odnosno jednostavnim spajanjem (ligacijom) krajeva DNA (*engl.* non-homologous end joining, NHEJ).

Postoje dvije strategije za ciljanu modifikaciju genoma kvasca *S. cerevisiae* klasičnim metodama genetičkog inženjerstva. Jedna se osniva na rekombinaciji „krajevi van“ (*engl.* „ends-out“) i omogućava zamjenu određenog dijela genoma s transformirajućom DNA koja, uz homologne regije, može sadržavati samo selektivni biljeg, ali i jedan ili više gena, pa čak i gene koji kodiraju za enzime uključene u cijeli jedan biosintetski put (Slika 3). Druga strategija osniva se na rekombinaciji „krajevi unutra“ (*engl.* „ends-in“) te omogućava ciljanu integraciju plazmida i uvođenje preciznih promjena u kvašćevom genomu (Slika 4). Nakon komplementarnog sparivanja s ciljnom regijom, krajevi transformirajuće DNA su kod rekombinacije krajevi van okrenuti jedan od drugoga, dok su kod rekombinacije krajevi unutra okrenuti jedan prema drugome odakle i potječu nazivi ovih tipova rekombinacija.



Slika 3. Strategija za ciljanu modifikaciju genoma kvasca *S. cerevisiae* rekombinacijom krajevi van.



Slika 4. Strategija za ciljanu modifikaciju genoma kvasca *S. cerevisiae* rekombinacijom krajevi unutra. Nakon rekombinacije krajevi van može se dogoditi rekombinacija „pop-out“ kojom se iz genoma gubi plazmidna okosnica, skupa s jednim od dva direktna ponavljanja koja su dobivena integracijom plazmida. Broj 1 uz strijelicu označava rekombinaciju krajevi van, a broj 2 uz strijelicu označava rekombinaciju „pop-out“.

I rekombinacija krajevi unutra i krajevi van između genoma i transformirajuće DNA može rezultirati i neželjenim događajima, a to su ilegitalna rekombinacija (integracija u nasumično mjesto, izvan ciljne regije u genomu), integracija tik pored ciljne regije i duplikacija ciljnog kromosoma (Svetec i sur., 2007). Također je pokazano da postojanje kratkih heterolognih sekvenci na samom kraju transformirajuće DNA i pri rekombinaciji krajevi van i krajevi unutra značajno smanjuje uspješnost integracije transformirajuće DNA, ali da gotovo svi transformanti nastaju integracijom u ciljnu (homolognu) regiju u genomu (Svetec i sur., 2007).

2.2.1.3. Nedostaci kvasca *S. cerevisiae* u industrijskoj biotehnologiji

Unatoč njegovim brojnim prednostima, kvasac *S. cerevisiae* ima i određena biotehnološka ograničenja poput hiperglikozilacije proteina, glikozilacije proteina drukčije od one u ljudskim stanicama te ograničene sposobnosti metaboliziranja različitih izvora ugljika, prvenstveno pentoza, što predstavlja problem kod fermentacijskih procesa (Stöckmann i sur., 2009). Istraživanja koja uključuju fermentaciju pentoza pomoću kvasca uglavnom su usmjerena na razvoj genetički modificiranih sojeva kvasca *S. cerevisiae* putem ekspresije heterolognih metaboličkih puteva za fermentaciju ksiloze. No, unatoč dubokom razumijevanju regulacije metabolizma glukoze, o regulaciji metabolizma ksiloze dostupno je puno manje informacija te često novokonstruirani sojevi *S. cerevisiae* fermentiraju pentoze značajno manje učinkovito nego glukozu (Cadete i Rosa, 2018). Alternativna strategija za prevladavanje nedostataka kvasca *S. cerevisiae* je identifikacija i razvoj ostalih vrsta kvasaca koji su metabolički i fiziološki prikladniji za određene biotehnološke procese.

Danas je spektar mikroorganizama koji se mogu koristiti u biotehnološkoj proizvodnji značajno proširen, a tome je uvelike doprinijelo otkriće i primjena sustava CRISPR/Cas9 (Jinek i sur., 2012) koji se već uspješno koristi za ciljanu modifikaciju genoma gotovo svih organizama (Wei i Li, 2023). Naime, uvođenje preciznih, ciljanih genetičkih modifikacija klasičnim metodama genetičkog inženjerstva osniva se na homolognoj rekombinaciji između transformirajuće DNA i genoma organizma koji se modificira, te je stoga bilo gotovo nemoguće precizno genetički modificirati organizme u kojima transformirajuća DNA ne podliježe homolognoj nego ilegitalnoj (nehomolognoj) rekombinaciji. Međutim, primjena sustava CRISPR/Cas9 osniva se na tome da se ribonukleoproteinski kompleks, zahvaljujući molekuli RNA, veže na točno određeno mjesto u genomu, te protein Cas9 uvodi dvolančani lom u molekulu DNA. Potom se dvolančani lom popravljja ilegitalnom rekombinacijom

(NHEJ) što može rezultirati pojavom mutacije. Osim toga, uz ribonukleoproteinski kompleks, u stanicu se može unijeti i DNA koja služi kao kalup za popravak dvolančanog loma pa se tako u genom mogu uvesti precizne promjene (Lau i sur., 2020). Također, na ribonukleoproteinski kompleks CRISPR/Cas9 mogu biti vezani i određeni enzimi što otvara dodatne mogućnosti (Lino i sur., 2018).

2.2.2. Nekonvencionalni kvasci

Unutar izuzetno heterogene skupine nekonvencionalnih kvasaca pojedine vrste ističu se jedinstvenim karakteristikama poput mogućnosti fermentacije pentoza, termotolerantnosti, osmotolerantnosti, halotolerantnosti, tolerancije na teške metale, 5-hidroksimetil furfural i etanol, sposobnosti rasta na metanolu i n-alkanima te sinteze riboflavina, karotenoida i lipida zbog čega nekonvencionalni kvasci postaju neizostavan dio suvremenih biotehnoloških istraživanja (Mukherjee i sur., 2017; Sibirny, 2023).

Važnu skupinu nekonvencionalnih kvasaca čine CTG kvasci specifični po tome što kodon CUG transliraju uglavnom u serin, umjesto u leucin. Ovaj alternativni genetički kod otkriven je 1995. godine u kvascu *Candida albicans* (Santos i Tuite, 1995) nakon čega je pronađen i u većini ostalih kvasaca iz roda *Candida*, ali i kod nekih vrsta iz drugih rodova (Gomes i sur., 2011; Turner i Butler, 2014). Poznato je da se kodon CUG u većini kvasaca iz roda *Candida* u 95 do 97 % slučajeva transliraju u serin te u 3 do 5 % slučajeva u leucin. Ova nekonvencionalna translacija kodona CUG generira proširenu proteinsku raznolikost koja značajno doprinosi sposobnosti prilagodbe ovih kvasaca različitim okolišnim uvjetima (Papon i sur., 2014). Pojedini kvasci iz ovog roda imaju i neke biotehnološki zanimljive karakteristike. Primjerice, kvasac *C. maltosa* ima sposobnost biokonverzije D-ksiloze u ksilitol dok kvasac *C. albicans* može degradirati neke aromatske spojeve poput fenola koji, skupa sa svojim derivatima, čini jednu od najvećih skupina okolišnih zagađivača. No, biotehnološku primjenu ovih kvasaca značajno otežava činjenica da su kvasci roda *Candida* česti humani patogeni (Uthayakumar i sur., 2020). U biotehnološkim procesima poželjno je koristiti mikroorganizme koji prema Američkoj Agenciji za hranu i lijekove (*engl.* U.S. Food and Drug Administration, FDA) imaju status GRAS (*engl.* generally recognized as safe) što znači da se smatraju bezopasnim za ljudsko zdravlje (Nevoigt, 2008).

Kvasac *Ogataea polymorpha* pogodan je za primjenu u industriji zahvaljujući GRAS statusu, a njegovoj industrijskoj primjeni doprinosi i mogućnost rasta pri 50 °C (Manfrão-Netto i sur., 2019). Ovaj kvasac uglavnom se koristi za proučavanje biogeneze i proliferacije

peroksisoma zahvaljujući sposobnosti korištenja metanola kao izvora energije i ugljika, što je povezano s procesom proliferacije peroksisoma (Irzykowska i Waskiewicz, 2014). Osim rasta na metanolu, karakterizira ga i sposobnost rasta na etanolu, eritritolu, ksilitolu i manitolu, ali i širokom spektru ugljikohidrata uključujući glukozu, saharozu, trehalozu i maltozu (Zieniuk i Fabiszewska, 2019; Gellissen i Hollenberg, 1999). Komercijalno je dostupno nekoliko biofarmaceutika proizvedenih pomoću kvasca *O. polymorpha*, primjerice cjepivo protiv hepatitisa B, hirudin i inzulin (Manfrão-Netto i sur., 2019).

I kvasac *Yarrowia lipolytica* se primarno istražuje zbog biosinteze peroksisoma, ali i intenzive sekrecije proteina (Szabo, 1999). Sojevi kvasca *Y. lipolytica* izolirani su iz različitih izvora poput morskih i hiperslanih sredina te lipidima bogatih staništa, a naziv vrste "lipolytica" potječe od sposobnosti ovog kvasca da hidrolizira lipide pomoću lipaza koje luči (Kurtzman, 2011b, Zieniuk i Fabiszewska, 2019). Metabolizam *Y. lipolytica* prikladan je za proizvodnju masnih kiselina i akumulaciju lipida. Tako su konstruirani sojevi koji proizvode velike količine oleinske kiseline, omega-6 i omega-3 masne kiseline, konjugiranu linoleinsku kiselinu te sojevi koji proizvode neobične masne kiseline poput ricinoleinske koja se može koristiti za proizvodnju biopoliestera (Péres i sur., 2014; Larroude i sur., 2018). U industriji se koristi za proizvodnju citratne, izocitratne i 2-oksoglutarne kiseline (Szabo, 1999).

Status GRAS ima i kvasac *Kluyveromyces lactis*. Navedeni kvasac ima široku primjenu u biotehnologiji, posebice u proizvodnji proteina. Tako je približno 100 heterolognih proteina uspješno proizvedeno pomoću *K. lactis*, dok se u industrijskom mjerilu pomoću ovog kvasca proizvode nativna β -galaktozidaza i rekombinantni kimozin koji se koristi u proizvodnji sira za koagulaciju kazeina u svježem mlijeku (Spohner i sur., 2016; Kumar i sur., 2010). Osim proizvodnje proteina, kvasac *K. lactis* koristi se i za komercijalnu proizvodnju laktata, D-glukonske kiseline iz D-ksiloze i D-arabitoza izravno iz sirutke, ali i za proizvodnju biofarmaceutika kao što su humani interleukin 1- β i prekursori inzulina (Spohner i sur., 2016).

Biotehnološki značajan nekonvencionalan kvasac svakako je i kvasac *Brettanomyces bruxellensis* (teleomorf *Dekkera*). Iako je najpoznatiji kao kvasac koji uzrokuje kvarenje vina, što rezultira značajnim ekonomskim gubicima u vinskoj industriji (Fugelsang, 1997), ovaj kvasac ima i neke zanimljive fiziološke karakteristike. Kvasac *B. bruxellensis* ima sposobnost fermentacije celobioze i mogućnost rasta na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina te je obećavajući kandidat za industrijsku proizvodnju bioetanola budući da proizvodi i podnosi visoke koncentracije etanola (Miklenić i sur., 2015).

Kvasac *Schwanniomyces occidentalis* poznat je po mogućnosti metaboliziranja različitih izvora ugljika kao što su ksiloza, glicerol, laktoza, inulin i celobioza (Lamers i sur., 2019). Osim toga, može rasti u prisustvu inhibitornih spojeva koji nastaju kao nusprodukti hidrolize lignoceluloznih sirovina pa tako podnosi i do $1,0 \text{ g L}^{-1}$ furfurala, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ 5-hidroksimetil furfurala i do $2,5 \text{ g L}^{-1}$ octene kiseline (Lamers i sur., 2019). Ovaj kvasac prirodno eksprimira velik broj ekstracelularnih enzima poput α -galaktozidaze, β -glukozidaze, inulinaze, invertaze, fitaze, α -amilaze i glukoamilaze (Wang i sur., 1999), a još je prije gotovo 40 godina primijećeno da su kvasci roda *Schwanniomyces* pogodni za proizvodnju heterolognih proteina s obzirom na to da *S. occidentalis* može izlučivati u podlogu proteine veličine do 155 kDa, bez hiperglikozilacije, i da ne luči ekstracelularne proteaze koje bi izlučene proteine mogle razgraditi (Ingledew, 1987; Deibel i sur., 1988). Međutim, unatoč svim navedenim karakteristikama, istraživanja koja uključuju *S. occidentalis* i ostale vrste roda *Schwanniomyces* vrlo su sporo napredovala, moguće iz razloga što ranije nije prepoznato da ovaj rod vjerojatno pripada skupini CTG kvasaca i da kao takav zahtijeva optimizaciju kodona heterolognih proteina (Matanović i sur., 2022).

Skupini CTG kvasaca pripada i kvasac *Spathaspora passalidarum* (Lima i sur., 2022). Riječ je o kvascu najpoznatijem po tome što vrlo efikasno konvertira monosaharide iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina u bioetanol, a posebno se ističe efikasnom fermentacijom ksiloze (Lima i sur., 2022). Tako ovaj kvasac fermentacijom ksiloze postiže prinos etanola od $0,41 \text{ g g}^{-1}$, dok prinos etanola koji ostvaruje fermentacijom glukoze iznosi $0,31 \text{ g g}^{-1}$ (Long i sur., 2012). U aerobnim uvjetima kvasac *S. passalidarum* simultano asimilira glukozu i ksilozu, a osim toga ima i sposobnost kofermentacije glukoze, celobioze te ksiloze koja rezultira prinosom etanola od $0,42 \text{ g g}^{-1}$ (Long i sur., 2012). Važno je istaknuti da je nemogućnost kofermentacije glukoze i ksiloze često glavni problem za ekonomičnu upotrebu lignoceluloze kao sirovine zbog čega se ovaj kvasac sve više istražuje kao radni mikroorganizam za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina.

2.2.2.1. Kvasac *Scheffersomyces stipitis*

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* poznat je i kao *Pichia stipitis* iz razloga što su vrste roda *Scheffersomyces* prvotno bile svrstane u rod *Pichia* zbog fenotipskih sličnosti. No, filogenetička analiza pokazala je da su ove vrste znatno udaljene od tipske vrste roda *Pichia*, tj. kvasca *P. membranifaciens* (Kurtzman, 2011a). Ono što ove vrste karakterizira jest formacija pseudohifa te nemogućnost korištenja nitrata (Jia i sur., 2020).

Ovaj kvasac najpoznatiji je po izraženoj sposobnosti fermentacije ksiloze (Papini i sur., 2012). Kvasac *S. stipitis* fermentacijom pentoza u etanol ostvaruje gotovo teorijski prinos etanola, uz nizak prinos ksilitola (Huang i Lefsrud, 2012). U genomu kvasca *S. stipitis* nalaze se i geni koji kodiraju za ksilanazu, manaze, celulaze i druge enzime koji mu omogućuju preživljavanje u crijevima lignikolnih insekata zbog čega je prikladan za iskorištavanje lignoceluloznih sirovina (Selim i sur., 2018). No, kako hidroliza lignoceluloznih supstrata rezultira smjesom šećera (glukozom, ksilozom, manozom, galaktozom i arabinozom) od kojih je najzastupljenija glukoza, čest problem za fermentaciju ostalih šećera, pa tako i ksiloze, jest katabolička represija glukozom. Prisustvo glukoze reprimira dva enzima ključna za metabolizam ksiloze, ksiloza reduktazu i ksilitol dehidrogenazu (Dashtban i sur., 2015). Međutim, inaktivacija gena koji kodira za heksokinazu 1 (*HXK1*) u *S. stipitis* rezultira derepresijom i omogućava fermentaciju ksiloze u prisustvu glukoze (Dashtban i sur., 2015).

Optimalna temperatura za rast kvasca *S. stipitis* je od 25 do 33 °C. Budući da je *S. stipitis* Crabtree-negativan kvasac, visoka koncentracija šećera u hranjivom mediju ne potiče fermentaciju i proizvodnju etanola, nego prelazak s oksidativnog na fermentativni metabolizam ovisi o koncentraciji otopljenog kisika u hranjivom mediju (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008). Kvasac *S. stipitis* pogodan je za proizvodnju heterolognih proteina zahvaljujući činjenici da tijekom aerobnog rasta pri visokim koncentracijama šećera ovaj kvasac ne proizvodi etanol već izvor ugljika koristi za rast biomase. Naime, poznato je da visoka koncentracija kvašćeve biomase osigurava i visok volumetrijski prinos heterolognih proteina (Hensing i sur., 1995).

Kvasac *S. stipitis* ima izrazito aktivan put pentoza fosfata što je povezano s njegovom sposobnošću asimilacije ksiloze. Ova karakteristika čini ga pogodnim za proizvodnju aromatskih spojeva zahvaljujući povećanoj dostupnosti eritroza-4-fosfata koji je prekursor puta šikiminske kiseline, a za kojeg se zna da ograničava brzinu navedenog metaboličkog puta u kvascu *S. cerevisiae*. Biotehnološku primjenu ovog kvasca otežavala je izuzetno niska učinkovitost inaktivacije gena klasičnim metodama genetičkog inženjerstva, no razvojem sustava za inaktivaciju gena baziranog na tehnologiji CRISPR/Cas efikasnost inaktivacije gena je povećana s manje od 1 % na 80 % (Cao i sur., 2018).

2.2.2.2. Kvasac *Kluyveromyces marxianus*

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* jedan je od biotehnološki najvažnijih nekonvencionalnih kvasaca. Sekvenciranjem genoma i analizom transkriptoma postignut je značajan napredak u fiziološkom i metaboličkom karakteriziranju kvasca *K. marxianus*

(Lertwattanasakul i sur., 2015), no važno je naglasiti da su potpuno sekvencirani genomi samo dva soja *K. marxianus*, a to su sojevi DMKU 3-1042 i NBRC1777. Rezultati su pokazali da je genom soja NBRC1777 dugačak 11,0 Mb i podijeljen na 8 kromosoma, anotirana su 4952 gena te su identificirane 202 tRNA i 8 rDNA (Lertwattanasakul i sur., 2015).

Kao i *S. cerevisiae*, kvasac *K. marxianus* ima respiro-fermentativni metabolizam te energiju može dobivati oksidativnom fosforilacijom preko ciklusa limunske kiseline ili alkoholnom fermentacijom (Lane i Morrissey, 2010). Iako se klasificira kao Crabtree-negativan kvasac koji metabolizam prvenstveno usmjerava prema ciklusu limunske kiseline i optimalnoj proizvodnji energije, u genomu ovog kvasca nalaze se i geni nužni za proizvodnju etanola te u određenim uvjetima provodi fermentaciju (Merico i sur., 2007).

Poznat je po izrazito brzom rastu pa tako u nutrijentima bogatom mediju može rasti i dvostruko brže nego *S. cerevisiae* (Varela i sur., 2017). Izoliran je uglavnom iz mliječnih proizvoda te ima GRAS status što ga čini prikladnim za primjenu i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Karakterizira ga sposobnost fermentacije laktoze, ali i ksiloze, ksilitola, celobioze i arabinoze, kao i sposobnost rasta na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Batt, 2014; Spohner i sur., 2016; Leonel i sur., 2021). Industrijskoj primjeni ovog kvasca doprinosi i tolerancija niskog pH te visoke temperature (Leonel i sur., 2021). Tako ovaj kvasac može rasti u hranjivom mediju pH vrijednosti 3 te pri 52 °C (Vivier i sur., 1993; Radecka i sur., 2015).

Kvasac *K. marxianus* koristi se u industrijskoj proizvodnji etanola iz sirutke ili laktoze, proizvodnji endogenih enzima (β -ksilozidaze, β -galaktozidaze, β -glukozidaze, inulinaze), heterolognu ekspresiju proteina (termostabilnih celulaza, laktat dehidrogenaza, endopoligalakturonaza i α -galaktozidaze) i proizvodnju prirodnog emulgatora (manoproteina) za primjenu u prehrambenoj industriji (Lane i Morrissey, 2010).

2.3. Proizvodnja biokemikalija

Zbog iscrpljivanja fosilnih goriva, nestabilnosti njihove cijene, ali i negativnog učinka na okoliš, razvijaju se tehnologije i procesi koji omogućavaju proizvodnju goriva, energije i kemikalija iz obnovljivih izvora energije. Poznato je da se brojne tvari koje se dobivaju kemijskom sintezom iz petrokemijskih izvora mogu proizvoditi i iz obnovljivih izvora različitim bioprocesima, što je posebno važno za one kemikalije koje se proizvode u velikim količinama, poput mliječne kiseline i 2,3-butandiola. Prema podacima iz 2018., godišnje se

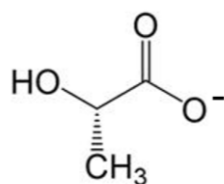
proizvede oko 270 tisuće tona mliječne kiseline i 74 tisuće tona 2,3-butandiola što ih čini industrijski vrlo važnim kemikalijama (Alexandri i sur., 2019; Lee i Seo, 2019).

2.3.1. Laktat

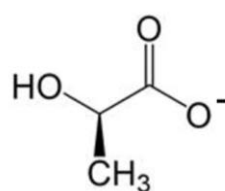
Laktat je konjugirana baza mliječne kiseline. Mliječna kiselina je slaba kiselina s pKa vrijednosti 3,86 i kemijskom formulom $C_3H_6O_3$. Ova α -hidroksikarboksilna kiselina se, kao i njene soli, često koristi u brojnim industrijama. U prehrambenoj industriji koristi se kao konzervans, sredstvo za fermentaciju i za zakiseljavanje, pojačivač okusa te dekontaminant, dok se u farmaceutskoj industriji koristi za pripravu otopina koje se primjenjuju intravenozno, kao i za pripremu mineralnih pripravaka, za izradu proteza i kirurških konaca. U kemijskoj industriji često se koristi kao pH regulator, a zahvaljujući svojoj strukturi, tj. prisustvu hidroksilne i karboksilne skupine, koristi se i za sintezu korisnih spojeva poput različitih estera i biootapala. Zahvaljujući hidratantnom i antimikrobnom djelovanju, čest je sastojak kozmetičkih proizvoda (Abd Alsaheb i sur., 2015; Savithra Krishna i sur., 2018; Castillo Martinez i sur., 2013)

Laktat postoji u formi enantiomera, tj. kao L(+)- i D(-)-laktat (Slika 5). Kada spoj postoji u formi optičkih izomera, često je jedan od izomera bezopasan, ili čak nužan za homeostazu, dok je drugi izomer toksičan. Upravo to je slučaj s laktatom gdje je L-laktat prirodni enantiomer kod ljudi, drugih viših oblika života, ali i nekih mikroorganizama, dok D-laktat nije uključen u osnovne metaboličke procese većine oblika života te kod ljudi čak može imati štetno djelovanje dovodeći do acidoze i dekalifikacije (Pohanka, 2020; Ghosh i Majumdar, 2015).

a)



b)



Slika 5. Strukturna formula D-laktata (a) i L-laktata (b).

Mliječna kiselina se može proizvesti kemijskom sintezom, primjenom enzima ili mikrobnom fermentacijom (Liu i sur., 2023). Kemijskom sintezom iz petrokemijskih sirovina nastaje racemična smjesa, a proces se uglavnom temelji na hidrolizi laktonitrila jakim kiselinama. Ukratko, u tekućoj fazi i pod visokim tlakom reakcijom acetaldehida i cijanovodika

nastaje laktonitril koji se, nakon izdvajanja i pročišćavanja destilacijom, hidrolizira sumpornom ili klorovodičnom kiselinom pri čemu nastaje mliječna kiselina. Mliječna kiselina se nakon toga esterificira metanolom te nastaje metil laktat koji se izdvaja destilacijom. Pročišćeni metil laktat konačno se hidrolizira čime se dobiva metanol i racemična smjesa mliječne kiseline (Castillo Martinez i sur., 2013). Osim toga, mliječna kiselina može se proizvesti i drugim kemijskim metodama koje uključuju degradaciju šećera, oksidaciju propilen glikola, hidrolizu kloropropionske kiseline ili oksidaciju propilena dušičnom kiselinom, ali ti procesi nisu tehnički ili ekonomski izvedivi (Castillo Martinez i sur., 2013; Rodrigues i sur., 2016).

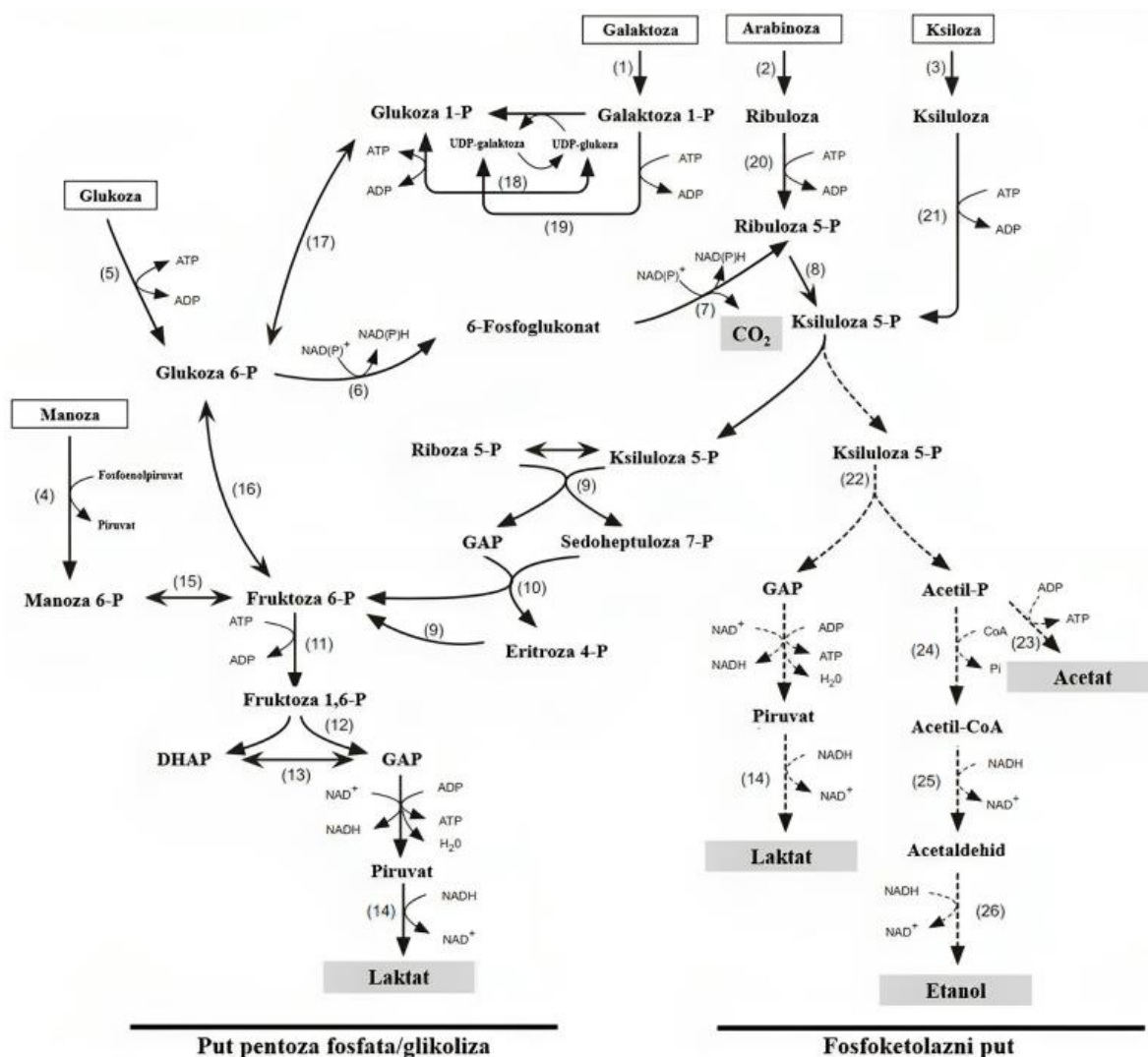
Međutim, racemična smjesa mliječne kiseline koja se dobiva kemijskom sintezom nije prikladna za prehrambenu i medicinsku primjenu zbog već navedenog štetnog djelovanja D-mliječne kiseline, a čak 70 % ukupno proizvedene mliječne kiseline iskoristi se upravo u prehrambenoj industriji (Castillo Martinez i sur., 2013). Stoga je proizvodnja optički čiste mliječne kiseline nužna radi osiguravanja sigurnosti i kvalitete u prehrambenoj i medicinskoj primjeni. Osim toga, optička čistoća ključna je prilikom polimerizacije mliječne kiseline u polilaktid, biorazgradivi polimer koji se koristi za pakiranje proizvoda (prvenstveno hrane) te za proizvodnju različitih filmova i vlakana (Wee i sur., 2006; Madhavan Nampoothiri i sur., 2010). Iako enzimska proizvodnja može rezultirati mliječnom kiselinom visoke optičke specifičnosti, sam proces tehnički je vrlo zahtjevan te se uglavnom ne koristi u industriji (Liu i sur., 2023). Mliječno-kiselinska fermentacija također može rezultirati proizvodnjom samo jednog enantiomera te je jeftinija od enzimske proizvodnje zbog čega se danas intenzivno radi na razvoju procesa baziranih na jeftinim sirovinama koji bi dodatno unaprijedili isplativost proizvodnje mliječne kiseline pomoću mikroorganizama.

2.3.1.1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću mikroorganizama

Određene vrste bakterija, gljiva, cijanobakterija i algi redukcijom piruvata pomoću laktat dehidrogenaza proizvode L- i/ili D- mliječnu kiselinu, koristeći NADH kao kofaktor (Juturu i Wu, 2016). Danas se mliječna kiselina industrijski najčešće proizvodi mliječno-kiselinskom fermentacijom koja može rezultirati proizvodnjom samo jednog enantiomera ili racemičnom smjesom, ovisno o primjenjenom mikroorganizmu. Osim toga, relativno je brza, daje visok prinos i ima niske troškove proizvodnje (Castillo Martinez i sur., 2013; Liu i sur., 2023).

2.3.1.1.1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću bakterija

Za industrijsku proizvodnju mliječne kiseline najznačajniji mikroorganizmi su bakterije, a bakterijske vrste koje su prirodni producenti mliječne kiseline mogu se podijeliti u 4 skupine: bakterije mliječne kiseline, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* i sojevi iz roda *Bacillus* (Savithra Krishna i sur., 2018). Za proizvodnju mliječne kiseline najčešće se koriste bakterije mliječne kiseline koje ju proizvode anaerobnom glikolizom, s visokim prinosom i produktivnošću. Uzimajući u obzir krajnji produkt fermentacije, dijele se na homofermentativne i heterofermentativne (Slika 6). Za komercijalnu proizvodnju mliječne kiseline koriste se homofermentativne bakterije mliječne kiseline koje Embden-Meyerhof-Parnas putem heksoze prevode isključivo u laktat (Savithra Krishna i sur., 2018). Najvažnije vrste homofermentativnih bakterija mliječne kiseline su: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus acidophilus*. Kod ovih bakterija, teorijski prinos laktata je 2 mola po molu glukoze, odnosno 1 gram po gramu supstrata. No, budući da nastaje i biomasa, eksperimentalni prinosi uglavnom su u rasponu 0,74 – 0,99 g g⁻¹ (Rodrigues i sur., 2017). Kod homofermentativnih bakterija mliječne kiseline nusprodukti poput etanola ili octene kiseline nastaju samo u određenim uvjetima, primjerice u uvjetima limitacije glukozom, tijekom rasta u prisustvu drugih šećera poput maltoze, laktoze i galaktoze te prilikom rasta pri povišenom pH ili pri niskoj temperaturi (Rodrigues i sur., 2017). Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline su primjerice bakterije *Lactobacillus bifementans* i *Lactobacillus brevis* koje laktat proizvode fosfoketolaznim putem te daju manji prinos nego homofermentativne bakterije mliječne kiseline budući da, osim laktata, stvaraju i ekvimolarne količine octene kiseline, etanola i ugljikovog dioksida. Maksimalni prinos mliječne kiseline u ovom slučaju je 1 mol mol⁻¹, odnosno 0,5 g g⁻¹ supstrata. No, prednost heterofermentativnih nad homofermentativnim bakterijama mliječne kiseline je što za rast mogu koristiti i pentoze i heksoze (Rodrigues i sur., 2017). Teorijski prinos mliječne kiseline iz pentoza putem pentoza fosfata i glikolize je također 1 g g⁻¹, odnosno 1,67 mol mol⁻¹ (Wang i sur., 2015).



Slika 6. Sažeti prikaz metaboličkih puteva proizvodnje laktata iz monosaharida kod bakterija mliječne kiseline. Strijelice s punom crtom iznačavaju reakcije puta pentoza fosfata i glikolize, a strijelice s isprekidanom crtom označavaju reakcije fosfoketolaznog puta. P – fosfat; GAP – gliceraldehid 3-fosfat; DHAP – dihidroksiaceton fosfat. Brojevima su označeni enzimi koji kataliziraju prikazane reakcije, a to su: 1 – galaktokinaza; 2 – arabinoza izomeraza; 3 – ksiloza izomeraza; 4- manozna fosfotransferazni sustav; 5 – heksokinaza; 6 – glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; 7 – 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; 8 – ribuloza 5-fosfat 3-epimeraza; 9 – transketolaza; 10 – transaldolaza; 11 – 6-fosfofruktokinaza; 12 – fruktoza-bisfosfat aldolaza; 13 – trioza-fosfat izomeraza; 14 – laktat dehidrogenaza; 15 – fosfomanoza izomeraza; 16 – fosfoglukozna izomeraza; 17 – fosfoglukomutaza; 18 – galaktoza-1-fosfat uridil transferaza; 19 – glukoziltransferaza; 20 – ribulokinaza; 21 – ksilulokinaza; 22 – fosfoketolaza; 23 – acetat kinaza; 24 – fosfotransacetilaza; 25 – aldehid dehidrogenaza; 26 – alkohol dehidrogenaza. Preuzeto i prilagođeno iz Wang i sur. (2015).

No, bakterije mliječne kiseline kao radni mikroorganizmi imaju nedostatke jer zahtijevaju kompleksne hranjive podloge budući da imaju ograničenu sposobnost sinteze B vitamina i aminokiselina, proizvode oba izomera mliječne kiseline te su podložne infekcijama bakteriofaga zbog čega su nužni aseptični uvjeti uzgoja (Rodrigues i sur., 2017). Osim toga,

mliječno-kiselinska fermentacija rezultira snižavanjem pH što inhibira njihovu metaboličku aktivnost, a sve to u konačnici snižava ekonomičnost procesa (Sauer i sur., 2010).

S obzirom na to da se mliječna kiselina proizvodi u vrlo velikim količinama, poželjno je da su troškovi njene proizvodnje niski. Procjenjuje se da je više od 60 % ukupnih troškova mikrobne proizvodnje mliječne kiseline povezano s troškovima upotrebljene sirovine zbog čega je upravo izbor supstrata izuzetno važan (Guo i sur., 2010). Glukoza, saharoza i laktoza kao izvori ugljika za mliječno-kiselinsku fermentaciju su preskupi, a kao jeftinija alternativa rafiniranim šećerima može se koristiti melasa. No, lignocelulozni supstrati dobiveni iz poljoprivrednih ostataka i drvne industrije zadovoljavaju uvjete potrebne za proizvodnju mliječne kiseline te su još jeftiniji i dostupniji (Rodrigues i sur., 2017). Za razvoj održive proizvodnje mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina, najveći problem je potreba za predtretmanom te nedostatak hidrolitičkih enzima kod sojeva koji se koriste za proizvodnju mliječne kiseline. Također, kod uporabe lignoceluloznih sirovina poželjno je koristiti mikroorganizam koji može iskorištavati sve prisutne monosaharide, i heksoze i pentoze, što homofermentativne bakterije mliječne kiseline ne mogu (Rodrigues i sur., 2017). Zbog svega navedenog, istražuju se alternativni mikrobni sustavi za proizvodnju mliječne kiseline.

2.3.1.1.2. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću kvasaca

Kvasac *S. cerevisiae* posjeduje određene povoljne karakteristike zbog kojih su brojni autori istraživali njegov potencijal za proizvodnju mliječne kiseline (Tablica 1). Posebno je važno istaknuti da *S. cerevisiae* može tolerirati nizak pH, niži nego bakterije mliječne kiseline (Sauer i sur., 2010;). Za industrijsku proizvodnju vrlo je bitno dobivanje slobodne mliječne kiseline kao krajnjeg produkta fermentacije, a za uspješno izoliranje slobodne mliječne kiseline iz fermentirane podloge, potrebno je održavati nisku pH vrijednost, značajno nižu od pKa vrijednosti mliječne kiseline. Iz tog razloga je tolerancija kiselih uvjeta jedan od ključnih benefita upotrebe *S. cerevisiae* u proizvodnji mliječne kiseline (Sauer i sur., 2010).

Iako kvasac *S. cerevisiae* prirodno ne proizvodi mliječnu kiselinu, metaboličkim inženjerstvom moguće je postići konverziju piruvata u laktat i kod ovog kvasca. Tako su Dequin i Barre (1994) konstruirali soj kvasca *S. cerevisiae* koji eksprimira gen iz bakterije *L. casei* koji kodira za L-LDH (L-laktat dehidrogenazu). Konstruirani soj istovremeno je proizvodio etanol i laktat, pri čemu je svega 20 % glukoze prevodio u L-laktat. Budući da *S. cerevisiae* prirodno velik udio piruvata prevodi u etanol, a proizvodnja laktata ovisi o dostupnosti piruvata, za povećanje prinosa laktata prilikom rasta *S. cerevisiae* na glukozu kao izvoru ugljika

potrebno je zaustaviti alkoholnu fermentaciju. To se postiže inaktivacijom gena koji kodiraju za piruvat dekarboksilazu, a kvasac *S. cerevisiae* ima tri takva gena (geni *PDC1*, *PDC5* i *PDC6*). Inaktivacija gena *PDC5* ili *PDC6* u ovom kvascu nema utjecaja na aktivnost piruvat dekarboksilaze. Za smanjenje aktivnosti piruvat dekarboksilaze u kvascu *S. cerevisiae* potrebno je inaktivirati gen *PDC1*, dok je za potpuno uklanjanje aktivnosti piruvat dekarboksilaze potrebno inaktivirati gene *PDC1* i *PDC5*. Međutim, sojevi kvasca *S. cerevisiae* bez aktivnosti piruvat karboksilaze vrlo sporo rastu na glukozu što otežava njihovu biotehnološku primjenu (Hohmann, 1991).

Budući da se etanolnom fermentacijom regenerira NAD^+ , uvođenjem alternativnog puta za regeneraciju koenzima u mutantima s inaktiviranim genima *PDC* teoretski se može postići normalan rast stanica. S obzirom na to da laktat dehidrogenaze redukcijom piruvata u stanici regeneriraju koenzim NAD^+ , u soju kvasca *S. cerevisiae* s inaktiviranim genima *PDC1*, *PDC5* i *PDC6* eksprimiran je goveđi gen koji kodira za L-LDH te je ovaj soj rastao brže i proizvodio do 20 g L^{-1} laktata s produktivnošću od 11 g (Lh)^{-1} (Porro i sur., 1995). Vrlo slične rezultate dobili su i Adachi i sur. (1998) koji su u *S. cerevisiae* eksprimirali goveđi gen *LDH* pod regulacijom nativnog kvašćevog promotora gena *ADH1*. Uspoređivali su rezultate dobivene fermentacijom glukoze pomoću soja *S. cerevisiae* s aktivnim genom *PDC1* i soja s inaktiviranim genom *PDC1* te su primijetili da inaktivacija gena *PDC1* u soju s eksprimiranim genom *LDH* dovodi do povećanja prinosa laktata s $0,16$ na $0,20 \text{ g g}^{-1}$ i smanjenja prinosa etanola s $0,35$ na $0,2 \text{ g g}^{-1}$. Sedam godina kasnije Ishida i sur. (2005) konstruirali su soj *S. cerevisiae* u kojem je otvoreni okvir čitanja gena *PDC1* zamijenjen otvorenim okvirom čitanja goveđeg gena *LDH*. Na ovaj način je otvoreni okvir čitanja gena *LDH* smješten pod regulaciju promotora *PDC1* koji je snažno induciran glukozom te je postignut prinos laktata od $0,65 \text{ g g}^{-1}$ glukoze.

Osim inaktivacije gena koji kodiraju za piruvat dekarboksilaze, etanolnu fermentaciju moguće je zaustaviti i inaktivacijom gena koji kodiraju za alkohol dehidrogenaze. kvasac *S. cerevisiae* ima pet takvih gena, no produkt gena *ADH1* ima glavnu ulogu u prevođenju acetaldehida u etanol (Skory, 2003). Stoga je u soju *S. cerevisiae* s inaktivnim genom *ADH1* ispitan utjecaj ekspresije gena koji kodira za L-LDH u plijesni *R. oryzae*. U navedenom soju značajno je smanjena proizvodnja etanola, međutim zabilježen je porast proizvodnje glicerola (otprilike $0,39 \text{ g glicerola po g utrošene glukoze}$), ostvareni prinos mliječne kiseline nije bio zadovoljavajući te je soj sporo rastao na podlozi s glukozom (Skory, 2003). Gledajući prinos laktata, zaključeno je da ekspresija laktat dehidrogenaza iz filamentozne gljive (*R. oryzae*) ne donosi nikakve prednosti u usporedbi s ekspresijom bakterijskih i goveđih laktat dehidrogenaza

u *S. cerevisiae* (Tablica 1). U soju kvasca *S. cerevisiae* s eksprimiranom L-LDH iz plijesni *R. oryzae* porast proizvodnje glicerola sugerira da aktivnost ove L-LDH nije dovoljna za zadovoljavanje staničnih potreba za NAD^+ te da stanica pojačanom redukcijom dihidroksiaceton fosfata u glicerol-3-fosfat osigurava dodatnu količinu potrebnog koenzima, dok je mogući uzrok poremećaja rasta ovog soja nakupljanje acetaldehida u toksičnim koncentracijama. Stoga su Tokuhira i sur. (2009) u kvascu *S. cerevisiae*, uz inaktivaciju gena *ADH1*, inaktivirali i gen *PDC1* kako bi spriječili nakupljanje acetaldehida u stanicama. U genomu kvasca *S. cerevisiae* geni *PDC1* i *ADH1* zamijenjeni su genom koji kodira za goveđu L-LDH što je dovelo do porasta prinosa laktata, a soj je mogao rasti na glukozu. Rast i fermentacija bili su usporedivi s karakteristikama soja koji ima inaktiviran samo gen *PDC1*.

Young Lee i sur. (2015) konstruirali su još kompleksniji soj kvasca *S. cerevisiae* u kojem su zaustavljeni kompetitivni metabolički putevi (za proizvodnju etanola i glicerola) te su eksprimirane heterologne L-LDH. Proizvodnja etanola zaustavljena je inaktivacijom gena *PDC1*, a proizvodnja glicerola inaktivacijom gena *GPD1*. Kako bi se povećala dostupnost kofaktora NADH, iz genoma su uklonjeni geni *NDE1* i *NDE2* koji kodiraju za citosolne NADH dehidrogenaze, a kako bi se spriječila razgradnja L-laktata, deletiran je gen *CYB2* koji kodira za L-laktat citokrom-c oksidoreduktazu. Ovako konstruiran soj je šaržnim uzgojem s pritokom supstrata imao prinos laktata $0,58 \text{ g g}^{-1}$ glukoze.

No, najviši prinos laktata postignut fermentacijom glukoze pomoću rekombinantnog kvasca *S. cerevisiae* zabilježili su Valli i sur. (2006). U navedenom radu, soj s inaktiviranim genima *PDC* koji eksprimira više kopija gena koji kodira za L-LDH u *L. plantarum* podvrgnut je UV mutagenezi nakon čega je preživjelim stanicama mjeren intracelularni pH. S obzirom na to da niski pH uzrokuje stanični stres, za proizvodnju L-laktata odabrane su one stanice s visokom intracelularnom vrijednosti pH. Najbolji ispitani mutant je u 70 h uzgoja potrošio 75 g L^{-1} glukoze te je proizveo 70 g L^{-1} laktata čime je ostvaren prinos laktata od $0,93 \text{ g g}^{-1}$.

Tablica 1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću rekombinantnih sojeva kvasca *S. cerevisiae*.

Relevantni genotip	L-LDH	Prinos laktata iz D-glukoze (g g ⁻¹)	Tip uzgoja	Literaturni navod
divlji tip	<i>L. casei</i> (plazmid)	0,20	Uzgoj u tikvici na tresilici	Dequin i Barre, 1994
<i>Δpdc1 Δpdc5</i> <i>Δpdc6</i>	<i>B. taurus</i> (integrirano, 1 kopija)	0,20	Šaržni uzgoj s pritokom supstrata	Porro i sur., 1995
<i>Δpdc1</i>	<i>B. taurus</i> (plazmid)	0,20	Šaržni uzgoj	Adachi i sur., 1998
divlji tip	<i>L. plantarum</i> (integrirano, 1 kopija)	0,30	Šaržni uzgoj	Colombié i sur., 2003
<i>Δadh1</i>	<i>R. oryzae</i> (plazmid)	0,45	Šaržni uzgoj	Skory i sur., 2003
<i>Δpdc1</i>	<i>B. taurus</i> (integrirano, 2 kopije)	0,65	Šaržni uzgoj	Ishida i sur., 2005
<i>Δpdc1</i>	<i>B. taurus</i> (integrirano, 6 kopija)	0,61	Šaržni uzgoj	Saitoh i sur., 2005
<i>Δpdc1 Δpdc5</i> <i>Δpdc6</i>	<i>L. plantarum</i> (plazmid)	0,93	Uzgoj u tikvici na tresilici	Valli i sur., 2006
<i>Δpdc1 Δadh1</i>	<i>B. taurus</i> (integrirano, 2 kopije)	0,75	Uzgoj u tikvici na tresilici	Tokuhiro i sur., 2009
<i>Δpdc1 Δgpd1</i> <i>Δcyb2 Δnde1</i> <i>Δnde2</i>	<i>P. sinensis</i> (integrirano, 5 kopija)	0,58	Šaržni uzgoj s pritokom supstrata	Young Lee i sur., 2015

Osim *S. cerevisiae*, za proizvodnju mliječne kiseline istražuju se i drugi kvasci. Uglavnom je riječ o vrstama koje imaju određena povoljna svojstva za proizvodnju mliječne

kiseline, poput dobre tolerancije na kiseline ili sposobnosti metaboliziranja ugljikohidrata koje *S. cerevisiae* prirodno ne može metabolizirati (Ilmén i sur., 2013).

2.3.1.1.2.1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću nekonvencionalnih kvasaca

Prvi nekonvencionalni kvasac modificiran s ciljem proizvodnje laktata bio je kvasac *K. lactis*. Divlji tip ovog kvasca ne proizvodi laktat zbog čega je konstruiran soj s inaktiviranim genom *PDC1* te eksprimiranim goveđim genom *LDH* čija je ekspresija bila regulirana jakim nativnim promotorom gena *PDC1* (Porro i sur., 1999). Konstruirani soj uzgajan je u aerobnim uvjetima, a maksimalni ostvareni prinos laktata bio je oko 0,60 g g⁻¹ glukoze. Budući da u aerobnim uvjetima *K. lactis* proizvodi samo niske koncentracije etanola, piruvat je zapravo najvećim dijelom usmjeren u ciklus limunske kiseline preko kompleksa piruvat dehidrogenaze. Delecijom gena koji kodira za E1 α podjedinicu kompleksa piruvat dehidrogenaze značajno je poboljšana proizvodnja laktata tako da je kod soja bez aktivnosti piruvat dekarboksilaze i piruvat dehidrogenaze zabilježen prinos laktata od 0,85 g g⁻¹ glukoze (Bianchi i sur., 2001).

Još jedan primjer nekonvencionalnog kvasca iz roda *Kluyveromyces* s potencijalom za proizvodnju L-laktata je genetički modificirani soj kvasca *K. marxianus*. Kao i kvasac *K. lactis*, ni *K. marxianus* prirodno ne proizvodi laktat (Porro i sur., 1999; Lee i sur., 2017). Stoga je konstruiran soj u kojem su koeksprimirana dva gena koji kodiraju za heterologne L-LDH. Heterologni geni potječu iz bakterija *S. epidermidis* i *L. acidophilus*, a njihova ekspresija u *K. marxianus* je u podlozi s glukozom rezultirala proizvodnjom L-laktata masene koncentracije 16 g L⁻¹. Dodatkom CaCO₃ u podlogu, proizvodnja L-laktata povećana je na 24 g L⁻¹, uz iskorištenje od 0,48 g g⁻¹ glukoze (Lee i sur., 2017). Također, metaboličkim inženjerstvom konstruiran je soj *K. marxianus* koji može proizvoditi mliječnu kiselinu izravno iz praha Jeruzalemske artičoke, neprehrambene biljke koja se lako uzgaja i bogata je inulinom (Sabra i sur., 2011; Bae i sur., 2018). Zahvaljujući činjenici da *K. marxianus* luči inulinazu, predtretman sirovine nije bio potreban. U spomenutom soju eksprimirani su geni izolirani iz *L. plantarum* koji kodiraju za L- i D-LDH, inaktivacijom gena *PDC1* zaustavljena je alkoholna fermentacija, a inaktivacijom gena čiji produkti provode oksidaciju laktata do piruvata (geni *CYB2* i *DLD1*), dodatno je povećana proizvodnja mliječne kiseline. Ovako konstruiran soj proizvodio je 130 g L⁻¹ L-mliječne kiseline i 122 g L⁻¹ D-mliječne kiseline direktnom fermentacijom 230 g L⁻¹ praha Jeruzalemske artičoke koji sadrži 140 g L⁻¹ inulina. Treba naglasiti da je, za razliku od kvasca *S. cerevisiae* gdje su pronađena tri gena, u kvascima *K. marxianus* i *K. lactis* detektiran samo jedan gen koji kodira za piruvat dekarboksilazu, gen *PDC1*, te da je za zaustavljanje

alkoholne fermentacije dovoljno inaktivirati navedeni gen. Također, zaustavljanje alkoholne fermentacije kod ovih kvasaca ne utječe negativno na rast kao kod kvasca *S. cerevisiae* (Bae i sur., 2018; Porro i sur., 1999).

Kong i sur. (2019) su u kvascu *K. marxianus* (NBRC1777) evaluirali 6 različitih gena koji kodiraju za L-LDH, a koji su izolirani iz čovjeka (*HsLDH*), *B. subtilis* (*BsLDH*), *B. megaterium* (*BmLDH*), *L. lactis* (*LlLDH*), *P. falciparum* (*PfLDH*) i *R. oryzae* (*RoLDH*), no za daljnju konstrukciju sojeva odabrali su gene *PfLDH* i *BmLDH* budući da je njihova ekspresija rezultirala najvišim prinosom L-laktata. Spomenuti autori konstruirali su soj kvasca *K. marxianus* u kojem su eksprimirali heterologne gene *PfLDH*, *BmLDH* i *ScJEN1*, pojačano eksprimirali nativni gen *KmPFK* te inaktivirali gen *KmDLD1*. Kako bi se povećala akumulacija L-laktata, eksprimirani su geni *ScJEN1* (kodira za monokarboksilatni protein prijenosnik u kvascu *S. cerevisiae*) i *KmPFK* (kodira za 6-fosfofruktokinazu u kvascu *K. marxianus*). Produkt gena *DLD1* (D-laktat dehidrogenaza) katalizira reverzibilnu reakciju oksidacije D-laktata u piruvat te je u ranijim istraživanjima uglavnom bio inaktiviran kako bi se smanjila potrošnja produkta prilikom proizvodnje D-laktata. Međutim, u ovom je istraživanju gen *KmDLD1* inaktiviran s ciljem povećanja optičke čistoće L-laktata i sprječavanja potrošnje piruvata reverznom reakcijom. Kao rezultat inaktivacije, povećana je proizvodnja L-laktata, ali je optička čistoća ostala ista. Važno je naglasiti da je gen *KmDLD1* detektiran bioinformatičkom analizom te da nema dostupnih eksperimentalnih podataka o katalitičkoj aktivnosti produkta ovog gena. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata, primjenom procesa simultane saharifikacije i kofermentacije pri 42 °C, konstruirani soj proizveo je 103 g L⁻¹ L-laktata iz 180 g L⁻¹ prethodno obrađenog klipa kukuruza kao sirovine, uz optičku čistoću od 99,5 % (Kong i sur., 2019).

U soju *Candida boidinii* genotipa *Apdc1* eksprimirana je goveđa L-LDH s ciljem proizvodnje L-laktata. Fermentacijom glukoze pomoću ovog soja ostvaren je prinos L-laktata od čak 0,96 g g⁻¹. Prilikom uzgoja genetički modificiranog kvasca *C. boidinii*, ispitana su i tri različita neutralizacijska sredstva, CaCO₃, KOH i NaOH te je najviši prinos laktata dobiven primjenom CaCO₃ (Osawa i sur., 2009). Sličan prinos L-laktata postignut je i pomoću drugih genetički modificiranih kvasaca istog roda. U uvjetima neutralizacije pomoću CaCO₃, soj kvasca *Candida sonorensis* s inaktiviranim genom *PDC1* i eksprimiranom L-LDH izoliranom iz *L. helveticus* proizvodio je 93 g L⁻¹ laktata s prinosom od 0,94 g g⁻¹ glukoze (Ilmén i sur., 2013), dok je kvasac *Candida utilis* s inaktiviranim genom *PDC1* i eksprimiranom goveđom L-LDH proizvodio 103,3 g L⁻¹ L-laktata s prinosom od 0,95 g g⁻¹ glukoze (Ikushima i sur., 2009).

Ilmén i sur. (2007) konstruirali su soj kvasca *S. stipitis* u kojem je eksprimiran gen koji kodira za L-LDH izoliran iz *L. helveticus*, pod regulacijom promotora gena *ADH1* iz *S. stipitis*. Prilikom uzgoja na glukozi, novokonstruirani soj je iz 94 g L⁻¹ glukoze proizvodio 41 g L⁻¹ laktata, a uzgojem na ksilozi je iz 100 g L⁻¹ ksiloze proizvodio 58 g L⁻¹ laktata.

Kvasac *Pichia pastoris* razvija se kao potencijalni producent različitih biokemikalija. Tako je konstruiran soj kvasca *P. pastoris* koji eksprimira D-LDH iz *L. pseudomesenteroides* s ciljem proizvodnje optički čistog D-laktata. No, kako niska tolerancija D-laktata često sprječava njegovu efikasnu proizvodnju, u ovom soju eksprimiran je i gen za flokulaciju *FLO1* iz *S. cerevisiae* te je pokazano da flokulacija poboljšava toleranciju stanice na D-laktat i pozitivno utječe na njegovu proizvodnju dovodeći do 2,6 puta veće proizvodnje D-laktata nego kod soja koji ne eksprimira gen *FLO1*. Važnu ulogu u toleranciji mliječne kiseline u *S. cerevisiae* ima i metabolizam željeza. Primijećeno je da u stresnim uvjetima uzrokovanim mliječnom kiselinom dolazi do promjene ekspresije gena povezanih s metabolizmom željeza i, iako nije posve jasno što je uzrok promjene, pretpostavlja se da ima veze sa mogućnošću željeza da kelira i neutralizira laktat. Stoga je u spomenutom soju *P. pastoris*, producentu D-laktata, pojačano eksprimirana nativna željezo reduktaza čime je postignut prinos od 0,33 g g⁻¹ glukoze što je najveći zabilježeni prinos D-laktata u ovom kvascu (Sae-Tang i sur., 2023).

2.3.2. 2,3-butandiol

Dioli su industrijski važne kemikalije koje sadrže dvije hidroksilne grupe. Pomoću mikroorganizama moguće je proizvesti četiri diola, a to su: 1,2-propandiol, 1,3-propandiol, 1,4-butandiol i 2,3-butandiol. Navedeni dioli smatraju se zelenim platformskim kemikalijama, odnosno osnovnim kemikalijama koje se koriste kao polazni spojevi za proizvodnju brojnih kemijskih proizvoda na bazi ugljika (Zeng i Sabra, 2011; Luterbacher i sur., 2014).

2,3-butandiol je alkohol kemijske formule C₄H₁₀O₂ i molekulske mase 90,212 g mol⁻¹, poznat i kao 2,3-butilen glikol, 2,3-dihidroksibutan te dimetilen glikol. Ovaj spoj izrazito je higroskopan, slatkastog okusa, bez boje i mirisa te je topiv u vodi (Gräfe i sur., 2019). Budući da ima dva kiralna centra, postoji u formi tri izomera. To su optički inaktivni izomer (R,S)-2,3-butandiol ili mezo-2,3-butandiol te dva optički aktivna izomera, (2R,3R)-2,3-butandiol i (2S,3S)-2,3-butandiol (Ji i sur., 2011). Vrelišta ova tri izomera se razlikuju i variraju od 177 do 182 °C (Celińska i Grajek, 2009). Zbog niske točke leđišta (oko -60 °C), 2,3-butandiol se koristi i kao sredstvo protiv zamrzavanja te kao krioprotektant (Sabra i sur., 2011).

Visoka ogrijevna vrijednost 2,3-butandiola i sposobnost povećanja oktanskog broja goriva čine ga perspektivnim "drop-in" gorivom, odnosno gorivom koje se može koristiti kao zamjena za fosilna goriva bez potrebe za skupim modifikacijama motora (Białkowska, 2016; Kargbo i sur., 2021). Ogrijevna vrijednost 2,3-butandiola viša je od ogrijevne vrijednosti metanola i nešto niža od ogrijevne vrijednosti etanola (Magee i Kosaric, 1987). Osim toga, 2,3-butandiol dehidracijom daje metil etil keton koji se može koristiti kao tekući dodatak gorivu, ali i kao otapalo za smole i lakove (Celińska i Grajek, 2009; Magee i Kosaric, 1987). Služi i kao prekursor za proizvodnju 1,3-butadiena koji se koristi u proizvodnji sintetičke gume (Syu, 2001). Esterifikacijom 2,3-butandiola nastaju prekursori poliuretana koji se koriste u proizvodnji lijekova i kozmetičkih proizvoda (Syu, 2001).

Iako velik broj mikroorganizama prirodno proizvodi 2,3-butandiol, njegova biološka uloga nije potpuno jasna. Smatra se da proizvodnja diola ima ulogu u sprječavanju zakiseljavanja na način da se piruvat, umjesto u kiseline, prevodi u neutralan spoj. Moguće je i da služi kao spremište ugljika i energije budući da je zabilježena potrošnja 2,3-butandiola u uvjetima kad nisu dostupni drugi izvori ugljika i energije, a sudjeluje i u regulaciji omjera NAD^+/NADH (Sabra i sur., 2011; Xiao i Xu, 2007). Međutim, u nekim se bakterijama prilikom proizvodnje stereoizomera 2,3-butandiola kao koenzim koristi NADPH, a ne NADH koji obično sudjeluje u kataboličkim reakcijama. Ovo sugerira da ti procesi možda imaju i nepoznatu metaboličku svrhu (Sabra i sur., 2011).

Trenutno se 2,3-butandiol u komercijalne svrhe proizvodi kemijskom sintezom iz petrokemijskih sirovina, unatoč tome što od 1980-ih postoji izraženiji interes za razvojem proizvodnje iz obnovljive biomase. Dobivanje optički čistih izomera, ili njihovo razdvajanje, predstavlja izrazito skupi korak kemijske sinteze zbog čega upotreba enzima ili stanica u sintezi spojeva visoke enantiomerne čistoće predstavlja alternativni i učinkoviti pristup. Iako mikroba proizvodnja 2,3-butandiola još nije ekonomski isplativa, razvoj industrijske biotehnologije stvara nove prilike za proizvodnju brojnih kemikalija (Sabra i sur., 2011).

2.3.2.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću mikroorganizama

Počeci istraživanja mikrobne proizvodnje 2,3-butandiola sežu još u 1906. godinu kada su Harden i Walpol objavili rad o proizvodnji 2,3-butandiola pomoću bakterije *Klebsiella pneumoniae* (prije poznata kao *Aerobacter aerogenes*) (Magee i Kosaric, 1987). U komercijalnu upotrebu 2,3-butandiol je ušao tijekom Drugog svjetskog rata kada se povećala potreba za sintetičkom gumom te se tada proizvodio biotehnoškim procesom. No, pedesetih

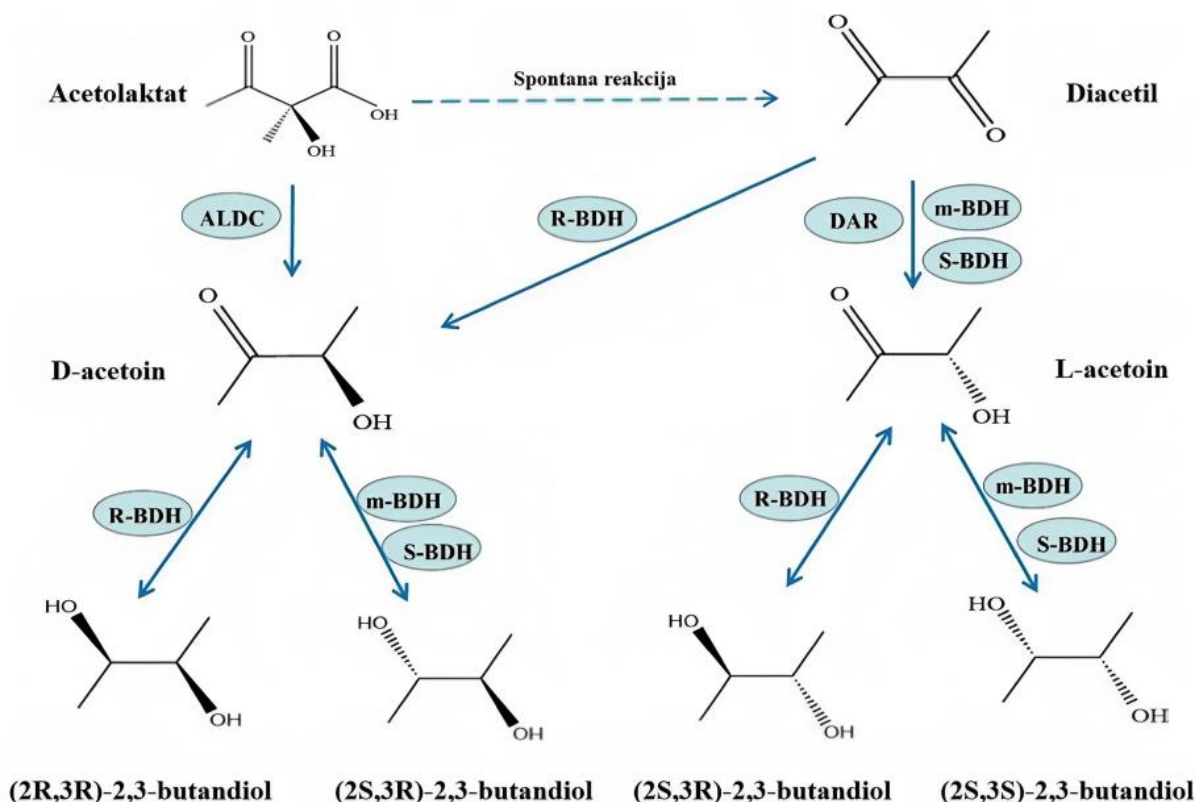
godina prošlog stoljeća biotehnološki proces zamijenjen je kemijskom sintezom zbog niske cijene nafte (Zeng i Sabra, 2011). Ipak, temeljna istraživanja fiziologije i biokemije mikroorganizama producenata 2,3-butandiola su se nastavila (Maddox, 1996).

Nakon rasta cijena nafte 1970-ih ponovno se javio interes za proizvodnjom kemikalija i goriva iz obnovljivih izvora, što je uključivalo i 2,3-butandiol (Maddox, 1996). U usporedbi s drugim, dobro istraženim bioprocima, poput proizvodnje etanola, acetona i 1,3-propandiola, mikrobna proizvodnja 2,3-butandiola ima zanimljivu prednost, a to je puno manja toksičnost produkta za mikroorganizme producente, što omogućava postizanje viših koncentracija produkta. Različite vrste kvasaca, algi i bakterija poznate su po akumulaciji relevantnih količina 2,3-butandiola. No, kvasci i alge uglavnom daju niže prinose nego bakterije zbog čega su upravo određene bakterijske vrste najznačajniji producenti 2,3-butandiola (Sabra i sur., 2011).

2.3.2.1.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću bakterija

Bakterije 2,3-butandiol proizvode biokemijskim putem mješovite kiselinske fermentacije prilikom uzgoja u anaerobnim ili mikroaerobnim uvjetima, pri čemu uz 2,3-butandiol nastaju i drugi spojevi kao što su etanol, acetat, laktat, format i sukcinat, ovisno o mikroorganizmu i primijenjenim uvjetima uzgoja (Zeng i Sabra, 2011). Velik broj biokemijskih studija proizvodnje 2,3-butandiola proveden je na vrstama iz porodice *Enterobacteriaceae* kod kojih je pokazano da konverziju piruvata u 2,3-butandiol omogućavaju proteinski produkti gena koji kodiraju za α -acetolaktat sintazu, α -acetolaktat dekarboksilazu te 2,3-butandiol dehidrogenazu (poznata i kao acetoin reduktaza), a koji su organizirani u operon (Maddox, 1996). Enzim α -acetolaktat sintaza katalizira reakciju kondenzacije dviju molekula piruvata, uz jednostruku dekarboksilaciju, čime nastaje acetolaktat. Nakon toga, enzim α -acetolaktat dekarboksilaza katalizira dekarboksilaciju acetolaktata i nastanak acetoina. Zadnji korak konverzije uključuje enzim 2,3-butandiol dehidrogenazu koja katalizira reverzibilnu redukciju acetoina u 2,3-butandiol (Maddox, 1996). Dakle, prema teorijskim proračunima, prinos 2,3-butandiola iz heksoza iznosi $0,5 \text{ g g}^{-1}$ (Bai i sur., 2023). Teorijski prinos 2,3-butandiola iz pentoza isti je kao i kod heksoza budući da se proizvodnja 2,3-butandiola iz pentoza odvija preko puta pentoza fosfata. U ovim reakcijama nema gubitka ugljika te se, u smislu stehiometrije i energije, proizvodnja 2,3-butandiola iz pentoza smatra ekvivalentnom proizvodnji iz heksoza (Jansen i sur., 1984).

Nešto starija istraživanja dovela su do zaključka da je kod bakterija sav acetoin koji nastaje iz piruvata D-acetoin i da nastanak stereoizomera 2,3-butandiola ovisi o 2,3-butandiol dehidrogenazi koja je stereospecifična za 2,3-butandiol (Li i sur., 2023). No, razvojem molekularne biotehnologije, koja je omogućila ekspresiju i inaktivaciju ciljanih gena, postupno je razjašnjeno da je postojanje više 2,3-butandiol dehidrogenaza u mikroorganizmima glavni razlog nastanka različitih izomera acetoina i 2,3-butandiola (Slika 7). Primjerice, kada je u *B. subtilis* inaktiviran gen *bdhA* koji kodira za (2R,3R)-butandiol dehidrogenazu, primjećeno je da svejedno nastaje mala količina mezo-2,3-butandiola što je bilo pripisano prisustvu drugog gena koji kodira za 2,3-butandiol dehidrogenazu. Osim toga, primjećeno je i da je proizvodnja L-acetoina znatno smanjena u mutantu *bdhA* što sugerira da je (2R,3R)-2,3-butandiol dehidrogenaza uključena i u njegovu sintezu. U kvascu *S. cerevisiae* otkriveno je da proizvodnju mezo-2,3-butandiola i (2S,3S)-2,3-butandiola katalizira enzim arabinoza dehidrogenaza, a u bakterijama roda *Serratia*, *Klebsiella* i *Bacillus* pronađene su glicerol dehidrogenaze s katalitičkom aktivnošću 2,3-butandiol dehidrogenaze (Li i sur., 2023). Danas se na temelju svih dostupnih podataka može zaključiti da postoje dvije glavne skupine enzima povezanih s proizvodnjom stereoizomera 2,3-butandiola. Prvu skupinu čini porodica tzv. dehidrogenaza srednjih lanaca koju uglavnom čine (2R,3R)-butandiol dehidrogenaze i aldehid dehidrogenaze koje imaju R-kiralni centar i kataliziraju konverziju D-acetoina u (2R,3R)-2,3-butandiol te L-acetoina u mezo-2,3-butandiol. Ove dehidrogenaze uglavnom su nađene u *B. subtilis*, *P. polymyxa*, *R. erythropolis* i drugim gram-pozitivnim bakterijama. Drugu skupinu čini porodica tzv. dehidrogenaza kratkih lanaca koje su uglavnom pronađene u *K. pneumoniae*, *S. marcescens* i drugim gram-negativnim bakterijama. Enzimi ove skupine su mezo-2,3-butandiol dehidrogenaze, (2S,3S)-2,3-butandiol dehidrogenaze i diacetil reduktaze koje imaju S-kiralni centar i kataliziraju proizvodnju mezo-2,3-butandiola iz D-acetoina te (2S,3S)-2,3-butandiola iz L-acetoina. Zaključno, enzimi sa katalitičkom aktivnošću 2,3-butandiol dehidrogenaza široko su rasprostranjeni u mikroorganizmima, ali nisu striktno specifični. Brojni enzimi anotirani kao različite dehidrogenaze također mogu biti uključeni u proizvodnju izomera acetoina i 2,3-butandiola (Li i sur., 2023).



Slika 7. Biokemijski putevi nastanka različitih izomera acetoina i 2,3-butandiola. ALDC – acetolaktat dekarboksilaza; R-BDH – (2R,3R)-2,3-butandiol dehidrogenaza; m-BDH – mezo-2,3-butandiol dehidrogenaza; S-BDH – (2S,3S)-2,3-butandiol dehidrogenaza; DAR – diacetil reduktaza. Isprekidana crta označava neenzimsku, spontanu reakciju. Preuzeto i prilagođeno iz Li i sur. (2023).

Značajne koncentracije 2,3-butandiola prirodno proizvode bakterije *K. pneumoniae* i *E. aerogenes* iz porodice *Enterobacteriaceae* te *P. polymyxa* iz porodice *Paenibacillaceae* (Sabra i sur., 2011). Navedene vrste proizvode različite stereoizomere pa tako producenti iz porodice *Enterobacteriaceae* prvenstveno proizvode mezo-izomer i male količine S-izomera, dok producenti iz porodice *Paenibacillaceae* uglavnom proizvode R-izomer i nešto mezo-izomera (Sabra i sur., 2011). Vrste roda *Klebsiella* posebno su zanimljive za proizvodnju 2,3-butandiola jer vrlo brzo rastu te mogu metabolizirati širok spektar supstrata, između ostalog i glavninu supstrata prisutnih u lignoceluloznim sirovinama. Šaržnim uzgojem *K. oxytoca* može proizvesti i do $95,5 \text{ g L}^{-1}$ 2,3-butandiola iz glukoze, s prinosom od $0,48 \text{ g g}^{-1}$ (Ji i sur., 2010) dok šaržnim uzgojem s pritokom supstrata *K. pneumoniae* može proizvesti do $92,4 \text{ g L}^{-1}$ 2,3-butandiola iz 215 g L^{-1} glukoze (Jiayang i Zijun, 2006). Međutim, otežavajuća okolnost za industrijsku primjenu ovih vrsta jest sigurnost, budući da su određene vrste iz roda *Klebsiella* patogene. Isti problem se javlja i kod industrijske primjene bakterije *E. aerogenes* zbog čega je po kriteriju sigurnosti bakterija *P. polymyxa* najbolji izbor za industriju. No, prinosi 2,3-butandiola su kod ove vrste niži nego kod ranije spomenutih vrsta (Sabra i sur., 2011).

B. subtilis je gram-pozitivna bakterija koja ima GRAS status i koja također može metabolizirati širok spektar supstrata. Kod *B. subtilis*, geni *alsS* (kodira za α -acetolaktat sintazu) i *alsD* (kodira za α -acetolaktat dekarboksilazu) dio su operona *alsSD*. Za razliku od genoma gram-negativnih bakterija, treći gen biosintetskog puta za 2,3-butandiol nalazi se van navedenog operona (Li i sur., 2023). Glavni ekstracelularni produkt prilikom rasta *B. subtilis* na glukozi i drugim fermentabilnim šećerima je acetoin (Renna i sur., 1993). Stoga ne čudi da je i ovaj mikroorganizam istraživao kao potencijalni producent 2,3-butandiola. No, eksperimentalni podaci pokazuju da se fermentacijom glukoze pomoću *B. subtilis* postiže prinos 2,3-butandiola od 0,38 g g⁻¹, što je niže nego prinosi koje ostvaruju bakterije iz rodova *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Paenibacillus* (Ji i sur., 2010).

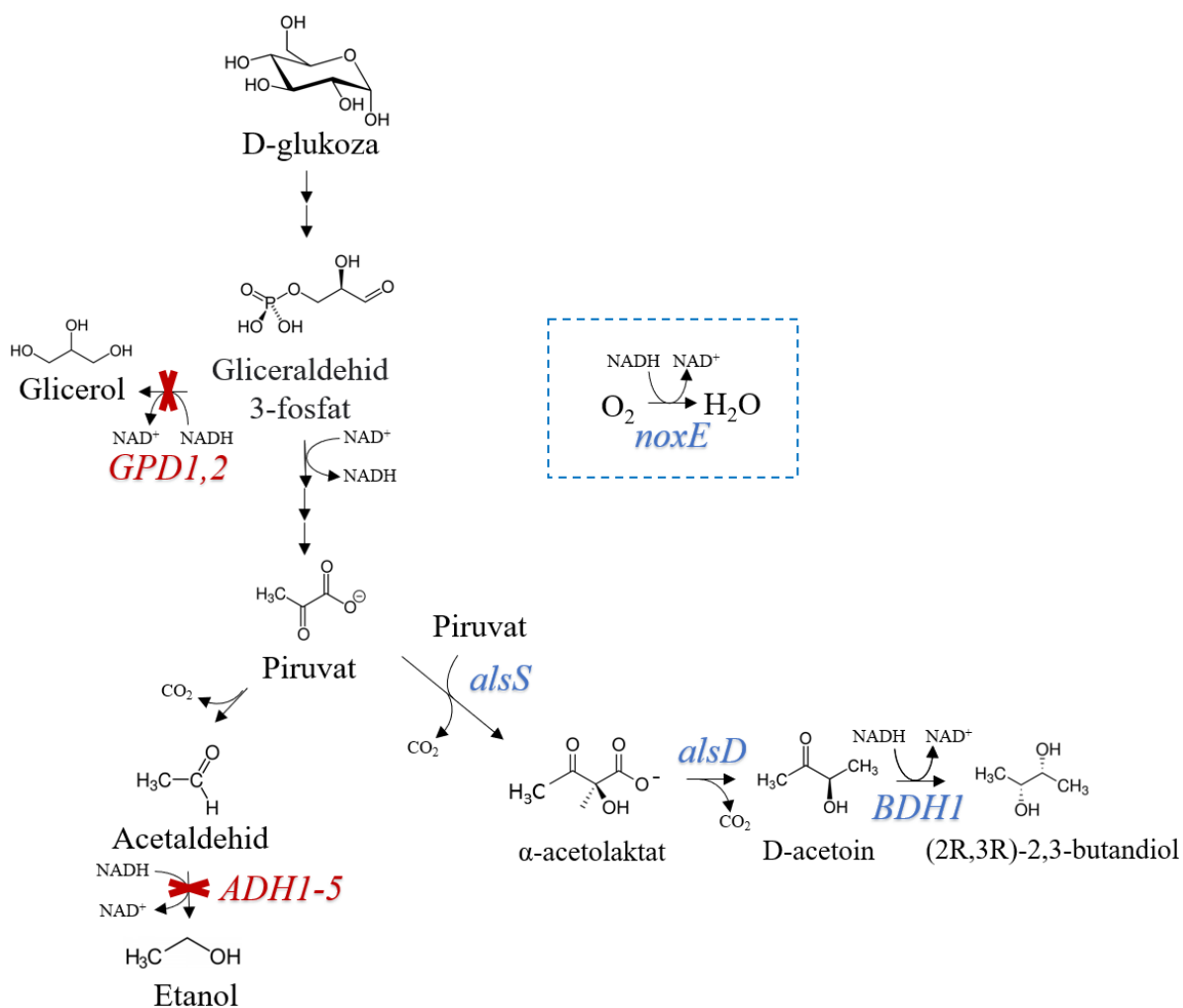
2.3.2.1.2. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasaca

Metabolički putevi nastanka 2,3-butandiola u kvascu *S. cerevisiae* razlikuju se od onih u bakterijama. U *S. cerevisiae* acetolaktat nastaje konverzijom piruvata pomoću acetolaktat sintaze koja sudjeluje u biosintezi aminokiselina izoleucina i valina (Kim i sur., 2017). Kvasac *S. cerevisiae* nema gen koji kodira za acetolaktat dekarboksilazu, ali prilikom uzgoja u aerobnim uvjetima spontanom dekarboksilacijom acetolaktata može nastati diacetil kojeg diacetil reduktaza prevodi u acetoin. U posljednjem koraku, 2,3-butandiol dehidrogenaza acetoin reducira u 2,3-butandiol (Li i sur., 2023). Alternativni biosintetski put uključuje piruvat dekarboksilazu koja kondenzira dva piruvata ili piruvat i acetaldehid čime nastaje acetoin (Kim i sur., 2017). Međutim, glavina piruvata kod kvasca *S. cerevisiae* utroši se na proizvodnju etanola zbog čega se acetoin i 2,3-butandiol akumuliraju u neznatnim količinama i bez komercijalne vrijednosti (Li i sur., 2023).

Više koncentracije 2,3-butandiola postignute su kada su u kvascu eksprimirani geni *alsS* i *alsD* izolirani iz bakterije *B. subtilis*, uz pojačanu ekspresiju nativnog gena *BDH1* koji kodira za 2,3-butandiol dehidrogenazu (Kim i sur., 2013). No, ovaj soj je iz 20 g L⁻¹ glukoze proizvodio 7,0 g L⁻¹ etanola i svega 0,7 g L⁻¹ 2,3-butandiola. Soj je stoga dodatno modificiran tako da je inaktivacijom gena *PDC1* i *PDC5* zaustavljena etanolna fermentacija. Novokonstruirani soj je na glukozi mogao rasti samo uz dodatak acetata ili etanola, a kako bi se taj problem riješio, provedeno je serijsko precjepljivanje soja, odnosno spontana nasumična mutageneza, te je selekcioniran onaj soj koji je mogao rasti bez dodatka acetata ili etanola. Analiza je pokazala da navedeni soj u genu *MTH1* sadrži točkastu mutaciju koja rezultira zamjenom alanina prolinom. Proteinski produkt gena *MTH1* regulator je transkripcije koji

prima signale od senzora glukoze, odnosno proteina Snf3 i Rgt2, te se pretpostavlja da njegova inaktivacija rezultira smanjenim unosom glukoze u stanicu što posljedično smanjuje nakupljanje piruvata te sprječava redoks neravnotežu. Dobiveni soj je iz 20 g L⁻¹ glukoze pri 30 °C i 250 rpm proizvodio 6,4 g L⁻¹ 2,3-butandiola, dok je šaržnim uzgojem u bioreaktoru iz 100 g L⁻¹ glukoze ostvarena proizvodnja od 31,8 g L⁻¹ 2,3-butandiola. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata postignuta je koncentracija od 96,2 g L⁻¹ s prinosom 2,3-butandiola od 0,28 g g⁻¹ glukoze (Kim i sur., 2013).

Kao i u prethodno navedenom radu, Kim i Hahn (2015) su konstruirali soj kvasca *S. cerevisiae* koji eksprimira gene *alsS* i *alsD* izolirane iz *B. subtilis* te pojačano eksprimira nativni gen *BDH1*. Međutim, u svrhu zaustavljanja alkoholne fermentacije u ovom soju su, umjesto gena koji kodiraju za piruvat dekarboksilaze, inaktivirani geni koji kodiraju za alkohol dehidrogenaze. U radu Kim i sur. (2013) sporiji rast na glukozi kod sojeva bez aktivnosti piruvat dekarboksilaze vjerojatno je posljedica onemogućavanja proizvodnje citosolnog acetil-CoA iz acetaldehida preko acetata. Ovaj problem može se izbjeći tako da se alkoholna fermentacija zaustavi inaktivacijom gena koji kodiraju za acetaldehid dehidrogenaze budući da se na ovaj način ne sprječava proizvodnja acetaldehida, a samim time niti proizvodnja citosolnog acetil-CoA iz acetaldehida. Međutim, inaktivacija ovih gena uzrokuje drugi problem, a to je nakupljanje toksičnog acetaldehida (Kim i Hahn, 2015). No, aktivnost heterologne acetolaktat sintaze usmjerava piruvat u sintezu 2,3-butandiola što bi trebalo biti dovoljno za izbjegavanje nakupljanja acetaldehida. Osim toga, zaustavljanje alkoholne fermentacije kod kvasca dovodi do redoks-neravnoteže koju stanica ispravlja redukcijom gliceraldehid-3-fosfata u glicerol zbog čega je potrebno ukloniti i gene *GPD1* i *GPD2* (Young Lee i sur., 2015). Stoga je konstruiran soj s biosintetskim putem za 2,3-butandiol i inaktiviranim putevima za sintezu etanola i glicerola koji je proizvodio do 18,5 g L⁻¹ 2,3-butandiola s prinosom od 0,37 g g⁻¹ glukoze. Kako bi se ispravila redoks neravnoteža nastala zbog inaktivacije kompetitivnih metaboličkih puteva, osiguran je dodatan put regeneracije NAD⁺ iz NADH korištenjem molekularnog kisika, a to je postignuto pojačanom ekspresijom gena *noxE* izoliranog iz *L. lactis* koji kodira za citosolnu NADH oksidazu. Finalni soj s eksprimiranim genima za sintezu 2,3-butandiola i genom *noxE* te inaktiviranim genima *ADH1-5*, *GPD1* i *GPD2* (Slika 8) šaržnim uzgojem s pritokom supstrata proizvodi 72,9 g L⁻¹ 2,3-butandiola s prinosom od 0,41 g g⁻¹ glukoze. Ekspresijom gena *noxE* značajno je narasla produktivnost procesa, s 0,26 g (Lh)⁻¹ na 1,43 g (Lh)⁻¹.



Slika 8. Sažeti prikaz metaboličkog puta za proizvodnju 2,3-butandiola iz glukoze te kompetitivnih metaboličkih puteva. Crvenom bojom označeni su geni inaktivirani u konstruiranom soju kvasca *S. cerevisiae*, a plavom bojom označeni su eksprimirani heterologni ili pojačano eksprimirani nativni gen (Kim i Hahn, 2015).

U literaturi se od nekonvencionalnih kvasaca kao uspješan producent 2,3-butandiola može pronaći samo rekombinantni soj kvasca *Pichia pastoris* koji eksprimira gene *alsS* i *alsD* iz bakterije *B. subtilis* (Yang i Zhang, 2018). Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata ovaj soj proizvodi do $74,5 \text{ g L}^{-1}$ 2,3-butandiola s prinosom od $0,3 \text{ g g}^{-1}$ glukoze. Yang i Zhang (2018) su i dodatno modificirali ovaj soj na način da su eksprimirali gen *BDH1* iz kvasca *S. cerevisiae* te gen *udhA* koji u bakteriji *E. coli* kodira za transhidrogenazu, no ove modifikacije nisu rezultirale porastom prinosa 2,3-butandiola.

Unatoč raznovrsnosti i potencijalu drugih nekonvencionalnih kvasaca, nedostaju istraživanja koja uključuju njihovu primjenu u proizvodnji 2,3-butandiola budući da je u dosadašnjim istraživanjima u području proizvodnje 2,3-butandiola pomoću kvasaca korišten uglavnom kvasac *S. cerevisiae*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Plazmidi

Plazmidi korišteni u ovom radu podijeljeni su u skupine prema svojim karakteristikama i primjeni. Prve dvije skupine čine ekspresijski plazmidi, odnosno ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata (Tablica 2) i ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola (Tablica 3). Treću skupinu plazmida čine plazmidi za inaktivaciju nativnih gena u kvascu *K. marxianus* (Tablica 4). Plazmidi iz ove tri navedene skupine sadrže i jedan od otvorenih okvira čitanja (*engl.* open reading frame, ORF) gena koji omogućavaju selekciju kvašćevih stanica na podlozi s antibiotikom higromicinom B (*coHyg^R*), nurseotricinom (*coNrs^R*) ili kanamicinom (*coKan^R*), a koji su optimizirani za ekspresiju u kvascima roda *Candida*. Geni koji omogućavaju selekciju kvašćevih stanica u podlogama s antibioticima nalaze se pod regulacijom promotora i terminatora gena *TEF* iz plijesni *Ermothecium (Ashbya) gossypii*, za koje je dokazano da su aktivni u velikom broju kvasaca (Goldstein i McCusker, 1999). Osim navedenih plazmida, u radu je konstruirana i skupina plazmida sa skraćenom regijom *f1 ori* (Tablica 5). Plazmidi navedeni u Tablicama 2 do 5 konstruirani su u ovom radu, a postupak konstrukcije svih navedenih plazmida opisan je u poglavlju 4.1. Plazmidi korišteni samo za konstrukciju drugih plazmida navedeni su i opisani u Tablici 6. Svi plazmidi korišteni u ovom radu sadrže i ishodište replikacije u *E. coli (ori)* te gen *bla* koji omogućava selekciju bakterijskih stanica na podlozi s ampicilinom. Plazmidi koji su u ovom radu korišteni za transformaciju kvasaca prikazani su u poglavlju 3.1.1.2.

Tablica 2. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata.

PLAZMID	PRIMJENA	REGIJE DNA KOJE SADRŽI*
pRS54FcoH-Ssc	Konstrukcija soja SL2 kvasca <i>S. stipitis</i>	ORF gena <i>CaldhL1</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>SsTDH3</i> , ORF gena <i>CaldhL2</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>SsPDC1</i> , ishodište replikacije izolirano iz kvasca <i>S. stipitis</i> (<i>SsARS2</i>), gen <i>coHyg^R</i> , skraćena regija <i>f1 ori</i> (<i>f1-3'A</i>)
pRS53coH-Kmc2	Konstrukcija soja KL1 kvasca <i>K. marxianus</i>	ORF gena <i>KlldhL2</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmPDC1</i> , ishodište replikacije izolirano iz kvasca <i>K. lactis</i> (<i>panARS</i>), gen <i>coHyg^R</i> i regija <i>f1 ori</i>
pRS53coH-Kmc2-Kmc1	Konstrukcija soja KL2 kvasca <i>K. marxianus</i>	ORF gena <i>KlldhL2</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmPDC1</i> , ORF gena <i>KlldhL1</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmENO1</i> , ishodište replikacije izolirano iz kvasca <i>K. lactis</i> (<i>panARS</i>) i gen <i>coHyg^R</i>

* Objašnjenja naziva gena nalaze se u Tablici 9.

Tablica 3. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola.

PLAZMID	PRIMJENA	REGIJE DNA KOJE SADRŽI*
pM-STaS-coN	Konstrukcija soja SB2 kvasca <i>S. stipitis</i>	ORF gena <i>CaalsS</i> fuzioniran s promotorom i terminatorom gena <i>SsTEF1</i> te gen <i>coNrs^R</i>
pRS54FcoH-SPaD		ORF gena <i>CaalsD</i> fuzioniran s promotorom i terminatorom gena <i>SsPDC1</i> , gen <i>coHyg^R</i> te ishodište replikacije izolirano iz kvasca <i>S. stipitis</i> (<i>SsARS2</i>)
pRS53coH-KPaD-KTaS	Konstrukcija soja KB2 kvasca <i>K. marxianus</i>	ORF gena <i>KlalsS</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmTEF1</i> , ORF gena <i>KlalsD</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmPDC1</i> , gen <i>coHyg^R</i> te ishodište replikacije izolirano iz kvasca <i>K. lactis</i> (<i>panARS</i>)
pRS53coN-KEB	Konstrukcija soja KB3 kvasca <i>K. marxianus</i>	ORF gena <i>KmBDH1</i> koji je fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmENO1</i> , gen <i>coNrs^R</i> te ishodište replikacije izolirano iz kvasca <i>K. lactis</i> (<i>panARS</i>)

pUC-KPhnE-coK	Konstrukcija soja KB2N kvasca <i>K. marxianus</i>	ORF gena <i>KlnoxE</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmPDC1</i> te gen <i>coKan^R</i>
----------------------	---	--

* Objašnjenja naziva gena nalaze se u Tablici 9.

Tablica 4. Plazmidi za inaktivaciju nativnih gena kvasca *K. marxianus*.

PLAZMID	PRIMJENA	REGIJE DNA KOJE SADRŽI*
pUC-KPh-coN	Konstrukcija sojeva KL2p i KB2p kvasca <i>K. marxianus</i>	Homologije regija koje okružuju ORF gena <i>KmPDC1</i> u genomu kvasca <i>K. marxianus</i> između kojih je inserirana sekvenca <i>coNrs^R</i>
pBS-KG-coN	Konstrukcija sojeva KB2g i KB2Ng kvasca <i>K. marxianus</i>	Gen <i>coNrs^R</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmGPD1</i>

* Objašnjenja naziva gena nalaze se u Tablici 9.

Tablica 5. Plazmidi korišteni samo za konstrukciju drugih plazmida.

PLAZMID	PRIMJENA	KARAKTERISTIKE*	LITERATURNI NAVOD
pRS53coK	Konstrukcija plazmida pUC-KPhnE-coK	Sadrži ishodište replikacije <i>panARS</i> iz kvasca <i>K. lactis</i> , gen <i>coKan^R</i> i regiju <i>f1 ori</i>	Matanović i sur., 2022
pRS53coN	Konstrukcija plazmida pRS53coN-KEB, pUC-KPh-coN i pBS-KG-coN	Sadrži ishodište replikacije <i>panARS</i> iz kvasca <i>K. lactis</i> , gen <i>coNrs^R</i> i regiju <i>f1 ori</i>	Matanović i sur., 2022
pRS53coH	Konstrukcija ekspresijskih plazmida za primjenu u kvascu <i>K. marxianus</i>	Sadrži ishodište replikacije <i>panARS</i> iz kvasca <i>K. lactis</i> , gen <i>coHyg^R</i> i regiju <i>f1 ori</i>	Matanović i sur., 2022
pRS54coH	Konstrukcija plazmida pRS54FcoH	Sadrži ishodište replikacije <i>SsARS2</i> iz kvasca <i>S. stipitis</i> , gen <i>coHyg^R</i> i regiju <i>f1 ori</i>	Matanović i sur., 2022
pRS54FcoH	Konstrukcija plazmida pRS54FcoH-Ssc i pRS54FcoH-SPaD	Sadrži ishodište replikacije <i>SsARS2</i> iz kvasca <i>S. stipitis</i> , gen <i>coHyg^R</i> i skraćenu regiju <i>f1 ori (f1-3'Δ)</i>	Ovaj rad

pRS54coN	Konstrukcija plazmida pM-STaS-coN	Sadrži ishodište replikacije <i>SsARS2</i> iz kvasca <i>S. stipitis</i> , gen <i>coNrs^R</i> i regiju <i>f1 ori</i>	Matanović i sur., 2022
pUG-Ssc	Konstrukcija plazmida pRS54FcoH-Ssc	Sadrži ORF gena <i>CaldhL1</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>SsTDH3</i> te ORF gena <i>CaldhL2</i> fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>SsPDC1</i>	Ovaj rad
pUG-Kmc1	Konstrukcija plazmida pRS53coH-Kmc2-Kmc1	Sadrži ORF gena <i>KlldhL1</i> koji je fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmENO1</i>	Ovaj rad
pUG-Kmc2	Konstrukcija plazmida pRS53coH-Kmc2	Sadrži ORF gena <i>KlldhL2</i> koji je fuzioniran s regulatornim regijama gena <i>KmPDC1</i>	Ovaj rad
pcoCaalsS	Konstrukcija plazmida pM-STaS-coN	Sadrži ORF gena <i>CaalsS</i>	Ovaj rad
pcoCaalsD	Konstrukcija plazmida pRS54FcoH-SPaD	Sadrži ORF gena <i>CaalsD</i>	Ovaj rad
pcoKlalsS	Konstrukcija plazmida pRS53coH-KPaD-KTaS	Sadrži ORF gena <i>KlalsS</i>	Ovaj rad
pcoKlalsD	Konstrukcija plazmida pRS53coH-KPaD-KTaS	Sadrži ORF gena <i>KlalsD</i>	Ovaj rad
pUC-GW-KlnoxE	Konstrukcija plazmida pUC-KPhnE-coK	Sadrži ORF gena <i>KlnoxE</i>	Ovaj rad
pUC-GW-KPh	Konstrukcija plazmida pUC-KPh-coN i pUC-KPhnE-coK	Sadrži homologije regija koje okružuju ORF gena <i>PDC1</i> u genomu kvasca <i>K. marxianus</i>	Ovaj rad
pMiniT2.0	Vektor u genetičkom inženjerstvu	Dizajniran za kloniranje produkata PCR reakcije pomoću NEB PCR kompleta kemikalija za kloniranje	NEB PCR Cloning Kit
pBluescriptI IKS(-)	Konstrukcija plazmida pBS-KmGPD1	Standarni vektor u genetičkom inženjerstvu. U fragmentu <i>LacZa</i> β-galaktozidaze sadrži polilinker koji omogućava	Alting-Mees i Short, 1989.

* Objašnjenja naziva gena nalaze se u Tablici 9.

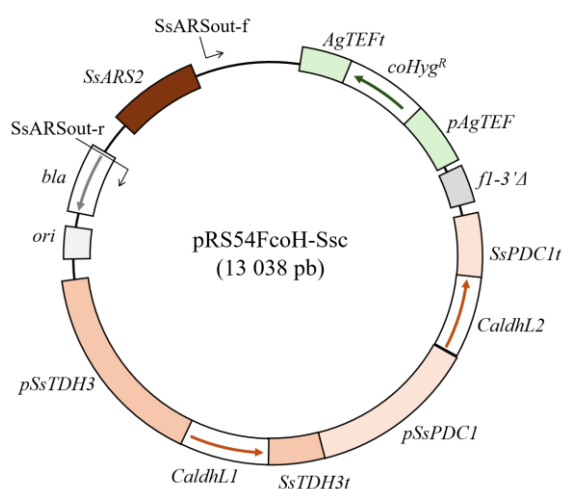
3.1.1.1. Plazmidi korišteni za transformaciju kvasaca

Za proizvodnju L-laktata i 2,3-butandiola odabrane su dvije vrste nekonvencionalnih kvasaca, *S. stipitis* i *K. marxianus*. No, budući da kvasac *S. stipitis* pripada skupini CTG kvasaca koji kodon CUG umjesto u leucin uglavnom transliraju u serin, kodone heterolognih gena potrebno je optimizirati zasebno za obje vrste kvasaca (Defosse i sur., 2018). Osim toga, za efikasnu ekspresiju je svaku optimiziranu sekvencu potrebno fuzionirati s odgovarajućim regulatornim sekvencama te je za održavanje plazmidne DNA u kvascima nužno koristiti ekspresijske plazmide s odgovarajućim kvašćevim ishodištem replikacije. Iz navedenih razloga, za odabrane vrste kvasaca bilo je potrebno konstruirati različite ekspresijske plazmide. U poglavlju 3.1.1.2.1 prikazani su ekspresijski plazmidi korišteni prilikom konstrukcije producenata L-laktata, dok su u poglavlju 3.1.1.2.2 prikazani ekspresijski plazmidi korišteni prilikom konstrukcije producenata 2,3-butandiola. Osim ekspresijskih plazmida, u ovom radu su za transformaciju kvasca *K. marxianus* korišteni i plazmidi za inaktivaciju nativnih gena (poglavlje 3.1.1.2.3).

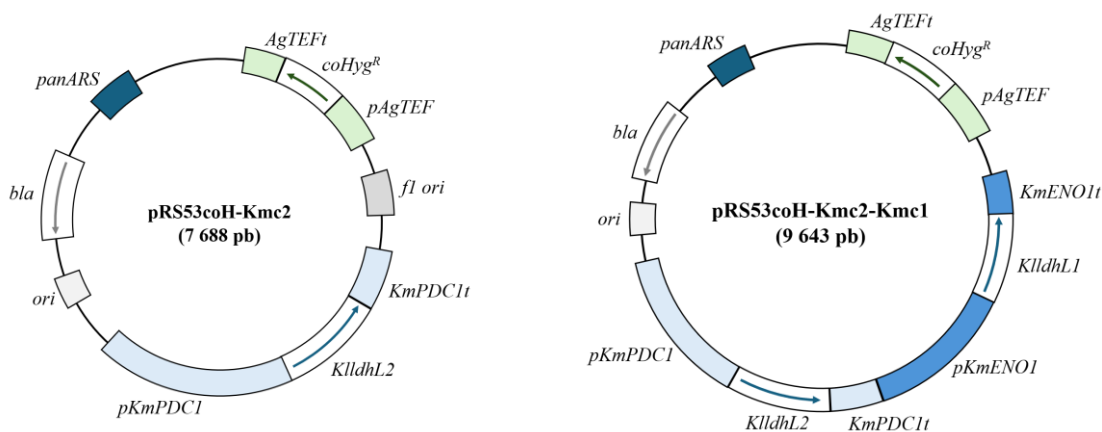
3.1.1.1.1. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata

Prilikom konstrukcije producenata L-laktata korišteni su ekspresijski plazmidi koji sadrže ORF-ove gena koji kodiraju za L-laktat dehidrogenaze (sekvence *ldhL1* i *ldhL2*) u bakteriji *Lactobacillus gasser* (Slika 9). Za primjenu u kvascu *S. stipitis*, navedeni geni optimizirani su prema genima kvasca *C. albicans* (sekvence *CaldhL1* i *CaldhL2*) i fuzionirani s regulatornim regijama gena iz kvasca *S. stipitis*, a za primjenu u kvascu *K. marxianus* optimizirani su prema genima kvasca *K. lactis* (sekvence *KlldhL1* i *KlldhL2*) te fuzionirani s regulatornim regijama gena izoliranim iz kvasca *K. marxianus*.

a)



b)

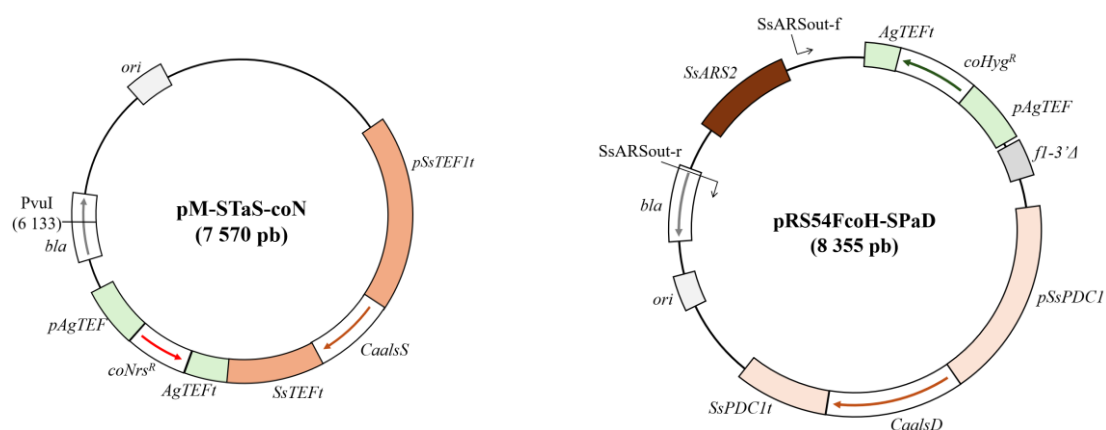


Slika 9. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata kvasca *S. stipitis* (a) i *K. marxianus* (b). Na plazmidu pRS54FcoH-Ssc naznačena su mjesta komplementarnog sparivanja početnica SsARSout-f i SsARSout-r koje su korištene za umnažanje transformirajuće DNA prilikom konstrukcije soja SL2. Najvažnije karakteristike prikazanih plazmida navedene su i u Tablici 2.

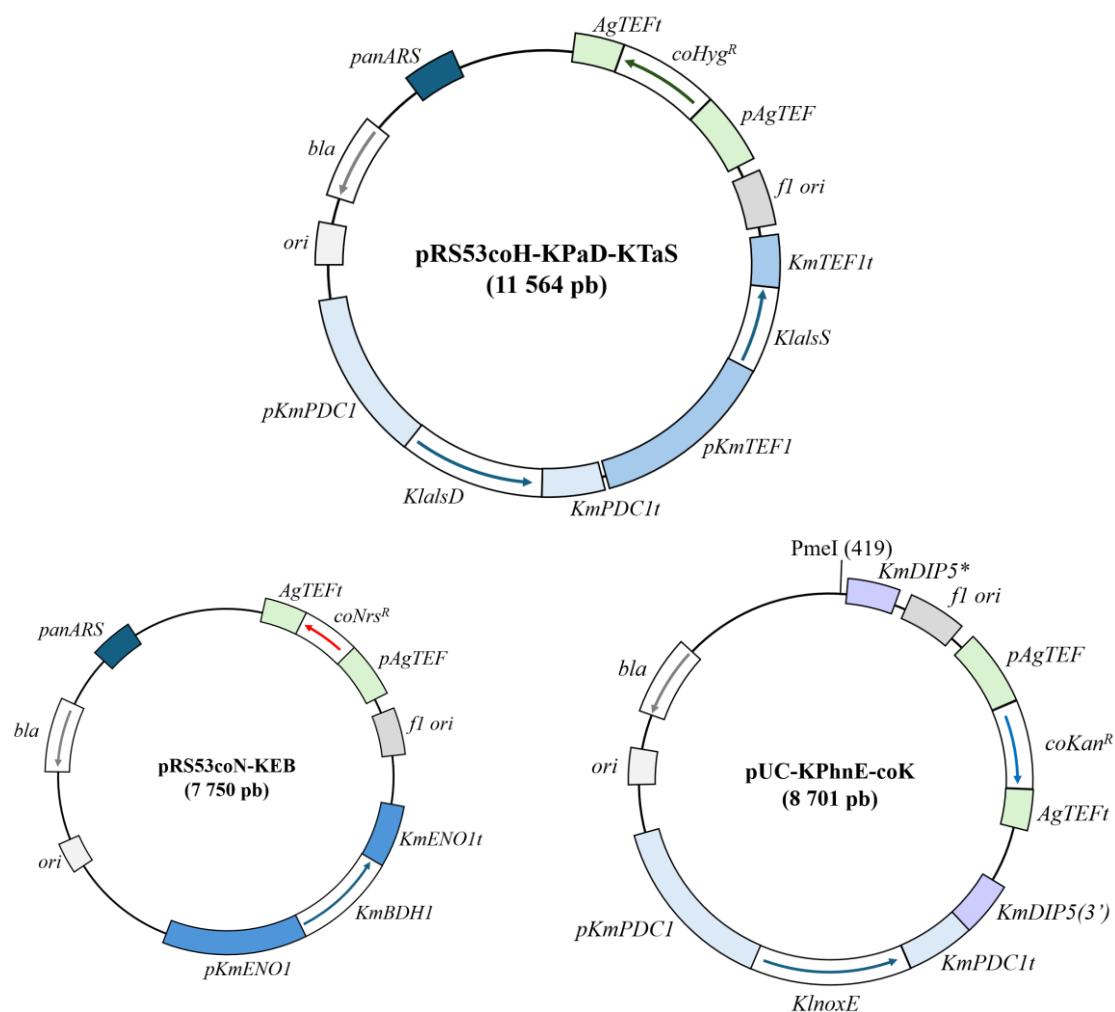
3.1.1.1.2. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola

Prilikom konstrukcije soja kvasca *S. stipitis* koji proizvodi 2,3-butandiol korišteni su ekspresijski plazmidi s ORF-ovima bakterijskih gena *alsS* i *alsD*, dok su pri konstrukciji producenata 2,3-butandiola kvasca *K. marxianus* korišteni ekspresijski plazmidi koji sadrže ORF-ove heterolognih gena *alsS*, *alsD* i *noxE* te plazmid s ORF-om nativnog gena *BDH1* (Slika 10). Kao i kod ekspresijskih plazmida za konstrukciju producenata L-laktata, za primjenu u kvascu *S. stipitis* navedeni geni optimizirani su za ekspresiju u kvascu *C. albicans* te fuzionirani s regulatornim regijama gena izoliranih iz kvasca *S. stipitis*, dok su za primjenu u kvascu *K. marxianus* geni optimizirani za ekspresiju u kvascu *K. lactis* te fuzionirani s regulatornim regijama gena izoliranih iz kvasca *K. marxianus*.

a)



b)

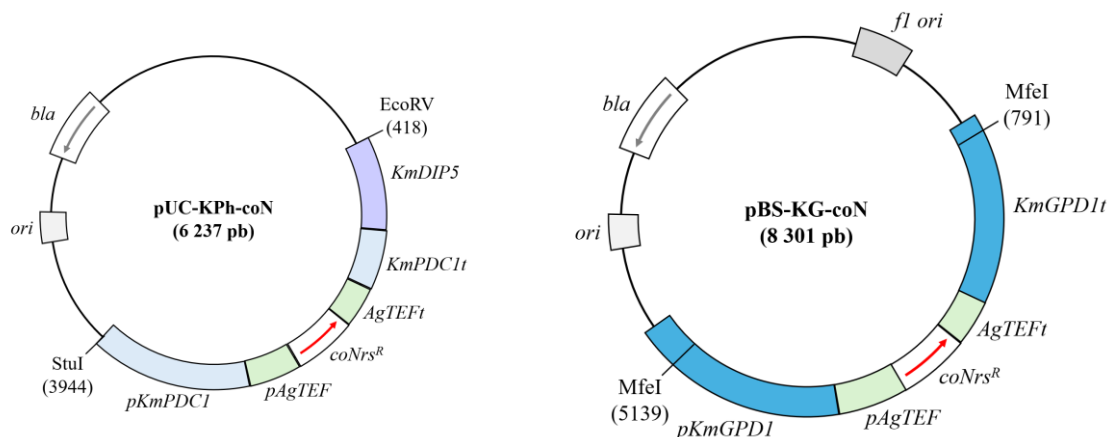


Slika 10. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola kvasca *S. stipitis* (a) i *K. marxianus* (b). Na slici je naznačeno mjesto za restriksijsku endonukleazu *PvuI* kojom je plazmid pM-STaS-coN cijepan kako bi se dobila linearna DNA te mjesta komplementarnog sparivanja početnica *SsARSout-f* i *SsARSout-r* koje su korištene za umnažanje linearnog fragmenta plazmida pRS54FcoH-SPaD. Ovako dobiveni linearni fragmenti korišteni su kao transformirajuća DNA prilikom konstrukcije soja *S. stipitis* za proizvodnju 2,3-butandiola (SB2). Na mapi plazmida pUC-KPhnE-coK naznačeno je restriksijsko mjesto koje prepoznaje endonukleaza *PmeI*, a koje je upotrijebljeno u ovom radu prilikom

pripreme transformirajuće DNA za konstrukciju soja KB2N kvasca *K. marxianus*. Najvažnije karakteristike prikazanih plazmida navedene su i u Tablici 3.

3.1.1.1.3. Plazmidi za inaktivaciju nativnih gena kvasca *K. marxianus*

Za inaktivaciju nativnih gena *PDC1* i *GPD1* u odabranim sojevima kvasca *K. marxianus* korišteni su plazmidi pUC-KPh-coN i pBS-KG-coN (Slika 11). Najvažnije karakteristike prikazanih plazmida navedene su i u Tablici 4.



Slika 11. Plazmidi za inaktivaciju gena *PDC1* (pUC-KPh-coN) i *GPD1* (pBS-KG-coN) u kvascu *K. marxianus*. Naznačena su restrikcijska mjesta za endonukleaze kojima se plazmidi cijepaju kako bi se njihova integracija usmjerila u odgovarajuće gene prilikom konstrukcije željenih sojeva kvasaca. Objašnjenje naziva gena nalazi se u Tablici 9.

3.1.2. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni u ovom radu podijeljeni su u skupine prema svojoj primjeni pa su tako u Tablici 6 navedeni oligonukleotidi korišteni za umnažanje regija iz genoma kvasaca i regija plazmida u svrhu konstrukcije drugih plazmida, dok su u Tablici 7 navedeni oligonukleotidi korišteni za provjeru konstrukcije sojeva kvasaca. Nazivi gena objašnjeni su u Tablici 9.

Tablica 6. Oligonukleotidi korišteni za umnažanje DNA metodom PCR prilikom konstrukcije plazmida. Vrijednosti T_m izračunate su alatom 'NEB T_m Calculator: Q5'.

OLIGO- NUKLEOTID	REDOSLIJED NUKLEOTIDA (5'-3')	DULJINA [nt]	T_m [°C]	PRIMJENA
SsPDC1-f	tcgcaaggcctttacagacagagaagctattttaatgc	39	74	Umnažanje gena <i>SsPDC1</i>
SsPDC1-r	tcgcgagctccattgtgagtgtatgtttgtgattt	35	74	
SsPDC1out-f	ctttaatgttactctcttgaggataga	28	62	Umnažanje okosnice plazmida pM-SP
SsPDC1out-r	gatagttgtatgttaggcggc	21	63	

SsTEF1-f	tcgcgaggcctagagaaagaactgatagcatgg	33	75	Umnažanje gena
SsTEF1-r	tcgcgagagctctgcggtgctgatgtagtga	31	79	<i>SsTEF1</i>
SsTEF1out-f	gatatcgctagcgtgaagctgattaatttacgtatattcagttt aatatc	49	69	Umnažanje okosnice plazmida pM-ST
SsTEF1out-r	tgtagatagacttagattgtatgaaactaaagg	33	63	
KmBDH1-f	atggaactaaaagcgtggggg	21	68	Umnažanje gena
KmBDH1-r	ttaattagcattcagttcacctgtgattatttg	33	67	<i>KmBDH1</i>
KmENO1-f	tcgcgagctcagggtagttagtagactagagaaga	36	73	Umnažanje gena <i>KmENO1</i> ; umnažanje
KmENO1-r	tcgcgacgtctgtgttcgtggtgcatt	28	76	dijela plazmida pRS53coH-KEB
KmENO1out-f	ggcgctctagaatctagctgacgcgacg	29	78	Umnažanje okosnice
KmENO1out-r	tgtagttgtgtgtgtgtgtgtg	24	62	plazmida pRS53coH-KE
KmGPD1-f	tcgcgagctcgtgtgcagctttacacct	28	78	Umnažanje gena
KmGPD1-r	tcgcgacgtctttgttaaactacttagatctatgctcttg	40	72	<i>KmGPD1</i>
KmGPD1out-f	aggcctctagaacataggaaacacccaacataac	34	72	Umnažanje okosnice
KmGPD1out-r	atctgaaaactgattcctccac	22	62	plazmida pBS-KG
KmPDC1-f	tcgcgagctcctagccagcctaaagcc	27	78	Umnažanje gena <i>KmPDC1</i> ;
KmPDC1-r	tcgcgacccgggtaattaattccctattgccctag	36	78	umnažanje dijela plazmida pUG-Kmc2
KmPDC1out-f	ctttaatgttacttctcttgagttaga	28	62	Umnažanje okosnice
KmPDC1out-r	tgcaattatttggttggtgt	22	63	plazmida pRS53coH-KP
KmTEF1-f	tcgcgagctcgaaaaatatgtagtgtgtaacaagctg	38	73	Umnažanje gena <i>KmTEF1</i> ; umnažanje
KmTEF1-r	tcgcgacccgggattaagctgtgtaagttgatatatggat attt	44	75	dijela plazmida pRS53coH-KTaS
KmTEF1out-f	aggcctctagatttaacttaactagattattttcctcgtt aaattttt	52	68	Umnažanje okosnice
KmTEF1out-r	ctttaatgttacttctcttgagttaga	28	62	plazmida pRS53coH-KT
Kmc1a-f	cgacggccagtgattgacgcg	22	74	Umnažanje dijela
Kmc1-r	tgcggtgcgggtgtgctgtg	20	75	plazmida pUG-Kmc1
pAgTEF-f	gatatcgacatggaggcccagaat	24	68	Umnažanje okosnice
KmPDC1-r	tcgcgacccgggtaattaattccctattgccctag	36	78	plazmida pRS53coH- Kmc2
Nrs-f	aattgcgagctccagtatagcgaccagcattcac	34	76	Umnažanje dijela
Nrs-r	atcaacctcgaggacatggaggcccagaataacc	33	77	plazmida pRS53coN
pAgTEF-f	gatatcgacatggaggcccagaat	24	68	Umnažanje okosnice
pRS40AgPT-f	acgaggcaagctaacg	17	62	plazmida pRS54coH

Tablica 7. Oligonukleotidi korišteni za umnažanje DNA metodom PCR prilikom provjere konstrukcije sojeva kvasaca. Vrijednosti T_m izračunate su alatom 'NEB T_m Calculator: Q5'.

OLIGO- NUKLEOTID	REDOSLIJED NUKLEOTIDA (5'-3')	DULJINA [nt]	T _m [°C]	PRIMJENA
PDCinF	gcacctagagtagcaccacc	20	68	Provjera konstrukcije sojeva KL2p, KB2p i KB2N
PDCinR	agccttcgttaccccaatgg	20	68	
pdclOUTf	tcctggcgcttcaaagaat	20	67	Provjera konstrukcije sojeva KL2p i KB2p
pdclOUTr	cctcgacatcatctgccag	20	68	
KmGPD1-f	tcgcgagctcgtgtgcagctttacacct	28	78	Provjera konstrukcije sojeva KB2g i KB2Ng
Nrs-f	aattgcgagctccagtatagcgaccagca ttcac	34	76	
coHygRorf-f	ccttggtctctggacgtgt	19	68	Umnažanje ORF-a gena <i>coHyg^R</i> korištenog za sintezu DNA-probe
coHygRorf-r	gcaacatccgtcgaaaagtt	20	63	
coKanRorf-f	actgcaactgttcattgtctgg	22	65	Umnažanje ORF-a gena <i>coKan^R</i> korištenog za sintezu DNA-probe
coKanRorf-r	tgggtaaggagaagacacacg	21	66	
coNrsRorf-f	ttaagggtatggcatagaca	20	63	Umnažanje ORF-a gena <i>coNrs^R</i> korištenog za sintezu DNA-probe
coNrsRorf-r	acaccgcatatcgttaccgt	20	66	

3.1.3. Mikroorganizmi

3.1.3.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje plazmida korištena je bakterija *E. coli* soj DH5α genotipa F'/φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 (Nal^r) relA1 (Bethesda Research Laboratories, 1986).

3.1.3.2. Kvasci *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus*

U ovom radu su kao ishodišni sojevi za konstrukciju sojeva željenih karakteristika korišteni kvasac *S. stipitis* JCM 10742^T i kvasac *K. marxianus* NBRC1777 (Tablica 8).

Tablica 8. Sojevi konstruirani iz sojeva JCM 10742^T i NBRC1777. Navedene su oznake relevantnih gena. Geni uz koje se nalazi oznaka „A“ su uklonjeni iz genoma.

KVASAC	NAZIV SOJA	RELEVANTNI GENOTIP*	REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIK
S. <i>stipitis</i>	SL2	<i>CaldhL1, CaldhlL2</i>	Higromicin B
	SB2	<i>CaalsS, CaalsD</i>	Higromicin B i nurseotricin
	KL1	<i>KlldhL2</i>	Higromicin B
	KL2	<i>KlldhL1, KlldhL2</i>	Higromicin B
	KL2p	<i>KlldhL1, KlldhL2, Apdc1</i>	Higromicin B i nurseotricin
K. <i>marxianus</i>	KB2	<i>KlalsS, KlalsD</i>	Higromicin B
	KB3	<i>KlalsS, KlalsD, KmBDH11</i>	Higromicin B i nurseotricin
	KB2p	<i>KlalsS, KlalsD, Apdc1</i>	Higromicin B i nurseotricin
	KB2g	<i>KlalsS, KlalsD, Agpd1</i>	Higromicin B i nurseotricin
	KB2N	<i>KlalsS, KlalsD, KlnoxE</i>	Higromicin B i geneticin
	KB2Ng	<i>KlalsS, KlalsD, KlnoxE, Agpd1</i>	Higromicin B, geneticin i nurseotricin

* Objašnjenja naziva gena nalaze se u Tablici 9.

Tablica 9. Objašnjenja naziva gena.

GEN*	KARAKTERISTIKE
<i>CaldhL1</i>	Kodira za L-laktat dehidrogenazu u bakteriji <i>L. gasseri</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>
<i>CaldhL2</i>	Kodira za L-laktat dehidrogenazu u bakteriji <i>L. gasseri</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>
<i>CaalsS</i>	Kodira za α -acetolaktat sintazu u bakteriji <i>B. subtilis</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>
<i>CaalsD</i>	Kodira za α -acetolaktat dekarboksilazu u bakteriji <i>B. subtilis</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>
<i>SsPDC1</i>	Kodira za piruvat dekarboksilazu u kvascu <i>S. stipitis</i>
<i>SsTDH3</i>	Kodira za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu u kvascu <i>S. stipitis</i>
<i>SsTEF1</i>	Kodira za translacijski elongacijski faktor E1 α u kvascu <i>S. stipitis</i>
<i>KlldhL1</i>	Kodira za L-laktat dehidrogenazu u bakteriji <i>L. gasseri</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>K. lactis</i>
<i>KlldhL2</i>	Kodira za L-laktat dehidrogenazu u bakteriji <i>L. gasseri</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>K. lactis</i>

KlalsS	Kodira za α -acetolaktat sintazu u bakteriji <i>B. subtilis</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>K. lactis</i>
KlalsD	Kodira za α -acetolaktat dekarboksilazu u bakteriji <i>B. subtilis</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>K. lactis</i>
KlnoxE	Kodira za NADH oksidazu u bakteriji <i>L. lactis</i> , kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>K. lactis</i>
KmBDH1	Kodira za 2,3-butandiol dehidrogenazu u kvascu <i>K. marxianus</i>
KmENO1	Kodira za enolazu u kvascu <i>K. marxianus</i>
KmGPD1	Kodira za glicerol-3-fosfat dehidrogenazu u kvascu <i>K. marxianus</i>
KmPDC1	Kodira za piruvat dekarboksilazu u kvascu <i>K. marxianus</i>
KmTEF1	Kodira za translacijski elongacijski faktor E1 α u kvascu <i>K. marxianus</i>
KmDIP5	Kodira za permeazu dikarboksilnih aminokiselina u kvascu <i>K. marxianus</i>
SpTEF1-1	Kodira za translacijski elongacijski faktor E1 α u kvascu <i>S. passalidarum</i>
AgTEF	Kodira za translacijski elongacijski faktor E1 α u plijesni <i>A. gossypii</i>
coHyg^R	Kodira za higromicin B fosfotransferazu (Goldstein i McCusker, 1998), kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>
coKan^R	Kodira za aminoglikozid fosfotransferazu (Wach i sur., 1994), kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>
coNrs^R	Kodira za N-acetiltransferazu (Goldstein i McCusker, 1998), kodoni optimizirani za ekspresiju u kvascu <i>C. albicans</i>

* „p“ u prefiksu naziva gena označava promotorsku regiju navedenog gena, a „t“ u sufiksu označava terminatorsku regiju.

3.1.4. Hranjive podloge i otopine

Hranjive podloge i otopine korištene u radu sterilizirane su autoklaviranjem tijekom 15 min na 121 °C pri tlaku od 1 atm, ili su pripremljene iz sterilnih otopina i vode. Otopine koje su sadržavale termolabilne kemikalije sterilizirane su filtracijom. Prilikom pripreme krutih hranjivih podloga korišten je agar. Ukoliko nije drugačije navedeno, pripremljene otopine čuvane su na sobnoj temperaturi.

3.1.4.1. Hranjive podloge za uzgoj bakterije *E. coli*

Kompleksna hranjiva podloga (LB):

5 g L⁻¹ kvašćeva ekstrakta, 10 g L⁻¹ triptona, 10 g L⁻¹ NaCl

Kompleksna hranjiva podloga s ampicilinom:

korištene su podloge LB s dodatkom ampicilina. Osnovna otopina ampicilina (koncentracija 20 mg mL⁻¹) priprema se otapanjem ampicilin natrijeve soli u vodi te se sterilizira filtracijom. Konačna koncentracija ampicilina u tekućoj hranjivoj podlozi iznosi 100 µg mL⁻¹, a u krutoj 50 µg mL⁻¹.

Podloga za selekciju „plavo-bijelo”:

na krutu hranjivu podlogu LB s antibiotikom pomoću štapića po Drygalskom razmaže se 100 μL otopine X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranozid) koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 100 μL otopine IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) koncentracije 10 mM.

3.1.4.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca

Kompleksna hranjiva podloga s glukozom (YPD):

20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} kvašćeva ekstrakta, 20 g L^{-1} glukoze

Kompleksna hranjiva podloga sa ksilozom (YPX20):

YPX20: 20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} kvašćeva ekstrakta, 20 g L^{-1} ksiloze

YPX50: 20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} kvašćeva ekstrakta, 50 g L^{-1} ksiloze

Kompleksna hranjiva podloga s glukozom i ksilozom (YPDX):

20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} kvašćeva ekstrakta, 25 g L^{-1} glukoze, 25 g L^{-1} ksiloze

Kompleksna hranjiva podloga YPD s kalcijevim karbonatom (YPD+ CaCO_3):

20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} kvašćeva ekstrakta, 20 g L^{-1} glukoze, 14 g L^{-1} CaCO_3

Kompleksna hranjiva podloga YPD ili YPX s etanolom (YPD/YPX+EtOH):

20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} kvašćeva ekstrakta, 20 g L^{-1} glukoze, 10 g L^{-1} etanola

3.1.4.2.1. Hranjive podloge s antibioticima

Za selekciju transformanata kvasaca korištene su hranjive podloge s antibioticima geneticinom (G418), higromicinom B i nurseotricinom, a u Tablici 11 su navedene koncentracije antibiotika koje onemogućavaju rast kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus* u tekućim i krutim hranjivim podlogama.

Tablica 10. Koncentracija antibiotika za selekciju transformanata kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus*.

ANTIBIOTIK	KONCENTRACIJA ANTIBIOTIKA KOJA	
	ONEMOGUĆAVA RAST KVASCA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	<i>S. stipitis</i>	<i>K. marxianus</i>
Geneticin (G418)	~*	200
Higromicin B	400	300
Nurseotricin	50	25

* Najviša testirana koncentracija (800 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ne inhibira rast

Osnovna otopina genetica koncentracije 50 mg mL⁻¹ priprema se otapanjem G418 sulfata (Fisher Scientific, SAD) u vodi, osnovna otopina nurseotricina koncentracije 50 mg mL⁻¹ priprema se otapanjem nurseotricina (Jena Bioscience GmbH, Njemačka) u vodi dok se osnovna otopina higromicina B koncentracije 450 000 U mL⁻¹ (ekvivalent masene koncentracije od 400 mg mL⁻¹) kupuje već pripremljena (EMD Millipore Corp., SAD).

3.1.4.3 Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8M) – otopina sadrži 616,6 g L⁻¹ amonijeva acetata otopljenog u vodi. Sterilizira se filtracijom.

EDTA (0,5 M, pH 8,0) – 18,61 g Na₂EDTA x 2H₂O otopi se u 80 mL deionizirane vode nakon čega se podešava pH dodatkom NaOH te se nadopuni deioniziranom vodom do 100 mL.

Fenol – redestilirani fenol otapa se pri 67 °C te se zasiti jednakim volumenom TE pufera (pH 8,0). Otopina se ne sterilizira, a čuva se u tamnoj boci pri 4 °C.

Glukoza (40 g L⁻¹) – sterilizira se autoklaviranjem 15 minuta na 0,5 bara nadtlaka.

Pufer GTE – sadrži 50 mM glukoze; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0). Priprema se neposredno prije upotrebe, iz sterilnih otopina.

Kalij-acetat (3 M, pH 4,8) – otopina je koncentracije 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat. Priprema se dodavanjem 11,5 mL ledene octene kiseline i 28,5 mL deionizirane vode u 60 mL 3 M otopine kalij acetata. Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C.

Kloroform/izoamilni alkohol – smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Ne sterilizira se, a čuva se pri 4 °C.

Litij-klorid (5 M) – sadrži 21,2 g bezvodnog litijevog klorida otopljenog u 100 mL deionizirane vode. Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C.

Natrij-acetat (3 M, pH 4,8) – 24,6 g natrijevog acetata otopi se u deioniziranoj vodi, ledenom octenom kiselinom podesi se pH na 4,8 te se otopina nadopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C.

NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1 % SDS) – sadrži 33,3 g L⁻¹ NaOH (6 M) i 100 mL L⁻¹ SDS (10 %). Priprema se neposredno prije upotrebe i ne sterilizira se.

RNaza (10 mg mL⁻¹) – ribonukleaza A se otopi u 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) i 15 mM natrijevom kloridu, zagrijava se 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji, ohladi se i čuva pri -20 °C.

SCE (1 M sorbitol, 0,1 M natrijev citrat, 0,12 M EDTA) – sadrži 182,17 g L⁻¹ sorbitola, 33,6 g L⁻¹ natrijeva citrata dihidrata i 45 g L⁻¹ Na₂EDTA. Otopina se ne sterilizira.

STE (0,5 % SDS, 0,1 M natrijev citrat, 0,12 M EDTA) – sadrži 50 ml L⁻¹ SDS (10 %), 100 mL L⁻¹ Tris-HCl (1M, pH 8,0), 100 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 0,8). Otopina se ne sterilizira.

Pufer TE (pH 8,0) – sadrži 10 mL L⁻¹ Tris-HCl (1 M, pH 8,0) i 2 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0).

Pufer TE (pH 7,4) – sadrži 10 mL L⁻¹ Tris-HCl (1 M, pH 7,4) i 2 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0).

Tris-HCl (1 M) – 12,1 g Tris otopi se u 80 mL deionizirane vode, dodatkom koncentrirane kloridne kiseline podesi se pH do željene vrijednosti te se otopina dopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Za pripremu pufera TE pH 7,4 potrebno je dodati približno 7,0 mL koncentrirane kloridne kiseline, a za pufer TE pH 8,0 približno 4,2 mL.

Zimoliaza 20-T (5 mg mL⁻¹) – priprema se otapanjem 15 mg zimolijaze (Zymolyase 20-T iz bakterije *Arthrobacter luteus*) u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 mg mL⁻¹. Čuva se pri 20 °C.

3.1.4.4. Otopine za transformaciju bakterijskih i kvašćevih stanica

DTT (100 mM) – sadrži 15,42 g L⁻¹ ditiotreitola. Sterilizira se filtracijom i čuva u tamnoj boci pri 4 °C.

Glicerol (10 %) – sterilizira se autoklaviranjem i čuva pri 4 °C.

Litijev acetat (1 M) – 10,2 g litijeva acetata dihidrata se otopi u 70 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL.

SOC – sadrži 20 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ kvašćeva ekstrakta, 3,6 g L⁻¹ glukoze, 0,6 g L⁻¹ natrijeva klorida, 0,2 g L⁻¹ kalijeva klorida, 2 g L⁻¹ magnezijeva klorida, 2,5 g L⁻¹ magnezijeva sulfata heptahidrata.

Sorbitol (1 M) – 18,2 g sorbitola otopi se u 50 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL.

3.1.4.5. Otopine za agaroznu gel elektroforezu

Agarozni gel (0,8 %) – 0,8 g agaroze otopi se u 100 mL 1x pufera TBE koji se priprema razrjeđivanjem 10x koncentriranog pufera TBE.

Bojilo za nanošenje uzorka na gel (6x konc.) – 0,3 g L⁻¹ bromfenola plavo, 0,3 g L⁻¹ ksilen cijanola FF, 600 mL L⁻¹ glicerola, 100 mL SDS (10 %), 200 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0). Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C.

Bojilo za nanošenje uzorka na gel (6x konc.) – Gel loading dye, purple 6x (New England Biolabs, Ipswich)

Etidijev bromid (10 000x konc.) – osnovna otopina sadrži 10 g L⁻¹ etidijeva bromida. Ne sterilizira se, čuva se u tamnoj boci pri 4 °C. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u 1 L destilirane vode. Ova otopina također se čuva u tamnoj boci.

Pufer TBE (10x konc.) – sadrži 108 g L⁻¹ Tris, 55 g L⁻¹ borne kiseline, 40 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0).

3.1.4.6. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southernu

Amonijev acetat (1 M) – 77,08 g L⁻¹ amonijeva acetata.

DNA nosač (nespecifična DNA) – DNA sperme haringe otopljen u pufer TE (pH 8,0) u koncentraciji od 20 mg mL⁻¹. Čuva se pri -20 °C.

HCl (0,25 M) – 22 mL L⁻¹ koncentrirane kloridne kiseline.

NaOH (0,4 M) – 16,0 g L⁻¹ NaOH.

Otopina A – 100 mL L⁻¹ SSC (20x konc.), 10 mL L⁻¹ SDS (10 %).

Otopina B – 5 mL L⁻¹ SSC (20x koncentriran), 10 mL L⁻¹ SDS (10 %).

Otopina za predhibridizaciju – 250 mL L⁻¹ SSC (20x konc.), 10 g L⁻¹ smjese za sprječavanje nespecifičnih interakcija ('blocking reagent'), 10 mL L⁻¹ N-lauroil sarkozina (10 %), 2 mL L⁻¹ SDS (10 %).

Otopina za hibridizaciju – ima isti sastav kao otopina za predhibridizaciju, ali sadrži dodatno i 20-50 ng mL⁻¹ obilježene DNA (DNA sonde) te 0,1 mg mL⁻¹ DNA nosača.

Pufer 1 – 100 mL L⁻¹ Tris-HCl (1 M, pH 7,4), 5,5 g L⁻¹ borne kiseline, 4 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0).

Pufer 2 – 10 g L⁻¹ smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija ('blocking reagent') otopljenog u puferu 1.

Pufer 3 – 100 mL L⁻¹ Tris-HCl (1 M, pH 9,7), 50 mL NaCl (5 M), 50 mL MgCl₂ (1 M), pH 9,7 (prilagodi se dodatkom koncentrirane kloridne kiseline).

SSC (20x konc.) – 175,35 g L⁻¹ NaCl, 88,20 g L⁻¹ natrijeva citrata dihidrata.

Pufer TE (pH 7,4) – sadrži 10 mL L⁻¹ Tris-HCl (1 M, pH 7,4) i 2 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0).

Pufer TE (pH 9,7) – sadrži 10 mL L⁻¹ Tris-HCl (1 M, pH 9,7) i 2 mL L⁻¹ EDTA (0,5 M, pH 8,0).

Tris-HCl (1 M) – 12,1 g Tris otopi se u 80 mL deionizirane vode, dodatkom koncentrirane kloridne kiseline podesi se pH do željene vrijednosti te se otopina dopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Za pripremu pufera TE pH 7,4 potrebno je dodati približno 7,0 mL koncentrirane kloridne kiseline, a za pufer TE pH 9,7 približno 1 mL.

3.1.4.7. Kemikalije, enzimi i membrane

Agaroz: Sigma-Aldrich, Njemačka.

Ampicilin: Fisher Bioreagents, SAD.

Ditiotreitol: Fisher BioReagents, SAD.

DNA bakteriofaga λ: New England Biolabs, SAD.

DNA sperme haringe: Roche Applied Science, SAD.

Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA: New England Biolabs, SAD; Roche Applied Science, SAD; Fermentas International, Litva.

Etanol (96%): Kefo, Hrvatska.

Etidijev bromid: Roche Applied Science, SAD.

G418 sulfat: Fisher BioReagents, SAD.

Higromicin B: EMD Millipore Corp., SAD.

Kanamycin: BioBasic, Kanada.

Kemikalije za pripremu podloga: Difco, Njemačka i Biolife, Italija.

Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela ('Monarch DNA Gel Extraction Kit'): New England Biolabs, SAD.

Komplet kemikalija za kloniranje PCR produkta ('NEB PCR Cloning Kit'): New England Biolabs, SAD.

Komplet kemikalija za Southern: Roche, Njemačka.

Ksiloza: Fisher Bioreagents, SAD.

Nurseotricin (clonNAT): Jena Bioscience, Njemačka.

Q5 polimeraza: New England Biolabs, Ipswich, MA, SAD.

Ribonukleaza A: BioBasic, Ontario, Kanada.

Sorbitol: Barr, Hrvatska.

X-Gal: Fisher BioReagents, SAD.

Zimoliza (Zymolyase 100-T i 20-T): Seikugaku Kogyo Co. , Japan.

Kemikalije za pripremu ostalih otopina: Sigma-Aldrich, Njemačka; Kemika, Hrvatska; Alkaloid, Makedonija; Fisher Bioreagents, SAD; T.T.T., Hrvatska.

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj bakterije *E. coli*

Bakterija *E. coli* uzgajana je u podlozi LB na tresilici pri 37 °C i na 100 okretaja u minuti. Transformanti se selekcioniraju na podlozi s ampicilinom.

3.2.2. Uzgoj kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus*

Divlji sojevi kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus* uzgajani su u podlozi YPD, dok su transformanti kvasaca uzgajani u podlozi YPD s dodatkom jednog ili više različitih antibiotika (Tablica 10). Svi sojevi kvasaca su prilikom uzgoja inkubirani na tresilici pri 28 °C i 180 okretaja u minuti, osim ako nije drugačije navedeno u opisu eksperimenta.

3.2.2.1. Uzgoj kvasaca *S. stipitis* i *K. marxianus* u svrhu proizvodnje L-laktata i 2,3-butandiola

Za provjeru proizvodnje L-laktata ili 2,3-butandiola u podlogama s različitim izvorima ugljika, pretkulture kvasaca uzgajaju su istim tim podlogama do stacionarne faze (48 – 72 h, ovisno o podlozi i soju). Brojanjem kvašćevih stanica u Thomaovoj komorici odredi se ukupan broj stanica te se određeni volumen pretkulture prenese u 100 mL odgovarajuće tekuće podloge (koja se nalazi u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 500 mL) tako da u podlozi bude $10^6 - 10^7$ stanica po mililitru. Kultura kvašćevih stanica inkubira se u Erlenmeyerovoj tikvici na tresilici pri 28 °C i pri 150 okretaja u minuti, ukoliko u eksperimentu nije navedeno drukčije. Iz tikvice se u određenim vremenskim intervalima uzima uzorak (10 mL) za određivanje ukupnog broja stanica (pomoću Thomaove komorice) i za određivanje broja živih stanica (naciepljivanjem određenog decimalnog razrjeđenja na krute hranjive podloge YPD). Nakon toga se centrifugiranjem iz uzorka izdvoje stanice, a dobiveni supernatant se prenosi u nove kivete i

čuva na -20 °C do mjerenja pH (poglavlje 3.2.10) i analize uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (poglavlje 3.2.11).

3.2.3. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA

3.2.3.1. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

DNA se taloži miješanjem jednog volumena otopine DNA s jednom trećinom volumena 8 M amonijevog acetata i 8/3 volumena etanola (96 %-tni). Dobivena smjesa pažljivo se promiješa okretanjem te inkubira najmanje 2 sata na -20 °C. Nakon inkubacije, uzorak se centrifugira 20 minuta na 14 000 okretaja u minuti pri temperaturi od 4 °C. Supernatant se odbacuje, a talog se suši i otapa u puferu TE (pH 8,0).

3.2.3.2. Pročišćavanje DNA fenolizacijom

Za pročišćavanje DNA fenolizacijom miješa se 1 volumen otopine DNA s pola volumena otopine fenola i pola volumena otopine kloroform/izoamilnog alkohola u omjeru volumena 24:1. Dobivena smjesa snažno se promiješa te centrifugira 2 min pri 12 000 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi. Gornja (vodena) faza prenese se u novu kivetu. Opisani postupak ponavlja se sve dok se nakon centrifugiranja između faza ne prestane pojavljivati proteinski talog, a tada se jedan volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol dodaje izdvojenoj vodenoj fazi (koja sadrži DNA) i opet se snažno promiješa te centrifugira pri istim uvjetima. Dobivena vodena faza pretaloži se dodatkom amonijevog acetata i etanola.

3.2.3.3. Izolacija dvolančanih plazmida

Za izolaciju dvolančanih plazmida iz bakterije *E. coli* korištena je standardna metoda alkalne lize (Green i Sambrook, 2012), uz manje modifikacije. Plazmidi korišteni za konstrukciju plazmida i transformaciju kvasaca izolirani su iz velikog volumena (500 mL), dok su u svim ostalim slučajevima plazmidi izolirani iz malog volumena (3 mL) bakterijske kulture.

3.2.3.3.1. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture

Iz prekončne bakterijske kulture volumena 500 mL centrifugiranjem se izdvoje stanice (10 min pri 5000 okretaja u minuti i pri 22 °C). Talog stanica resuspendira se u 10 mL hladnog pufera GTE i inkubira na ledu 5 min. Suspenziji stanica dodaje se 20 mL svježe pripremljene

otopine NaOH/SDS te se smjesa promiješa okretanjem i ponovno inkubira na ledu 5 min. Nakon inkubacije, dodaje se 6 mL hladnog kalijevog acetata (3 M), smjesa se promiješa okretanjem i inkubira na ledu 20 minuta. Centrifugiranjem (20 min pri 12 000 okretaja u minuti i pri 4 °C) se istalože proteini, a dobiveni supernatant pažljivo se prenese u novu kivetu u koju se dodaje volumen izopropanola jednak 0,7 volumena prenesenog supernatanta. Nakon dodatka izopropanola, smjesa se promiješa okretanjem i centrifugira 20 min pri 12 000 okretaja u minuti i pri 4 °C. Dobiveni talog se osuši i otopi u 300 µL pufera TE uz dodatak RNaze. Ovako dobivenu otopinu DNA potrebno je pročistiti fenolizacijom (poglavlje 3.2.3.2) i pretaložiti amonijevim acetatom i etanolom (poglavlje 3.2.3.1).

3.2.3.3.2. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture

Stanice su iz 3 mL prekonoćne bakterijske kulture izdvojene centrifugiranjem (1 min pri 10 000 okretaja u minuti i pri 22 °C) te su resuspendirane u 120 µL hladnog pufera GTE i inkubirane na ledu 5 min. Suspenziji stanica dodaje se 240 µL svježe pripremljene otopine NaOH/SDS te se cjelokupni sadržaj promiješa okretanjem kivete. Nakon miješanja, u kivetu se dodaje 360 µL hladnog natrijevog acetata (3 M), cjelokupni sadržaj se ponovno promiješa okretanjem te inkubira na ledu 10 min. Centrifugiranjem (10 min pri 12 000 okretaja u minuti i pri 4 °C) se istalože proteini, a dobiveni supernatant (630 µL) prenese se u novu kivetu i pomiješa s 390 µL izopropanola. Centrifugiranjem (20 min pri 12 000 okretaja u minuti i pri 4 °C) se istalože nukleinske kiseline. Supernatant se odbacuje, a talog se suši i otapa u 300 µL pufera TE, uz dodatak RNaze. Ovako dobivenu DNA potrebno je pretaložiti pomoću amonijevog acetata i etanola (poglavlje 3.2.3.1).

3.2.3.4. Izolacija kvašćeve DNA

Za izolaciju kvašćeve DNA korištena je metoda koju su opisali Winston i sur. (1983). U 4 mL tekuće hranjive podloge uzgoji se kvasac do stacionarne faze (48 h), a zatim se stanice kvasca izdvoje iz podloge centrifugiranjem 5 min pri 3000 okretaja u minuti. Talog stanica ispiri se dva puta u vodi te jednom u otopini SCE. Nakon ispiranja, talog stanica resuspendira se u 180 µL otopine SCE, suspenziji se dodaje 20 µL enzima zimolijaze (20 T) te se suspenzija inkubira 1 sat na 37 °C. Suspenziji se zatim dodaje 800 µL otopine STE, promiješa se okretanjem, inkubira 20 min na 70 °C i stavi u led na 10 min. Kad se suspenzija ohladi, dodaje se 200 µL kalijeva acetata (5 M, pH 4,8) te se inkubira na ledu najmanje 2 sata. Nakon

inkubacije, suspenzija se centrifugira 20 min pri 12 000 okretaja u minuti i pri 4 °C čime se istalože proteini koji se odbacuju, a 970 µL supernatanta se prenese u novu kivetu u koju se dodaje i 630 µL izopropanola. Nakon dodatka izopropanola, uzorci se pažljivo promiješaju okretanjem i centrifugiraju 20 min pri 12 000 okretaja u minuti i pri 4 °C. Dobiveni talog nukleinskih kiselina se osuši i otopi u 300 µL pufera TE (pH 8,0), uz dodatak RNaze, te se provede postupak taloženja DNA amonijevim acetatom i etanolom (poglavlje 3.2.3.1).

3.2.3.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Iz agaroznog gela DNA je izolirana prema uputama proizvođača kompleta kemikalija 'Monarch DNA Gel Extraction Kit' (New England Biolabs, SAD).

3.2.4. Cijepanje i modifikacija DNA

Cijepanje i modifikacija DNA u ovom radu provedeni su prema uputama proizvođača restrikcijskih i modifikacijskih enzima (New England Biolabs, SAD; Roche Applied Science, SAD; Fermentas International, Litva).

3.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Prilikom konstrukcije plazmida i provjere sojeva kvasaca pojedini dijelovi drugih plazmida i genoma kvasaca umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom (PCR) primjenom polimeraze Q5 (New England Biolabs, SAD). Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije postavljeni su prema uputama proizvođača, a reakcije su se provodile u 30 ciklusa.

3.2.6. Elektroforeza u agaroznom gelu

Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze u puferu TBE (1x) višestrukim zagrijavanjem do vrenja pomoću mikrovalne pećnice. Ovisno o eksperimentu, koncentracija agaroze u gelu može biti od 0,7 do 2 %. Kad se agaroz otopi u puferu TBE i gel se ohladi na od 50 do 60 °C, izlijeva se u kalup. Za elektroforezu je korištena aparatura BioRad MiniSub Cell i BioRad Wide MiniSub Cell (BioRad, SAD) te Axygen Horizontal Gel Box, 7 cm (Corning, New York, SAD). Za vizualizaciju DNA korištena je otopina etidijeva bromida i UV transiluminator (Vilber Lourmat, Njemačka).

3.2.7. Hibridizacija DNA po Southernu

Metodom hibridizacije DNA po Southernu moguće je detektirati fragmente komplementarne označenoj DNA-probi koju čine molekule DNA s dioksigeninom obilježenim deoksiuridin-trifosfatom (dUTP). Detekcija se ostvaruje enzimskom aktivnošću alkalne fosfataze fuzionirane s dUTP-antitijelom. Metoda je provedena prema uputama proizvođača kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA, uz manje modifikacije (Štafa i sur., 2014).

3.2.7.1. Prijenos DNA na membranu

Provede se agarozna gel-elektroforeza željenih uzoraka, a zatim se agarozni gel inkubira 20 min u kloridnoj kiselini (0,25 M) te se ispiru u destiliranoj vodi i inkubira u otopini NaOH/amonij acetat 20 min. Za prijenos DNA na membranu koristi se uređaj za prijenos vakuumom (GE Healthcare Biosciences, New Jersey, SAD), uz podtlak od 15 kPa, pri čemu je gel uronjen u otopinu NaOH (0,4 M). Membrana se nakon prijenosa DNA ispiru u amonijevu acetatu (1 M) i inkubira 20 min pri 120 °C.

3.2.7.2. Predhibridizacija i hibridizacija

Hibridizacija se provodi inkubacijom membrane u otopini za predhibridizaciju (0,5 mL otopine za predhibridizaciju po 1 cm²) tijekom 2 do 3 sata pri 68 °C. Hibridizacija se događa u otopini za hibridizaciju tijekom 18 h, pri istim uvjetima kao i predhibridizacija. Volumen otopine za hibridizaciju iznosi 10 do 20 % volumena otopine za predhibridizaciju.

3.2.7.3. Posthibridizacijsko ispiranje

Nakon hibridizacije potrebno je isprati membranu dva puta s po 50 mL otopine A u trajanju od 10 min te dva puta s po 25 mL otopine B u trajanju od 15 min pri 68 °C.

3.2.7.4. Detekcija

U koraku detekcije potrebno je membranu isprati: kratko u 100 mL pufera 1, 1 h u 100 mL pufera 2, 30 min u 20 mL pufera 2 u kojeg su dodana i 4 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze, dva puta po 15 min u 100 mL pufera 1 i kratko u puferu 3. Poslije ispiranja, membrana se inkubira u 10 mL pufera 3 uz dodatak 35 µL X-fosfata (5-brom-4-klor-indolil-

fosfat) i 45 μ L NBT-a (nitrozo-plavi-tetrazolij) u mraku pri 37 °C, do pojave tamno obojenih vrpca. Reakcija se zaustavlja ispiranjem membrane u destiliranoj vodi, nakon čega se posuši na zraku.

3.2.8. Transformacija bakterije *E. coli*

Bakterija *E. coli* transformirana je metodom elektroporacije upotrebom aparata BioRad MicroPulser™ (BioRad, Hercules, CA, SAD). Stanice su pripremljene i transformirane prema uputama proizvođača.

3.2.9. Transformacija stanica kvasca

Kvasci *S. stipitis* i *K. marxianus* transformirani su metodom elektroporacije, s time da je za transformaciju kvasca *K. marxianus* korišten uređaj BioRad MicroPulser™ (napon 1,8 kV), dok je za transformaciju kvasca *S. stipitis* korišten uređaj BioRad GenePulser Xcell™ (napon 2,0 kV, kapacitet 25 μ F, otpor 200 Ω). Ostatak protokola jednak je za oba kvasca. Najprije se stanice uzgoje u 200 mL podloge YPD do gustoće stanica od 5×10^7 do 2×10^8 po mililitru. Nakon uzgoja, kultura kvašćevih stanica ohladi se na ledu 15 minuta i centrifugira 5 min pri 3 000 okretaja u minuti pri 4 °C. Dobiveni talog stanica ispire se dva puta u velikom volumenu (200 mL) hladne deionizirane sterilne vode. Stanice se zatim resuspendiraju u 25 mL 0,1 M litijeva acetata i 90 mM DTT te se inkubiraju 45 min pri 28 °C, uz lagano miješanje. Nakon toga suspenzija se ponovno centrifugira 5 min pri 3 000 okretaja u minuti pri 4 °C, a dobiveni talog stanica se ispire u 25 mL hladne vode, a zatim i u 25 mL hladnog sorbitola (1 M). Na kraju se stanice resuspendiraju u hladnom sorbitolu (1 M) tako da ukupni volumen suspenzije bude 500 μ L. Po 40 μ L suspenzije prenosi se u nove kivete na ledu te se pomiješaju s 1 do 5 μ L DNA i inkubiraju na ledu 5 min. Prije elektroporacije, smjesa stanica i DNA premješta se u hladnu kivetu za elektroporaciju te se pomoću uređaja za elektroporaciju podvrgne električnom pulsu. Korištene kivete za elektroporaciju su širine 2 mm. Nakon elektroporacije, stanice se resuspendiraju u 1 mL otopine sastava YPD:sorbitol (1 M) u omjeru 1:1 i premjeste iz kivete za elektroporaciju u obične kivete. Zatim slijedi inkubacija od 3 h na 28 °C nakon čega se stanice naciepljuju na krute selektivne podloge.

3.2.10. Mjerenje pH

pH vrijednosti uzoraka izmjerene su pomoću Schott CG 842 (Mainz, Njemačka) laboratorijskog pH-metra. Kalibracija sustava postignuta je uranjanjem pH-elektrode u pufer pH 4 i pH 7.

3.2.11. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)

Uzorci se pomiješaju s otopinom $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ koncentracije 100 g L^{-1} u omjeru 1:1 kako bi se istaložili proteini. Proteini se talože tijekom 10 min, a zatim se uzorak centrifugira 5 min pri 13 000 okretaja u minuti. Dobiveni supernatant filtrira se u vijale kroz celuloza-acetat filter za šprice promjera pora $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Pripremljeni uzorci analiziraju se tekućinskom kromatografijom pri čemu se za analizu koristi kolona Rezex ROA-Organic Acid H^+ ($15 \text{ cm} \times 7,2 \text{ mm}$, Phenomenex, SAD), uz otopinu sumporne kiseline u vodi ($0,0025 \text{ M}$) kao mobilnu fazu. Temperatura pećnice iznosi $60 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura RID detektora $40 \text{ }^\circ\text{C}$, a injektira se $10 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka uz protok mobilne faze od $0,6 \text{ mL min}^{-1}$.

4. REZULTATI

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost konstrukcije sojeva nekonvencionalnih kvasaca za primjenu u proizvodnji L-laktata i 2,3-butandiola. Na temelju ranijih istraživanja odlučeno je da će se za proizvodnju željenih biokemikalija istovremeno razvijati dvije različite vrste nekonvencionalnih kvasaca, odnosno *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus*. U svrhu provedbe istraživanja, najprije je bilo potrebno konstruirati ekspresijske plazmide i plazmide za inaktivaciju nativnih gena u ovim kvascima (poglavlje 4.1), a zatim konstruirati željene sojeve nekonvencionalnih kvasaca s izmijenjenim metabolizmom ugljika (poglavlja 4.2 i 4.3). Nizom eksperimenata fermentacije u različitim uvjetima uzgoja ustanovljeno je da su sojevi konstruirani u ovom radu znatno bolji producenti L-laktata (poglavlje 4.4) i 2,3-butandiola (poglavlje 4.5) od divljih sojeva.

4.1. Konstrukcija plazmida

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.1. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.1.1. Konstrukcija plazmida pRS54FcoH-Ssc

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.1.2. Konstrukcija plazmida pRS53coH-Kmc2 i pRS53coH-Kmc2-Kmc1

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.2. Ekspresijski plazmidi za konstrukciju producenata 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.2.1. Konstrukcija plazmida pM-STaS-coN i pRS54FcoH-SPaD

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.2.2. Konstrukcija plazmida pRS53coH-KPaD-KTaS, pRS53coN-KEB i pUC-KPhnE-coK

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.3. Plazmidi za inaktivaciju nativnih gena kvasca *K. marxianus*

Neobjavljeni sadržaj.

4.1.4. Plazmid sa skraćenom regijom *f1 ori*

Neobjavljeni sadržaj.

4.2. Konstrukcija sojeva za proizvodnju L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

4.2.1. Konstrukcija soja kvasca *S. stipitis* za proizvodnju L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

4.2.2. Konstrukcija sojeva kvasca *K. marxianus* za proizvodnju L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

4.2.2.1. Konstrukcija sojeva KL1 i KL2

Neobjavljeni sadržaj.

4.2.2.2. Konstrukcija soja KL2p

Neobjavljeni sadržaj.

4.3. Konstrukcija sojeva za proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.1. Konstrukcija soja kvasca *S. stipitis* za proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2. Konstrukcija sojeva kvasca *K. marxianus* za proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2.1. Konstrukcija soja KB2

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2.2. Konstrukcija soja KB3

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2.3. Konstrukcija soja KB2p

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2.4. Konstrukcija soja KB2g

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2.5. Konstrukcija soja KB2N

Neobjavljeni sadržaj.

4.3.2.6. Konstrukcija soja KB2Ng

Neobjavljeni sadržaj.

4.4. Proizvodnja L-laktata pomoću kvasaca *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus*

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1. Proizvodnja L-laktata pomoću kvasca *S. stipitis*

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.1. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.1.1. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.1.2. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD s dodatkom kalcijeva karbonata ili etanola

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.2. Proizvodnja L-laktata fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.2.1. Proizvodnja L-laktata u hranjivim podlogama YPX20 i YPX50

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.2.2. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPX20 s dodatkom etanola

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.1.3. Proizvodnja L-laktata kofermentacijom glukoze i ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2. Proizvodnja L-laktata pomoću kvasca *K. marxianus*

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.1. Proizvodnja L-laktata pomoću sojeva KL1 i KL2

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.1.1. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.1.1.1. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.1.1.2. Proizvodnja L-laktata u hranjivoj podlozi YPD s dodatkom kalcijeva karbonata

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.1.2. Proizvodnja L-laktata fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.1.3. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze i ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.2. Proizvodnja L-laktata pomoću soja KL2p

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.2.1. Proizvodnja L-laktata fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.2.2. Proizvodnja L-laktata fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.4.2.2.3. Proizvodnja L-laktata kofermentacijom glukoze i ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasaca *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus*

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasca *S. stipitis*

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.1.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.1.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.1.3. Proizvodnja 2,3-butandiola kofermentacijom glukoze i ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću kvasca *K. marxianus*

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.1. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.1.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.1.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.1.3. Proizvodnja 2,3-butandiola kofermentacijom glukoze i ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.2. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB3

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.3. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2p

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.4. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2g

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.4.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.4.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.5. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2N

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.6. Proizvodnja 2,3-butandiola pomoću soja KB2Ng

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.6.1. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom glukoze

Neobjavljeni sadržaj.

4.5.2.6.2. Proizvodnja 2,3-butandiola fermentacijom ksiloze

Neobjavljeni sadržaj.

5. RASPRAVA

Lignoceluloza je najzastupljeniji biopolimer na Zemlji (Suresh i sur., 2019) te predstavlja obećavajuću alternativu fosilnim gorivima u proizvodnji biogoriva i biokemikalija. No, biotehnološku primjenu lignoceluloznih sirovina otežava nužna i energetski zahtjevna hidroliza koja rezultira nastankom različitih inhibitora rasta i fermentacije. Osim što neki mikroorganizmi ne mogu rasti na takvim hidrolizatima, efikasno korištenje lignoceluloznih sirovina otežano je i zbog činjenice da brojni mikroorganizmi ne mogu učinkovito metabolizirati druge produkte razgradnje lignoceluloze osim glukoze (Zhao i sur., 2020).

Kako bi se ovi nedostaci premostili, intenzivno se istražuju različiti mikroorganizmi s industrijski poželjnim karakteristikama, a jedni od tih mikroorganizama su i nekonvencionalni kvasci *Scheffersomyces stipitis* i *Kluyveromyces marxianus*. Prema literaturnim podacima, kvasac *S. stipitis* prikladan je domaćin za proizvodnju brojnih biokemikalija prvenstveno zbog iznimno efikasne fermentacije ksiloze te sposobnosti rasta na jeftinim podlogama, a zahvaljujući umjerenoj toleranciji na nizak pH, prikladan je, primjerice, i za proizvodnju L-laktata (Ilmén i sur., 2007). Kvasac *K. marxianus* se kao radni mikroorganizam ističe zbog termotolerantnosti, visoke stope rasta te sposobnosti metaboliziranja širokog spektra ugljikohidrata (Baptista i Domingues, 2022). Primjenu ova dva kvasca značajno olakšava činjenica da su im genomi potpuno sekvencionirani (Jeffries i sur., 2007; Nambu-Nishida i sur., 2017), a zbog svega navedenog, kvasci *S. stipitis* i *K. marxianus* su u ovom radu odabrani za konstrukciju sojeva producenata industrijski važnih biokemikalija, L-laktata i 2,3-butandiola.

5.1. Konstrukcija sojeva

Neobjavljeni sadržaj.

5.2. Proizvodnja biokemikalija pomoću kvasca *S. stipitis*

Neobjavljeni sadržaj.

5.2.1. Utjecaj ekspresije gena *ldhL1* i *ldhL2* na proizvodnju L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

5.2.2. Utjecaj ekspresije gena *alsS* i *alsD* na proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

5.3. Proizvodnja biokemikalija pomoću kvasca *K. marxianus*

Neobjavljeni sadržaj.

5.3.1. Utjecaj ekspresije gena *ldhL1* i *ldhL2* na proizvodnju L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

5.3.2. Utjecaj inaktivacije gena *PDC1* na proizvodnju L-laktata

Neobjavljeni sadržaj.

5.3.3. Utjecaj ekspresije gena *alsS*, *alsD* i *BDH1* na proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

5.3.4. Utjecaj zaustavljanja kompetitivnih metaboličkih puteva na proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

5.3.5. Utjecaj ekspresije gena *noxE* na proizvodnju 2,3-butandiola

Neobjavljeni sadržaj.

6. ZAKLJUČCI

Neobjavljeni sadržaj.

7. POPIS LITERATURE

Abd Alsaheb RA, Aladdin A, Zalina Othman N, Abd Malek R (2015) Recent applications of polylactic acid in pharmaceutical and medical industries. *J Chem Pharm Res* **7**(12), 51-63.

Abdel-Banat BM, Nonklang S, Hoshida H, Akada R (2010) Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* **27**(1), 29-39.

Abdel-Hamid AM, Solbiati JO, Cann IK (2013) Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Adv Appl Microbiol* **82**, 1-28.

Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, Nikawa J-I, Shimizu K (1998) Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J Ferment Bioeng* **86**(3), 284-289.

Agbogbo FK, Coward-Kelly G (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* **30**, 1515–1524.

Alexandri M, Schneider R, Mehlmann K, Venus J (2019) Recent advances in d-lactic acid production from renewable resources: Case studies on agro-industrial waste streams. *Food Technol Biotechnol* **57**, 293–304.

Alrikabi N (2014) Renewable Energy Types. *J Clean Energy Technol* 61–64.
<https://doi.org/10.7763/jocet.2014.v2.92>

Altting-Mees MA, Short JM (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* **17**, 9494-9494.

Anu, Kumar A, Rapoport A, Kunze G, Kumar S, Singh D, i sur. (2020) Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. *Renew Energy* **160**, 1228–1252.

Bae JH, Kim HJ, Kim MJ, Sung BH, Jeon JH, Kim HS, i sur. (2018) Direct fermentation of Jerusalem artichoke tuber powder for production of L-lactic acid and D-lactic acid by metabolically engineered *Kluyveromyces marxianus*. *J Biotechnol* **266**, 27–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.001>

- Bai Y, Feng H, Liu N, Zhao X (2023) Biomass-derived 2,3-butanediol and its application in biofuels production. *Energies* (Basel) **16**
- Baptista M, Domingues L (2022) *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnol Adv* 108027.
- Batt CA (2014) *Kluyveromyces*. In: Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. Elsevier Inc., p 389–391.
- Białkowska AM (2016) Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol Biotechnol* **32**
- Bianchi MM, Brambilla L, Protani F, Liu CL, Lievens J, Porro D (2001) Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5621–5625. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5621-5625.2001>
- Cadete RM, Rosa CA (2018) The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast* **35**, 191–199. <https://doi.org/10.1002/yea.3279>
- Cao M, Gao M, Ploessl D, Song C, Shao Z (2018) CRISPR-mediated genome editing and gene repression in *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol J* **13**. <https://doi.org/10.1002/biot.201700598>
- Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RP de S (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol* **30**, 70–83.
- Celińska E, Grajek W (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. *Biotechnol Adv* **27**, 715–725.
- Chaabane FB, Marchal R (2013) Upgrading the hemicellulosic fraction of biomass into biofuel. *Oil Gas Sci Technol* **68(4)**, 663-680.
- Chen H, Liu J, Chang X, Chen D, Xue Y, Liu P, i sur. (2017) A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process Technol* **160**, 196–206.
- Choo JH, Han C, Lee DW, Sim GH, Moon HY, Kim JY, i sur. (2018) Molecular and functional characterization of two pyruvate decarboxylase genes, *PDC1* and *PDC5*, in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 3723-3737.

- Colombie S, Dequin S, Sablayrolles JM (2003) Control of lactate production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a bacterial LDH gene. *Enzyme Microb Technol* **33**(1), 38-46.
- Cunha JT, Romaní A, Costa CE, Sá-Correia I, Domingues L (2019) Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 159–175.
- Dashtban M, Wen X, Bajwa PK, Ho CY, Lee H (2015) Deletion of *hxx1* gene results in derepression of xylose utilization in *Scheffersomyces stipitis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**, 889–896. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1614-9>
- Defosse TA, Courdavault V, Coste AT, Clastre M, de Bernonville TD, i sur. (2018) A standardized toolkit for genetic engineering of CTG clade yeasts. *J Microbiol Methods* **144**, 152-156.
- Deibel Jr MR, Hiebsch RR, Klein RD (1988) Secreted amylolytic enzymes from *Schwanniomyces occidentalis*: purification by fast protein liquid chromatography (FPLC) and preliminary characterization. *Prep Biochem* **18**(1), 77-120.
- Dequin S, Barre P (1994) Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **12**(2) 173–177. <https://doi.org/10.1038/nbt0294-173>
- Ditu L-M, Gheorghe I (2017) Introduction in Soft Chemistry and Food Fermentation. In: Soft Chemistry and Food Fermentation. Elsevier, p 1–19.
- Doğan A, Demirci S, Aytekin AÖ, Şahin F (2014) Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* **174**, 28-42.
- Du C, Li Y, Zhao X, Pei X, Yuan W, Bai F, Jiang Y (2019) The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 2845-2855.
- Engel SR, Dietrich FS, Fisk DG, Binkley G, Balakrishnan R, Costanzo MC, i sur. (2014) The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3: Genes Genomes Genet* **4**, 389–398. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008995>
- Fugelsang KC (1997) Wine microbiology. Chapman and Hall, New York, NY.

Gellissen G, Hollenberg CP (1999) *Hansenula*. In: Encyclopedia of Food Microbiology, Vol. 2. Academic Press. San Diego, CA, USA, p 976–982.

Ghosh K, Majumdar A (2015) L-Amino acid derived pyridinium-based chiral compounds and their efficacy in chiral recognition of lactate. *RSC Adv* **5**, 24499–24506. <https://doi.org/10.1039/c5ra00017c>

Glick BS (1996) Cell biology: Alternatives to baker's yeast. *Curr Biol* **6**, 1570–1572

Goldstein AL, McCusker JH (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15(14)**, 1541–1553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)

Gomes AC, Moura GR, Santos MA (2011) The genetic code of the *Candida* CTG clade. In: *Candida and Candidiasis*, Second Edition, ASM Press, p 45-55.

Gräffe H, Körnig W, Weitz H-M, Reiß W, Steffan G, Diehl H, i sur. (2019) Butanediols, Butenediol, and Butynediol. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p 1–12.

Green MR, Sambrook J (2012) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guo W, Jia W, Li Y, Chen S (2010) Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics. *Appl Biochem Biotechnol* **161**, 124–136. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8857-8>

Hensing MCM, Rouwenhorst RJ, Heijnen JJ, Van Dijken JR, Pronk & JT (1995) Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**, 261-279.

Hoffman CS, Wood V, Fantes PA (2015) An ancient yeast for young geneticists: A primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics* **201**, 403–423. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181503>

Hohmann S (1991) Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173(24)**, 7963-7969.

Huang EL, Lefsrud MG (2012) Temporal analysis of xylose fermentation by *Scheffersomyces stipitis* using shotgun proteomics. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**, 1507–1514. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1147-4>

Ikushima S, Fujii T, Kobayashi O, Yoshida S, Yoshida A (2009) Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1818–1824. <https://doi.org/10.1271/bbb.90186>

Ilmén M, Koivuranta K, Ruohonen L, Rajgarhia V, Suominen P, Penttilä M (2013) Production of L-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases. *Microb Cell Fact* **12**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-53>

Ilmén M, Koivuranta K, Ruohonen L, Suominen P, Penttilä M (2007) Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 117–123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01311-06>

Ingledeu WM (1987) *Schwanniomyces*: a potential superyeast? *Crit Rev Biotechnol* **5(2)**, 159–176.

Irzykowska L, Waśkiewicz A (2014) *Hansenula*: biology and applications. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Second edition. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, p 121–124.

Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, Nagamori E, Matsuyama T, Kitamoto K, i sur. (2005) Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1964–1970. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1964-1970.2005>

Jansen NB, Flickinger MC, Tsao GT (1984) Production of 2, 3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnol Bioeng* **26(4)**, 362–369.

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(3)**, 319–326.

Ji XJ, Huang H, Ouyang PK (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* **29**, 351–364.

Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Ren LJ, Nie ZK, Du J, i sur. (2010) Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde

dehydrogenase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1751–1758.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2222-2>

Jia RR, Lv SL, Chai CY, Hui FL (2020) Three new *Scheffersomyces* species associated with insects and rotting wood in China. *MycoKeys* **71**, 87–99.
<https://doi.org/10.3897/MYCOKEYS.71.56168>

Jiayang Q, Zijun X, Cuiqing M, Nengzhong X, Peihai L, Ping X (2006) Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. *Chin J Chem Eng* **14(1)**, 132–136.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337(6096)**, 816–821.

Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* **6(1)**, 1–10.

Jung YH, Kim KH (2015) Acidic Pretreatment. U: Pretreatment of biomass, (Pandey, A., Negi, S., Binod, P., Larroche, C., ured.), Elsevier, Amsterdam/Oxford/Waltham, str. 27–50.

Juturu V, Wu JC (2016) Microbial production of lactic acid: the latest development. *Crit Rev Biotechnol* **36**, 967–977.

Kargbo H, Harris JS, Phan AN (2021) “Drop-in” fuel production from biomass: Critical review on techno-economic feasibility and sustainability. *Renew Sustain Energy Rev* **135**

Kim S, Hahn JS (2015) Efficient production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating ethanol and glycerol production and redox rebalancing. *Metab Eng* **31**, 94–101.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.07.006>

Kim SJ, Kim JW, Lee YG, Park YC, Seo JH (2017) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 2, 3-butanediol production. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 2241–2250.

Kim SJ, Seo SO, Jin YS, Seo JH (2013) Production of 2, 3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* **146**, 274–281.

Kim SJ, Seo SO, Park YC, Jin YS, Seo JH (2014) Production of 2,3-butanediol from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **192**, 376–382.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.017>

- Kong X, Zhang B, Hua Y, Zhu Y, Li W, Wang D, i sur. (2019) Efficient L-lactic acid production from corn cob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast. *Bioresour Technol* **273**, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.018>
- Kumar A, Grover S, Sharma J, Batish VK (2010) Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions. *Crit Rev Biotechnol* **30**, 243–258.
- Kurtzman CP (2011a) *Scheffersomyces* Kurtzman & M. Suzuki (2010) In: The Yeasts, Elsevier, p 773–777. doi:10.1016/b978-0-444-52149-1.00065-3
- Kurtzman CP (2011b) *Yarrowia* van der Walt & von Arx (1980). In: The Yeasts. Elsevier, p 927–929.
- Kurtzman CP, Boekhout T (2017) Yeasts as distinct life forms of fungi. In: Yeasts in natural ecosystems: Ecology. Springer International Publishing, p 1–37.
- Lamers D, Visscher B, Weusthuis RA, Francke C, Wijffels RH, Lokman C (2019) Overexpression of delta-12 desaturase in the yeast *Schwanniomyces occidentalis* enhances the production of linoleic acid. *Bioresour Technol* **289**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121672>
- Lane MM, Morrissey JP (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol Rev* **24**, 17–26.
- Larroude M, Rossignol T, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R (2018) Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Adv* **36**, 2150–2164.
- Lau C-H, Tin C, Suh Y (2020) CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction. *Fac Rev* **9**. <https://doi.org/10.12703/r/9-20>
- Lee JW, In JH, Park JB, Shin J, Park JH, Sung BH, i sur. (2017) Co-expression of two heterologous lactate dehydrogenases genes in *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production. *J Biotechnol* **241**, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.015>
- Lee YG, Seo JH (2019) Production of 2,3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* **12**. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1545-1>

Leonel LV, Arruda PV, Chandel AK, Felipe MGA, Sene L (2021) *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. *Crit Rev Biotechnol* **41**, 1131–1152.

Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, Suzuki Y, Rodrussamee N, Matsutani M, i sur. (2015) Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol biofuels* **8**, 1-14.

Li Y, Zhao X, Yao M, Yang W, Han Y, Liu L, i sur. (2023) Mechanism of microbial production of acetoin and 2,3-butanediol optical isomers and substrate specificity of butanediol dehydrogenase. *Microb Cell Fact* **22**

Lima CS, Neitzel T, Pirolla R, dos Santos LV, lenczak JL, Roberto IC, i sur. (2022) Metabolomic profiling of *Spathaspora passalidarum* fermentations reveals mechanisms that overcome hemicellulose hydrolysate inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**, 4075–4089. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11987-y>

Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA (2018) Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* **25**, 1234–1257.

Liu T, Sun L, Zhang C, Liu Y, Li J, Du G, Lv X, Liu L (2023) Combinatorial metabolic engineering and process optimization enables highly efficient production of L-lactic acid by acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* **379**, 129023.

Liu ZL (2006) Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* **73(1)**, 27-36.

Lo SC, Yang CY, Mathew DC, Huang CC (2021) Growth and autolysis of the kefir yeast *Kluyveromyces marxianus* in lactate culture. *Sci Rep* **11(1)**, 14552.

Löbs AK, Engel R, Schwartz C, Flores A, Wheeldon I (2017) CRISPR–Cas9-enabled genetic disruptions for understanding ethanol and ethyl acetate biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol biofuels* **10(1)**, 1-14.

Long TM, Su YK, Headman J, Higbee A, Willis LB, Jeffries TW (2012) Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Environ Microbiol* **78**, 5492–5500. <https://doi.org/10.1128/AEM.00374-12>

Luterbacher JS, Martin Alonso D, Dumesic JA (2014) Targeted chemical upgrading of lignocellulosic biomass to platform molecules. *Green Chem* **16**, 4816–4838.

Maddox IS (1996) Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: Biotechnology, p 269–291. doi:10.1002/9783527620883.ch7

Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol* **101(22)**, 8493–8501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.092>

Madzak C (2021) *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: How natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement. *J Fungi* **7(7)**, 548.

Magee RJ, Kosaric N (1987) The microbial production of 2, 3-butanediol. In: Advances in applied microbiology. Vol. 32. Academic Press, p 89-161.

Manfrão-Netto JHC, Gomes AMV, Parachin NS (2019) Advances in using *Hansenula polymorpha* as chassis for recombinant protein production. *Front Bioeng Biotechnol* **7**. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00094>

Maresca D, Zotta T, Mauriello G (2018) Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains. *Front microbiol* **9**, 157.

Matanović A, Arambašić K, Žunar B, Štafa A, Miklenić MS, Šantek B, i sur. (2022) Toolbox for genetic transformation of non-conventional *Saccharomycotina* yeasts: High efficiency transformation of yeasts belonging to the *Schwanniomyces* genus. *J Fungi* **8**. <https://doi.org/10.3390/jof8050531>

McKendry P (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol* **83(1)**, 37-46.

Merico A, Sulo P, Piškur J, Compagno C (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS Journal* **274**, 976–989. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05645.x>

Miklenić M, Žunar B, Štafa A, Svetec IK (2015) Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res* **15**. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov096>

Mittelman K, Barkai N (2017) The genetic requirements for pentose fermentation in budding yeast. *G3* **7(6)**, 1743–1752. <https://doi.org/10.1534/g3.117.039610>

- Mukherjee V, Radecka D, Aerts G, Verstrepen KJ, Lievens B, Thevelein JM (2017) Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels* **10**. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0899-5>
- Muscat A, de Olde EM, de Boer IJM, Ripoll-Bosch R (2020) The battle for biomass: A systematic review of food-feed-fuel competition. *Glob Food Secur-Agr* **25**. doi:10.1016/j.gfs.2019.100330
- 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), 8993.
- Nevoigt E (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol* **72**, 379–412. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00025-07>
- Ojo AO, de Smidt O (2023) Lactic acid: a comprehensive review of production to purification. *Processes* **11**(3), 688.
- Osawa F, Fujii T, Nishida T, Tada N, Ohnishi T, Kobayashi O, i sur. (2009) Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast* **26**, 485–496. <https://doi.org/10.1002/yea.1702>
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol* **74**(1), 25-33.
- Papini M, Nookaew I, Uhlén M, Nielsen J (2012) *Scheffersomyces stipitis*: A comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **11**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-136>
- Papon N, Courdavault V, Clastre M (2014) Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era. *Trends Biotechnol* **32**, 167–168.
- Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* **6**(1), 1.
- Péres EUX, Souza FG de, Silva FM, Chaker JA, Suarez PAZ (2014) Biopolyester from ricinoleic acid: Synthesis, characterization and its use as biopolymeric matrix for magnetic nanocomposites. *Ind Crops Prod* **59**, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.031>

Ping Y, Ling HZ, Song G, Ge JP (2013) Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J* **75**, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.022>

Pohanka M (2020) D-Lactic Acid as a metabolite: toxicology, diagnosis, and detection. *Biomed Res Int* **2020**. <https://doi.org/10.1155/2020/3419034>

Porro D, Bianchi MM, Brambilla L, Menghini R, Bolzani D, Carrera V, i sur. (1999) Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts. *Appl Environ Microbiol* **65(9)**, 4211-4215.

Porro D, Brambilla L, Ranzi BM, Martegani E, Alberghina L (1995) Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid. *Biotechnol Prog* **11(3)**, 294-298.

Puseenam A, Tanapongpipat S, Roongsawang N (2015) Co-expression of endoxylanase and endoglucanase in *Scheffersomyces stipitis* and its application in ethanol production. *Appl Biochem Biotech* **177**, 1690-1700.

Qi Q, Liang Q (2015) Single-cell biorefinery. In: *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, p 369-388.

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**

Renna MC, Najimudin N, Winik LR, Zahler S (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* **175(12)**, 3863-3875.

Rodrigues C, Vandenberghe LPS, Woiciechowski AL, de Oliveira J, Letti LAJ, Soccol CR (2016) Production and application of lactic acid. In: *Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier Inc., p 543–556.

Ruchala J, Kurylenko OO, Dmytruk KV, Sibirny AA (2020) Construction of advanced producers of first-and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). *J Ind Microbiol Biotechnol* **47(1)**, 109-132.

- Rybar R, Kudelas D, Beer M (2015) Selected problems of classification of energy sources – What are renewable energy sources? Article in *Acta Montanistica Slovaca* **20**, 172-180. <https://doi.org/10.3390/ams20030172>
- Sabra W, Quitmann H, Zeng AP, Dai JY, Xiu ZL (2011) Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: *Comprehensive biotechnology*, Second Edition. Elsevier Inc., p 87–97.
- Sae-Tang K, Bumrungham P, Mhuantong W, Champreda V, Tanapongpipat S, Zhao XQ, i sur. (2023) Engineering flocculation for improved tolerance and production of D-lactic acid in *Pichia pastoris*. *J Fungi* **9**. <https://doi.org/10.3390/jof9040409>
- Saini JK, Agrawal R, Satlewal A, Saini R, Gupta R, Mathur A, i sur. (2015) Second generation bioethanol production at high gravity of pilot-scale pretreated wheat straw employing newly isolated thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBTIOC-35. *RSC Adv* **5**, 37485–37494. <https://doi.org/10.1039/c5ra05792b>
- Saitoh S, Ishida N, Onishi T, Tokuhiko K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H (2005). Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Appl Environ Microbiol* **71(5)**, 2789-2792.
- Santos MAS, Tuite MF (1995) The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **23(9)**, 1481-1486.
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P (2010) 16 years research on lactic acid production with yeast—ready for the market? *Biotechnol Genet Eng Rev* **27**, 229–256. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648152>
- Savithra Krishna B, Saibaba NK, Sai Nikhilesh Gantala S, Tarun B, Sarva Sai Nikhilesh G, Saibaba V NK, i sur. (2018) Industrial production of lactic acid and its applications. *Int J Biotechnol* **1**, 42-54.
- Selim KA, El-Ghwas DE, Easa SM, Abdelwahab Hassan MI (2018) Bioethanol a microbial biofuel metabolite; New insights of yeasts metabolic engineering. *Fermentation* **4**.
- Sibirny AA (2023) Metabolic engineering of non-conventional yeasts for construction of the advanced producers of biofuels and high-value chemicals. *BBA Advances* **3**. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2022.100071>

- Skory CD (2003) Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**, 22–27. <https://doi.org/10.1007/s10295-002-0004-2>
- Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, Czermak P (2016) *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol* **222**, 104–116.
- Stöckmann C, Scheidle M, Dittrich B, Merckelbach A, Hehmann G, Melmer G, i sur. (2009) Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*, a re-assessment. *Microb Cell Fact* **8**
- Suresh KS, Suresh PV, Kudre TG (2019) Prospective ecofuel feedstocks for sustainable production. In: *Advances in eco-fuels for a sustainable environment*. Woodhead Publishing. Sawston, UK, p 89-117.
- Svetec IK, Štafa A, Zgaga Z (2007) Genetic side effects accompanying gene targeting in yeast: The influence of short heterologous termini. *Yeast* **24**, 637–652. <https://doi.org/10.1002/yea.1497>
- Svetec IK, Zgaga Z (2010) Genetika kvasca i primjena genetičkih istraživanja u oplemenjivanju industrijskih sojeva kvasca. U: *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*. Zagreb: Plejada, str. 39-68.
- Syu MJ (2001) Biological production of 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 10-18.
- Szabo R (1999) Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol* **44**, 19-24.
- Štafa A, Miklenić M, Žunar B, Lisnić B, Symington LS, Svetec IK (2014) Sgs1 and Exo1 suppress targeted chromosome duplication during ends-in and ends-out gene targeting. *DNA Repair* **22**, 12–23.
- Takano M, Hoshino K (2018) Bioethanol production from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with statistical optimized cellulase cocktail and fermenting fungus. *Bioresour Bioprocess* **5**. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0203-y>
- Tokuhiro K, Ishida N, Nagamori E, Saitoh S, Onishi T, Kondo A, i sur. (2009) Double mutation of the *PDC1* and *ADH1* genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 883–890. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1831-5>

Trichez D, Steindorff AS, de Morais Júnior WG, Vilela N, Bergmann JC, Formighieri EF, i sur. (2023) Identification of traits to improve co-assimilation of glucose and xylose by adaptive evolution of *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis* yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **107**(4), 1143-1157.

Tu WC, Hallett JP (2019) Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Curr Opin Green Sustain Chem* **20**, 11-17.

Tulashie SK, Akpari EEA, Appiah G, Adongo A, Andoh EK (2023) Acid hydrolysis of sawdust waste into bioethanol. *Biomass Convers Biorefin* **13**, 5743–5756. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01725-1>

Tullio V (2022) Yeast genomics and its applications in biotechnological processes: what is our present and near future? *J Fungi* **8**.

Turner SA, Butler G (2014) The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>

Uthayakumar D, Sharma J, Wensing L, Shapiro RS (2020) CRISPR-based genetic manipulation of *Candida* species: historical perspectives and current approaches. *Front Genome Ed* **2**.

Valli M, Sauer M, Branduardi P, Borth N, Porro D, Mattanovich D (2006) Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5492–5499. <https://doi.org/10.1128/AEM.00683-06>

Varela JA, Gethins L, Stanton C, Ross P, Morrissey JP (2017) Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. In: Yeast diversity in human welfare, Springer, Berlin, Njemaška, p 439-453.

Vivier D, Ratomahenina R, Moulin G, Galzy P (1993) Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol* **11**, 157-161.

Volynets B, Ein-Mozaffari F, Dahman Y (2017) Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Process Synth* **6**, 1–22.

Wach A, Brachet A, Pöhlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(13), 1793–1808. <https://doi.org/10.1002/yea.320101310>

- Wang TT, Lee CF, Lee BH (1999) The molecular biology of *Schwanniomyces occidentalis* Klocker. *Crit Rev Biotechnol* **19**(2), 113-143.
- Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K (2015) Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* **119**, 10–18.
- Wee Y, Kim J, Ryu H (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotech* **44**(2), 163-172.
- Wei J, Li Y (2023) CRISPR-based gene editing technology and its application in microbial engineering. *Engineer Microbiol* **3**.
- Winston F, Chumley F, Fink GR (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 211-228.
- Wohlbach DJ, Kuo A, Sato TK, Potts KM, Salamov AA, LaButti KM, et al. (2011) Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc Natl Acad Sci* **108**(32), 13212-13217.
- Wolf K, Breunig KD, Barth G (2012) Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology: practical protocols. Springer Science & Business Media.
- Xiao Z, Xu P (2007) Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol* **33**(2), 127-140.
- Yang Z, Zhang Z (2018) Production of (2R, 3R)-2,3-butanediol using engineered *Pichia pastoris*: Strain construction, characterization and fermentation. *Biotechnol Biofuels* **11**. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1031-1>
- Young Lee J, Duk Kang C, Hyun Lee S, Kyoung Park Y, Myung Cho K (2015) Engineering Cellular Redox Balance in *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Production of L-Lactic Acid. *Biotechnol Bioeng* **112**, 751–758. <https://doi.org/10.1002/bit.25488/abstract>
- Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (2019) Fundamentals of lignocellulosic biomass. In: Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p 1–15.
- Zeng AP, Sabra W (2011) Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 749–757.
- Zhao C, Shao Q, Chundawat SP (2020) Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* **298**, 122446.

Zhao W, Wang X, Yang B, Wang Y, Li Z, Bao X (2023) Unravel the regulatory mechanism of Yrr1p phosphorylation in response to vanillin stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **22**. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02056-8>

Zieniuk B, Fabiszewska A (2019) *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. *World J Microbiol Biotechnol* **35**.

Žunar B, Trontel A, Svetec Miklenić M, Prah JL, Štafa A, Marđetko N, Novak M, i sur. (2020) Metabolically engineered *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 as a novel producer of optically pure L-and D-lactate. *World J Microbiol Biotechnol* **36**, 1-16.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

CRISPR/Cas – *engl.* clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)

DTT – ditiotreitol

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove (*engl.* U.S. Food and Drug Administration)

GRAS – općenito priznat kao siguran (*engl.* generally recognized as safe)

NHEJ – nehomologno sparivanje krajeva dvolančanog loma (*engl.* non-homologous end joining)

ORF – otvoreni okvir očitavanja (*engl.* open reading frame)

PCR – lančana reakcija polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction)

UPLC – tekućinska kromatografija ultra djelotvornosti (*engl.* ultra-performance liquid chromatography)

UV – ultraljubičasto zračenje (*engl.* ultraviolet radiation)

9. ŽIVOTOPIS

Angela Matanović rođena je 8. rujna 1995. u Rijeci, a osnovnu i srednju školu završila je u Vinkovcima. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine stekla je titulu sveučilišne prvostupnice inženjerke biotehnologije, a 2019. godine i titulu magistre inženjerke molekularne biotehnologije. Diplomski rad pod naslovom „Genetička transformacija kvasaca iz roda *Schwanniomyces*“ izradila je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Svetec Miklenić. Godine 2019. počinje raditi kao asistentica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu projekta HRZZ-a „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ čiji je voditelj prof. dr. sc. Božidar Šantek, a početkom 2020. upisuje doktorski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam, smjer Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo. Glavni interesi njenog znanstvenog istraživanja su genetika nekonvencionalnih kvasaca te njihovo genetičko modificiranje u svrhu proizvodnje vrijednih biokemikalija. Tijekom izrade doktorata prisustvovala je na nekoliko znanstvenih skupova u zemlji i inozemstvu, sudjelovala je u radionicama popularizacije znanosti, a koautorica je i dva a1 znanstvena rada:

Matanović A, Arambašić K, Žunar B, Štafa A, Svetec Miklenić M, Šantek B, Svetec IK (2022) Toolbox for Genetic Transformation of Non- Conventional *Saccharomycotina* Yeasts: High Efficiency Transformation of Yeasts Belonging to the *Schwanniomyces* Genus. *J Fungi* **8**, 531. doi:10.3390/jof8050531

Svetec Miklenić M, Gatalica N, **Matanović A**, Žunar B, Štafa A, Lisnić B, Svetec IK (2020) Size-dependent antirecombinogenic effect of short spacers on palindrome recombinogenicity. *DNA Repair* **90**, 102848. doi:10.1016/j.dnarep.2020.102848