Pojačana ekspresija odabranih gena i rezistencija kvasca Saccharomyces cerevisiae na inhibitore rasta

Zandona, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:414100

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Antonio Zandona

611/MB

POJAČANA EKSPRESIJA ODABRANIH GENA I REZISTENCIJA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* NA INHIBITORE RASTA

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Anamarije Štafa.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu-Krešimiru Svetecu što mi je omogućio izradu diplomskog rada u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama, i pomoći prilikom izrade i pisanja rada.

Posebne zahvale docentici dr. sc. Anamariji Štafa na ogromnoj pomoći i strpljenju, savjetima, uloženom vremenu i trudu te pomoći prilikom svladavanja eksperimentalnih tehnika rada.

Zahvaljujem i asistentima mag. ing. Bojanu Žunaru i dr.sc. Marini Miklenić te stručnim suradnicima mag. ing. Ani Lončar i mag. ing. Davoru Nestiću što su uvijek bili spremni pomoći i što su održavali ugodnu i prijateljsku radnu atmosferu.

Hvala i svim djelatnicima Laboratorija.

Najveća hvala Beti, roditeljima, bratu i prijateljima, što su uvijek bili podrška.

Hvala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

POJAČANA EKSPRESIJA ODABRANIH GENA I REZISTENCIJA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* NA INHIBITORE RASTA

Antonio Zandona, 611/MB

Sažetak: Proizvodnja bioetanola druge generacije temelji se na korištenju lignocelulozih sirovina kao supstrata, no osnovni problem je nesposobnost proizvodnog mikroorganizma, kvasca *Saccharomyces cerevisiae,* da koristi ovakav supstrat za alkoholnu fermentaciju. Sirovinu je potrebno hidrolizirati, pri čemu nastaju spojevi koje kvasac može koristiti, ali i različiti spojevi koji djeluju kao inhibitori rasta i fermentacije (octena i levulinska kiselina, 2-furaldehid), zbog čega se nastoji konstruirati proizvodne sojeve koji bi bili rezistentni na inhibitore. Cilj istraživanja bio je utvrditi da li pojačana ekspresija kvaščevih gena *ATR1*, *FLR1*, *YAP1*, *GSH1*, *CTA1* i *ZWF1* povećava rezistenciju odabranih sojeva na inhibitore rasta. U ovome radu korišteni su kontrolni homozigotni i hibridni heterozigotni diploidni sojevi kvasca transformirani plazmidima koji sadrže pojedinačne navedene gene. Utvrđeno je da pojačana ekspresija gena *ATR1* i *YAP1* rezultira povećanom rezistencijom sojeva na inhibitore rasta (octenu i levulinsku kiselinu te 2-furaldehid) u odnosu na ishodne sojeve.

Ključne riječi: kvasac, inhibitori rasta, rezistencija, transformacija, lignocelulozne sirovine
Rad sadrži: 63 stranice, 23 slike, 3 tablice, 83 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec*
Pomoć pri izradi: *doc. dr.sc. Anamarija Štafa*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof.dr.sc. *Božidar Šantek*
2. Izv.prof.dr.sc. *Ivan-Krešimir Svetec*
3. Doc.dr.sc. *Anamarija Štafa*
4. Izv.prof.dr.sc. *Renata Teparić* (zamjena)

Datum obrane: 21. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

OVEREXPRESSION OF SELECTED GENES AND RESISTANCE OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* ON GROWTH INHIBITORS

Antonio Zandona,611/MB

Abstract: Second generation bioethanol production is based on the use of lignocellulosic composites as substrates, but the main problem is that the producer microorganism, the yeast *S. cerevisiae*, cannot use this substrate for fermentation. Therefore composites are hydrolysed to produce compounds that can be used by the yeast, but during hydrolysis different compounds that inhibit yeast growth are produced. Therefore, the aim is to construct producer strains that will be resistant to different growth inhibitors (acetic and levulinic acid and 2-furaldehyde). The aim of this research was to determine if the overexpression of yeast genes *ATR1*, *FLR1*, *YAP1*, *GSH1*, *CTA1* or *ZWF1* can increase the resistance of producer strains to inhibitors. In this research, homozygous control and heterozygous diploid strains were transformed with plasmids that allow overexpression of selected genes. It was determined that the overexpression of *ATR1* and *YAP1* genes in different strains results in the increased resistance to growth inhibitors (acetic and levulinic acid and 2-furaldehyde) compared to starting ones.

Keywords: yeast, growth inhibitors, resistance, transformation, lignocellulosic composites
Thesis contains: 63 pages, 23 figures, 3 tables, 83 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *associate professor Ivan–Krešimir Svetec, Ph.D.*
Technical support and assistance: *assistant professor Anamarija Štafa, Ph.D.*

Reviewers:
1. PhD. *Božidar Šantek,* Full professor
2. PhD. *Ivan-Krešimir Svetec,* Associate professor
3. PhD. *Anamarija Štafa,* Assistant professor
4. PhD. *Renata Teparić,* Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 21st 2016

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
2.1. Kvasci koji se koriste za proizvodnju bioetanola 3
2.1.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 4
2.1.1.1. Genetičke modifikacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 6
2.1.1.2. Genetičke modifikacije kvasca koje pozitivno utječu na proizvodnju bioetanola 9
2.2. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina 12
2.2.1. Obrada lignoceluloznih sirovina 13
2.2.1.1. Inhibitori rasta i fermentacije nastali predobradom lignoceluloznih sirovina 15
2.2.1.1.1. Furani 16
2.2.1.1.2. Karboksilne kiseline 17
2.2.1.1.3. Fenolni spojevi 17
2.2.1.1.4. Etanol 18
2.2.1.1.5. Sinergističko djelovanje inhibitora 18
2.2.1.1.6. Uklanjanje (detoksikacija) inhibitora 18
2.2.2. Fermentacija lignoceluloznih sirovina 19
3. EKSPERIMENTALNI DIO 21
3.1. MATERIJALI 21
3.1.1. Plazmidi 21
3.1.2. Mikroorganizmi 23
3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli* 23
3.1.2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 23
3.1.3. Hranjive podloge i otopine 24
3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli* 25
3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 25
3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA 27
3.1.3.4. Otopine za gel-elektroforezu 28
3.1.3.5. Otopine za određivanje utjecaja inhibitora na rast kvasca *S. cerevisiae* 29
3.1.3.6. Kemikalije i enzimi 30
3.2. METODE 31
3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA 31
3.2.1.1. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena 31
3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol 31
3.2.1.3. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom 32
3.2.1.4. Cijepanje i modifikacija DNA 32
3.2.2. Gel elektroforeza 32
3.2.3. Određivanje utjecaja inhibitora na rast kvasca *S. cerevisiae* 32
3.2.3.1. Utjecaj inhibitora na rast u tekućem mediju 32

3.2.3.2. Utjecaj inhibitora na rast kvasca na krutoj podlozi 33
3.2.4. Određivanje stabilnosti plazmida pri uzgoju u neselektivnim uvjetima 34
3.2.5. Određivanje fermentacijske sposobnosti kvasca *S. cerevisiae* 34
4. REZULTATI I RASPRAVA 35
4.1. Utjecaj pojačane ekspresije gena *YAP1* na rezistenciju soja K2 na inhibitore rasta prisutne u tekućim hranjivim podlogama 35
4.2. Utjecaj inhibitora na rast homozigotnih i heterozigotnih diploidnih sojeva na krutim podlogama 39
4.2.1. Utjecaj inhibitora na rast netransformiranih diploidnih sojeva na krutim kompleksnim i kemijski definiranim podlogama 39
4.2.2. Utjecaj pojačane ekspresije gena na rezistenciju sojeva na krutim podlogama 42
4.2.2.1. Utjecaj octene kiseline na rast transformiranih sojeva na krutim podlogama 43
4.2.2.2. Utjecaj levulinske kiseline na rast transformiranih sojeva na krutim podlogama 45
4.2.2.3. Utjecaj 2-furaldehida na rast transformiranih sojeva na krutim podlogama 47
4.3. Usporedba rezistencije diploidnih sojeva na inhibitore rasta u tekućim i krutim medijima 49
4.4. Stabilnost replikativnih plazmida u neselektivnim uvjetima 51
4.5. Preliminarni test fermentacijske sposobnosti sojeva 53
5. ZAKLJUČCI 55
6. LITERATURA 56

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* važan je industrijski mikroorganizam koji energiju dobiva oksidativnom razgradnjom glukoze i drugih ugljikohidrata (Novak i Marić, 1995; Novak i sur., 2000). Ima široku primjenu u biotehnologiji (Grba, 2010), ubraja se među najbolje proučene eukariotske organizme, a ujedno je i prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran (Goffeau i sur., 1996). Koristi se u istraživanjima gotovo svih procesa u eukariotskoj stanici, raznih bolesti i apoptoze te je modelni organizam u istraživanju genske terapije i proizvodnje bioetanola (Madeo i sur., 2002; Longo i sur., 2012; Khurana i Lindquist, 2010; Dunlop, 2011).

Osim u klasičnim biotehnološkim procesima te u istraživanjima iz područja molekularne biologije i genetike, kvasac *S. cerevisiae* koristi se i u proizvodnji biogoriva jer tolerira visoku koncentraciju etanola. (Bio)etanol se sve češće koristi kao zamjena za klasična goriva, no za njegovu dosadašnju proizvodnju najčešće su korištene škrobne sirovine, koje se koriste u prehrani ljudi i stoke, što je proces činilo neekonomičnim. Alternativa škrobnim sirovinama su otpadne lignocelulozne sirovine (ostaci drvne, poljoprivredne i prehrambene industrije, Wyman, 2001). Ove sirovine sadrže komplekse ugljikohidratnih polimera celuloze, hemiceluloze i lignina te se zbog ekoloških, ekonomskih i energetskih prednosti sve više istražuje njihova primjena u biotehnološkoj proizvodnji (Sánchez i Cardona, 2008). Naime, uzgoj biljaka od kojih se dobivaju lignocelulozne sirovine ne konkurira poljoprivrednim kulturama i znatno je jeftiniji od konvencionalnih poljoprivrednih usjeva (Lynd i sur., 2002). Ipak, široka primjena lignoceluloznih materijala još je uvijek ograničena zbog nemogućnosti mikroorganizama da direktno fermentiraju ovakve sirovine (Sánchez i Cardona, 2008). Zbog toga se proizvodnja biogoriva odvija u nekoliko faza: predtretman lignocelulozne sirovine za delignifikaciju, odnosno oslobađanje celuloze i hemiceluloze prije hidrolize; hidrolizu celuloze i hemiceluloze pri čemu nastaju fermentabilni šećera (glukoza, ksiloza, arabinoza, galaktoza, manoza) te na kraju slijedi fermentacija šećera. Postoji nekoliko tipova predtretmana lignoceluloznih sirovina: kemijski, fizikalno-mehanički, fizikalno-kemijski i biološki (Menon i Rao, 2012), a sam odabir predtretmana ovisi o vrsti to jest kemijskom sastavu sirovine, te o svojstvima mikroorganizma koji će provesti fermentaciju. No, predtretmanom lignoceluloznih sirovina nastaju i spojevi koji inhibiraju rast proizvodnih sojeva kvasca *S. cerevisiae* te inhibiraju fermentaciju. Neki od inhibitora koji nastaju kemijskim predtretmanom su octena, levulinska i mravlja kiselina, hidroksimetilfurfural

(HMF) te razni fenoli (Jönsson i sur, 2013). Zbog svega navedenog u novije vrijeme konstruiraju se genetički modificirani sojevi kvasca otporniji na inhibitore rasta, koji ujedno mogu i fermentirati lignocelulozne sirovine (Dunlop 2011; Jönsson i sur., 2013).

Konkretni cilj ovog rada je istražiti da li pojačana ekspresija pojedinih gena (*ATR1*, *CTA1*, *FLR1*, *GSH1*, *YAP1* i *ZWF1*) može rezultirati većom rezistencijom kvasca *S. cerevisiae* na octenu i levulinsku kiselinu te 2-furaldehid, koji nastaju kemijskim predtretmanom lignoceluloznih sirovina. Osim toga, bit će provjereno i da li pojačana ekspresija ovih gena utječe na sposobnost fermentacije konstruiranih sojeva.

2. TEORIJSKI DIO

Zadnjih desetljeća, uslijed ubrzanog industrijskog razvoja, zabilježen je značajan porast potrošnje neobnovljivih izvora energije, kao što su nafta, ugljen i prirodni plin što je dovelo do iscrpljivanja njihovih zaliha i potrebe za alternativnim izvorima energije. Zbog toga se pažnja usmjerila ka proizvodnji biogoriva koja se dobivaju preradom obnovljivih izvora energije i organskih tvari životinjskog ili biljnog podrijetla (poljoprivredni ostaci, lignocelulozna biomasa) (Wyman, 2001; Ivančić Šantek i sur., 2016). Lignocelulozne sirovine koje se primjenjuju u biotehnologiji (engl. *Lignocellulosic composites*, LCS) otpad su iz poljoprivredne i drvne industrije, sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, a njihov točan kemijski sastav ovisi o vrsti i porijeklu sirovine. Budući da kvasac ne može koristiti spojeve iz lignoceluloznih sirovina za rast i fermentaciju, ovakve je sirovine potrebno prethodno obraditi, no prilikom njihove obrade nastaju nusprodukti kao što su octena, mravlja i levulinska kiselina, 2-furaldehid, hidroksimetilfurfural i različiti fenoli (Talebnia i sur., 2010). Osim o vrsti sirovine, proces fermentacije ovisi i o izboru proizvodnog mikroorganizma pri čemu se mogu koristiti mikroorganizmi izolirani iz prirodnog staništa, iz postojećih zbirki mikroorganizama, dobiveni nasumičnom mutagenezom, primjenom metaboličkog ili genetičkog inženjerstva. Idealne karakteristike mikroorganizma za proizvodnju etanola bile bi što veća sposobnost konverzije supstrata u produkt, visok prinos proizvoda te tolerancija na visoke koncentracije etanola i ostalih inhibitora prisutnih u hidrolizatu (octena kiselina, furani, fenoli). Upravo zbog nemogućnosti fermentacije i rasta kvasca na spojevima iz lignoceluloznih sirovina, istražuju se genetičke modifikacije kvasca *S. cerevisiae* koje bi omogućile što bolji rast i fermentaciju šećera u prisutnosti navedenih inhibitora (Almeida i sur., 2009).

2.1. Kvasci koji se koriste za proizvodnju bioetanola

Kvasci pogodni za alkoholno vrenje svrstani su uglavnom u rod *Endomycetales*, s najbrojnijom porodicom *Saccharomycetaceae* koja sadrži 4 potporodice, od kojih *Saccharomycoidae* obuhvaća 13 rodova. Veličina stanica kvasca ovisi o vrsti i uvjetima rasta (neki kvasci su veličine 2 – 3 μm dok neki mogu biti 20 – 50 μm). Najbolje proučeni rod je *Saccharomyces* koji obuhvaća oko 30 vrsta koje su od velikog industrijskog i ekonomskog značaja. Kvasci za rast zahtijevaju makronutrijente (ugljik, dušik, kisik, sumpor, fosfor, natrij i magnezij) u milimolarnim koncentracijama te vitamine i elemente u tragovima kao što su:

kalcij, bakar, željezo, mangan i cink. Većina laboratorijskih i industrijskih kvasaca raste pri temperaturi 20 – 30 °C, a optimalan pH za uzgoj kvasaca je između 4,5 – 5,5 te ovisi o prisutnosti organskih i mineralnih kiselina (Walker, 2009). Najpoznatija laboratorijska i industrijska vrsta kvasca je *Saccharomyces cerevisiae*, čija ekonomska važnost leži u mnoštvu podvrsta (sojeva, izolata), vrlo brzoj fermentaciji šećera do etanola i CO_2 te visokoj toleranciji na etanol, zbog čega se najčešće koristi u procesu proizvodnje etanola (Grba, 2010). Kvasac *S. cerevisiae* fermentira glukozu, fruktozu, maltozu i saharozu, ali ne može fermentirati pentoze i laktozu što predstavlja jedan od glavnih problema pri proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. Ovaj problem može se riješiti konstrukcijom proizvodnog mikroorganizma, koji ima sposobnost fermentacije različitih supstrata i povećanu toleranciju na etanol, primjenom metoda genetičkog inženjerstva. S druge strane, moguća je i primjena kvasaca koji imaju prirodnu sposobnost fermentacije pentoza (rodovi *Candida* i *Pichia*), no u tom slučaju glavni je nedostatak manji stupanj konverzije supstrata u produkt (Walker, 2009). Budući da hidrolizati lignoceluloznih sirovina sadrže značajnu količinu pentoza, kao što su ksiloza i arabinoza, koje kvasac *S. cerevisiae* ne može iskoristiti, genetičkim modifikacijama želi se povećati sposobnost fermentacije pentoza i otpornost na inhibitore tijekom razgradnje lignoceluloznih sirovina, a time povećati ekonomičnosti i prinos procesa (Marić, 2000, Alriksson i sur., 2010).

2.1.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanična je gljiva poznata kao pivski, pekarski, prehrambeni kvasac. Optimalna temperatura za rast kvasca *S. cerevisiae* je oko 28 °C, a optimalan pH u intervalu od 3,5 do 5. Može rasti u aerobnim i anaerobnim uvjetima (fakultativni anaerob) pri čemu tijekom anaerobne respiracije razgrađuje glukozu do etanola i CO_2 (Walker, 2009). *S. cerevisiae* raste u obliku pojedinačnih ovalnih stanica, čija veličina ovisi o ploiditetu. Haploidna stanica kvasca ima 16 kromosoma veličine od 200 do 2000 kb, plazmid 2μ veličine 6,318 kb i mitohondrijsku DNA veličine 70 do 76 kb (Sherman, 2002). Bioinformatičkom analizom soja S288C, potvrđeno je da sadrži oko 6604 otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frame,* ORF), iako je eksperimentalno potvrđeno samo 4806 (72,74 %) (*Saccharomyces* Genome Database).

U laboratorijskim uvjetima stabilno se aseksualno razmnožava pupanjem kao haploid ili diploid, pri čemu iz stanice majke nastaju dvije stanice kćeri. Haploidni i diploidni stanični ciklus povezani su konjugacijom i sporulacijom, pri čemu haploidni sojevi mogu biti **a** ili α

tipa parenja, ovisno o informaciji koja se nalazi u lokusu *MAT* na III. kvaščevom kromosomu. Stanice **a** tipa parenja proizvode feromon a-faktor, dok stanice α tipa parenja proizvode feromon α-faktor. Feromoni se vežu na receptore na površini stanica suprotnog tipa parenja, zaustavlja se stanični ciklus u G1 fazi te dolazi do fuzije i nastanka diploidne stanice. Dakle, križanjem haploidnih stanica suprotnog tipa parenja nastaju diploidne stanice **a**/α tipa parenja, koje u odgovarajućim uvjetima (pri nedostatku izvora dušika i uz nefermentabilni izvora ugljika kao što je acetat) ulaze u mejotičku diobu i sporuliraju pri čemu nastaju četiri haploidne askospore od kojih su dvije **a**, a dvije α tipa parenja (Herskowitz, 1988).

Saccharomyces cerevisiae stoljećima se koristi u tradicionalnoj biotehnologiji: vinarstvu, pekarstvu i pivarstvu (Grba, 2010), a u zadnjih nekoliko desetljeća i u proizvodnji biogoriva (Hähn-Hägerdal i sur., 2007; Dunlop, 2011). Kvasac je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran (Goffeau i sur., 1996) i ima široku primjenu kao modelni eukariotski organizam u istraživanjima apoptoze (Owsianowski i sur., 2008; Madeo i sur., 2002), starenja (Burhans i Weinberer, 2007; Longo i sur., 2012), neurodegenerativnih bolesti (Khurana i Lindquist, 2010) te genske terapije zbog izrazito uspješne homologne integracije transformirajuće DNA (Hinnen i sur. 1978; Orr-Weaver i sur., 1981). Osim toga, kvasac se koristi i u modernoj biotehnologiji za proizvodnju različitih lijekova (Menacho-Marquez i Marguia, 2007) i finih kemikalija (Chemler i sur., 2006).

Poželjna karakteristika kvaščevih sojeva u vinarstvu i pivarstvu je flokulacija, reverzibilna agregacija stanica kvasca, pri kojoj nastaju nakupine stanica slične pahuljama (flokule) koje omogućavaju bolje i učinkovitije izdvajanje i pročišćavanje proizvoda. Industrijski sojevi kvasca većinom nedovoljno ili uopće ne flokuliraju, dok u laboratorijskim uvjetima flokulacija predstavlja problem zbog otežane manipulacije stanicama, no flokulacija može biti i jedan od mehanizama odgovoran za toleranciju na visoke koncentracije etanola i inhibitora rasta. Proces flokulacije započinje u točno određenoj fazi fermentacije, npr. kod proizvodnje piva započinje ulaskom u stacionarnu fazu rasta (Donalies i sur, 2008). Sam proces još nije potpuno razjašnjen, no zna se da na proces utječu vanjski faktori kao što su temperatura (5 – 15 °C), pH (3,5 – 5,8) (Vestrepen i sur., 2003), osmotski stres, koncentracija etanola (10 %, v/v), dostupnost nutrijenata, ioni kalcija (10^{-5} – 10^{-8} mol L^{-1}) i cinka (Soares, 2010). Geni *FLO* bitni su za proces flokulacije kvasca jer kodiraju za membranske glikoproteine (flokuline) koji se nakon translacije transportiraju do površine i ugrađuju u staničnu stijenku. Flokulacija kvasca bazira se na vezanju molekula lektina (glikoproteina kojima su potrebni kalcijevi ioni da bi imali aktivnu konformaciju) s mananima stanične

stijenke susjednih stanica kvasca. Kako bi se omogućila sposobnost flokulacije laboratorijskim ili industrijskim sojevima kvasca koji ne flokuliraju, a time i rezistencija na visoke koncentracije etanola i druge stresne faktore, ugrađeni su im geni *FLO1* i *FLO5* izolirani iz sojeva kvasca koji imaju sposobnost flokulacije (Soares, 2010).

2.1.1.1. Genetičke modifikacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Prijenos genetičkog materijala može biti horizontalan i vertikalan, pri čemu vertikalni prijenos gena podrazumijeva prijenos sa stanice majke na stanicu kćer, dok horizontalni prijenos podrazumijeva izmjenu genetičkog materijala između različitih stanica (jedinki) odnosno vrsta. Horizontalni prijenos gena kod mikroorganizama obuhvaća tri procesa unosa DNA u ciljnu stanicu: konjugaciju, transdukciju i transformaciju. Konjugacija je prijenos genetičkog materijala iz stanice donor u stanicu recipijent direktnim kontaktom preko pilusa (u slučaju bakterija) ili fuzijom stanica tijekom parenja kvasaca, dok je transdukcija prijenos gena iz jedne bakterije u drugu pomoću bakterijskih virusa. Transformacija je najčešće korištena metoda za unos željenih gena u stanice bakterija i kvasca, unošenjem gole DNA koja uzrokuje promjenu genotipa i fenotipa transformirane stanice.

Genetički materijal stanice podložan je oštećenjima, koja ovisno o mehanizmu popravka, mogu završiti bez promjene u slijedu nukleotida, ali i točkastim mutacijama ili prerasporedom genetičkog materijala. Najčešća oštećenja DNA su jednolančani lom, AP – mjesta, kemijske modifikacije te dvolančani lom (engl. *Double-Strand Break*, DSB). Dvolančani lom u DNA predstavlja najopasnije oštećenje jer može rezultirati gubitkom oštećenog kromosoma ili smrću stanice, a u slučaju ignoriranja oštećenja ili nepreciznog popravka, gubitkom ili promjenom dijela genetičke upute. Dvolančani lomovi u DNA mogu nastati djelovanjem ionizirajućeg zračenja ili metil-metansulfonatom (MMS), ali i replikacijom DNA s jednolančanim lomom. Iako dvolančani lomovi predstavljaju opasnost za integritet stanice, strogo kontrolirani nastanak dvolančanog loma koji se popravlja homolognom rekombinacijom bitan je za mitotičke i mejotičke stanice kvasca *S. cerevisiae*. Tako na primjer, tijekom promjene tipa parenja u homotaličnim sojevima endonukleaza Ho uvodi dvolančani lom u lokus *MAT* na III. kvaščevom kromosomu (Kostriken i sur., 1983).

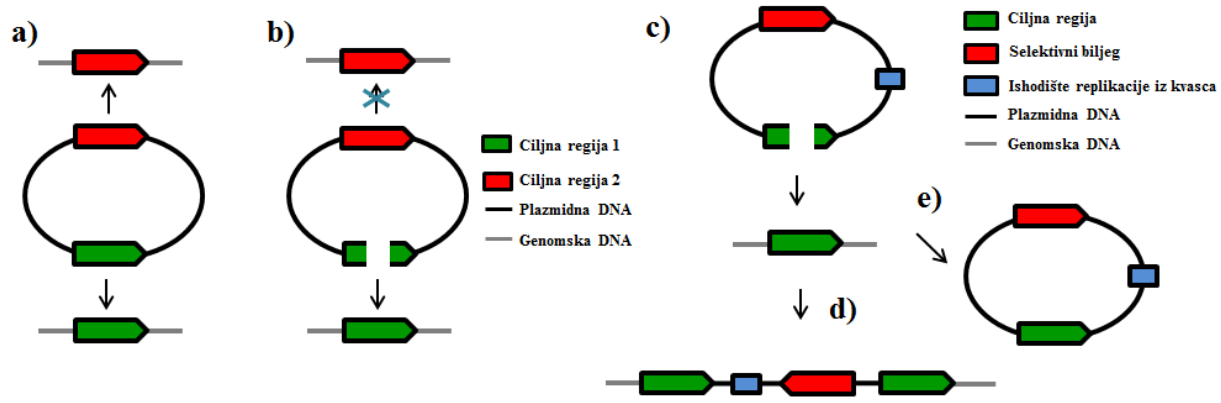
Budući da dvolančani lomovi u DNA predstavlja opasnost za stanicu, zaustavlja se stanični ciklus zbog popravka oštećenja rekombinacijom. Genetička rekombinacija je preraspoređivanje genetičkog materijala i prijenos informacije unutar jedne ili između različitih molekula DNA što uključuje cijepanje starih i nastanak novih fosfodiesterskih veza.

S obzirom na stupanj identičnosti (homologije) sekvenci DNA koje rekombiniraju, genetičku rekombinaciju možemo podijeliti na homolognu i ilegitimnu. Homologna rekombinacija je izmjena lanaca DNA između homolognih regija DNA, a popravak dvolančanih lomova homolognom rekombinacijom osigurava pravilno odvajanje kromosoma tijekom mejoze i povećava varijabilnost u populaciji. Nasuprot tome, ilegitimna rekombinacija se događa između različitih (heterolognih) sekvenci (Schiestl i Petes, 1991). Sam odabir mehanizma popravka dvolančanog loma strogo je kontroliran i ovisi o fazi staničnog ciklusa, tipu i ploiditetu stanica (Symington i Gautier, 2011).

Uloga dvolančanih lomova u poticanju rekombinacije otkrivena je tijekom istraživanja procesa transformacije kvasca integrativnim i replikativnim plazmidima. Replikativni plazmidi sadrže ishodište replikacije i u stanici kvasca mogu se samostalno replicirati (Orr-Weaver i sur., 1981). S druge strane, integrativni vektori ne sadrže ishodište replikacije i ne mogu se samostalno replicirati u stanici kvasca te da bi došlo do transformacije trebaju rekombinirati s kvaščevom DNA i ugraditi se u nju. Tijekom prvih eksperimenata transformacije kružnim integrativnim plazmidima, koji sadrže dvije regije homologne kvaščevom genomu (Slika 1a), utvrđeno je da se plazmid s jednakom vjerojatnošću ugrađuje u jednu ili drugu homolognu regiju pri čemu dolazi do duplikacije ciljne regije (Hinnen i sur., 1978). Uvođenjem dvolančanog loma u jednu od regija (Slika 1b), plazmid će se integrirati upravo u onu regiju u genomu koja je homologna regiji u koju je uveden dvolančani lom, čime se postiže gensko ciljanje (Orr-Weaver i sur., 1981). Ovi eksperimenti transformacije kvasca rezultirali su uspostavom jednog od prvih modela popravka dvolančanog loma u eukariota (engl. *double-strand break repair model,* DSBR) (Szostak i sur, 1983). Sekvence na krajevima dvolančanog loma, to jest lineariziranog vektora ili transformirajućeg fragmenta, komplementarne su homolognom lokusu u genomu i one omogućuju gensko ciljanje (Hastings, 1993).

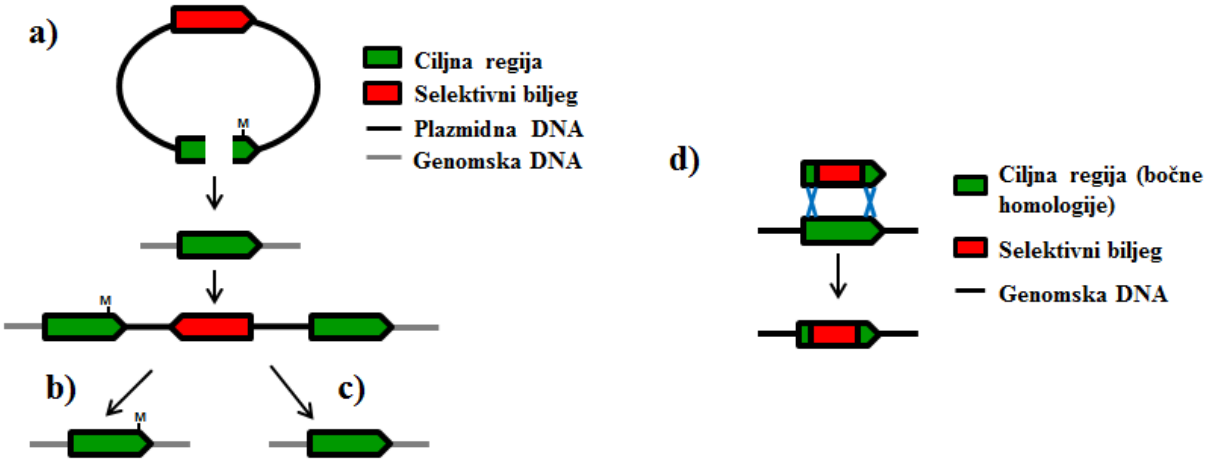
Za modifikaciju bilo kojeg gena u genomu kvasca može se koristiti postupak u dva ili u jednom koraku. Pri modifikaciji gena u dva koraka nužno je u integrativni plazmid uvesti željenu modifikaciju u regiju homolognu ciljnoj sekvenci u genomu (Slika 2a). Nakon uvođenja željene promjene, plazmid je potrebno linearizirati u modificiranoj regiji čime je integracija usmjerena upravo u homolognu regiju u genomu. Kako su krajevi lineariziranog plazmida, nakon sparivanja s homolognom regijom u genomu, okrenuti jedan prema drugome, takvo gensko ciljanje se naziva „krajevi unutra“ (Slika 1c). Prilikom integracije plazmida dolazi do duplikacije ciljne regije, a jedna od regija sadrži željenu genetičku

modifikaciju. Kasnije se selekcionirani transformanti uzgajaju u neselektivnim uvjetima kako bi rekombinacijom „pop-out“ došlo do gubitka plazmidne molekule sa selektivnim biljegom i jedne ciljne regije (Slika 2b i 2c). Budući da je podjednaka vjerojatnost da se u genomu zadrži modificirani ili nemodificirani gen, potrebna je detaljna molekularna analiza kako bi se potvrdilo da je u genom uvedena željena modifikacija.



Slika 1. Usmjeravanje rekombinacije plazmida s homolognom regijom u kvaščevom genomu. a) Pri transformaciji kvasca kružnim integrativnim plazmidom koji sadrži dvije regije homologne kvaščevom genomu podjednaka je vjerojatnost integracije kružnog plazmida u bilo koju regiju. b) Uvođenjem dvolančanog loma u jednu od regija na plazmidu, integracija se usmjerava upravo u homolognu regiju u genomu, pri čemu se značajno povećava i efikasnost transformacije. Pri transformaciji kvasca pocijepanim replikativnim plazmidom (c) podjednaka je vjerojatnost popravka dvolančanog loma sa (d) ili bez (e) integracije plazmida.

Suprotno tome, za modifikaciju gena u jednom koraku koristi se transformirajuća DNA kod koje se modificirani gen i/ili selektivni biljeg nalaze u sredini dok se na krajevima nalaze sekvence homologne ciljnoj regiji u genomu. Nakon sparivanja transformirajućeg fragmenta s homolognom regijom u genomu, krajevi transformirajućeg fragmenta okrenuti su jedan od drugog pa govorimo o genskom ciljanju „krajevi van“ (Slika 2b) (Rothstein, 1983). Najčešća primjena genskog ciljanja „krajevi-van“ je inaktivacija gena zamjenom sa selektivnim biljegom koja se još naziva i zamjena gena (engl. *gene replacement*). Wach i suradnici (1994) pokazali su da je za rekombinaciju „krajevi-van“ dovoljno 40 pb bočne homologije, ali da povećanje duljine znatno povećava uspješnost genskog ciljanja (Pâques i Haber, 1999).



Slika 2. Modifikacija gena u **a)** dva koraka i **d)** jednom koraku (gensko ciljanje „krajevi van“) .

2.1.1.2. Genetičke modifikacije kvasca koje pozitivno utječu na proizvodnju bioetanola

Kvasac fermentira glukozu u etanol i glavni je proizvodni mikroorganizam za proizvodnju bioetanola. Kako na rast kvasca *S. cerevisiae* i fermentaciju utječu inhibitori rasta iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina čije je uklanjanje neisplativo, potrebno je konstruirati sojeve koji će imati sposobnost fermentacije pentoza i povećanu otpornost na inhibitore rasta i na krajnji produkt etanol (Alriksson i sur., 2010; Grba, 2010).

U dosadašnjim istraživanjima različitih grupa otkriveno je nekoliko gena čiji proteinski produkti imaju ulogu u rezistenciji kvasca na inhibitore rasta, no nisu svi mehanizmi do kraja razjašnjeni. Gen *YAP1* koji kodira za transkripcijski faktor *Yap1* kontrolira regulon od najmanje 32 proteina koji sudjeluju u odgovoru stanice na oksidativni stres i na H_2O_2 (Lee i sur., 1999). Pojačana ekspresija gena *YAP1* povećala je sposobnost konverzije toksičnih spojeva u manje toksične produkte te je povećala rezistenciju sojeva na inhibitor hidroksimetilfurfural (HMF) nastao kiselinskom hidrolizom lignoceluloznih sirovina (Alrikson i sur., 2010). Gen *YAP2* također kodira za transkripcijski faktor koji ima bitnu ulogu u odgovoru na stres izazvan oksidativnim spojevima, posebno s H_2O_2 (Stephen i sur., 1995).

Nedavno je otkriveno da je produkt gena *ADH6*, NADPH-ovisna alkohol dehidrogenaza, odgovorna za redukciju HMF-a i furfurala u kvascu. Unosom gena *ADH6* u kvasac i njegovom pojačanom ekspresijom, zabilježen je do 4 puta veći unos HMF-a u stanicu kvasca i njegove redukcije u aerobnim i anaerobnim uvjetima (Almeida i sur., 2009). Produkt gena *ADH7* također je alkohol dehidrogenaza sposobna reducirati HMF, a za dodatno

poboljšanje ovog svojstva, konstruirani su sojevi koji su sadržavali i gen *MUT1-ADH1* koji kodira za modificiranu alkohol dehidrogenazu 1 (Parawira i Tekere, 2011).

Gen *ATR1* kodira za transmembranski protein Atr1 koji sudjeluje u pumpanju aminotriazola iz stanice i odgovoran je za rezistenciju na štetne spojeve (Kanazawa i sur., 1988). Alriksson i suradnici (2010) konstruirali su sojeve s pojačanom ekspresijom gena *ATR1* i uzgajali ih u prisutnosti različitih inhibitora rasta, uključujući koniferil aldehid, 2-furaldehid, HMF i hidrolizat smreke, pri čemu je pojačana ekspresija *ATR1* pogodovala rezistenciji. Nadalje, u pojedinim sojevima pojačana ekspresija gena *FLR1* (koji kodira za transmembransku pumpu kao i *ATR1*) rezultirala je povećanom rezistencijom sojeva na HMF i koniferil aldehid (Alriksson i sur., 2010).

Delecijom gena *ZWF1*, *GND1*, *RPE1* i *TKL1*, koji nose informaciju za sintezu enzima koji sudjeluju u putu pentoza fosfata (engl. *pentose phosphate pathway*, PPP), pokazalo se da je tolerancija na furfural povezana sa aktivnošću PPP, koji je glavni izvor citoplazmatskog NADPH. Daljnjom pojačanom ekspresijom gena *ZWF1* koji kodira za glukoza-6-fosfat dehidrogenazu, prvi enzim PPP ciklusa, omogućen je rast na furfuralu i do koncentracije od 50 mM koja je inače toksična za kvasac *S. cerevisiae*. Mehanizam koji je odgovoran za toleranciju na furfural nije još u potpunosti razjašnjen, no poznato je da geni koji kodiraju za enzime PPP pomažu u zaštiti i popravku oksidativnih oštećenja uzrokovanih furfuralom, kao i kod mnogih NADPH-ovisnih enzima koji su odgovorni za stanični obrambeni mehanizam na stres (Gorisch, 2005).

Budući da fenoli inhibiraju rast kvasca, Almeida i suradnici (2009) konstruirali su soj kvasca *S. cerevisiae* otporan na fenolne derivate. Naime, gen *PAD1* koji kodira za fenilakrilnu dekarboksilazu u stanicama kvasca je reprimiran ili pojačano eksprimiran, a transformanti koji su imali pojačanu ekspresiju gena *PAD1* u aerobnim su uvjetima više iskorištavali ferulinsku i cinamičnu kiselinu, u odnosu na kontrolni soj, čime je povećana produktivnost proizvodnje etanola za 50-100% (Almeida i sur., 2009).

Konstruirani su i sojevi kvasca u koje su uneseni geni iz drugih organizama, tako je unos gena za lakazu (*LCC*) iz gljive *Trametes versicolor* omogućio rast modificiranog soja u mediju koji sadrži 1,25 mM inhibitor koniferil, dok je u istim uvjetima kontrolni, netransformirani soj bio potpuno inhibiran. Ekspresija gena za lakazu rezultirala je bržom konverzijom aldehida i većom produktivnošću proizvodnje etanola (Almeida, 2007).

Neki od faktora koji utječu na toleranciju kvasca *S. cerevisiae* na etanol su: koncentracija ergosterola i L-prolina, zasićenost i duljina masnih kiselina te koncentracija

proteina koji sudjeluju u odgovoru na toplinski šok (engl. *Heat Shock Proteins*, HSP) i stres (Hong i sur., 2010). Povećana koncentracija etanola negativno utječe na membranske proteine i fluidnost membrane uslijed čega dolazi do inhibicije rasta stanice i smrti. Tijekom odgovora stanice na povećanje koncentracije etanola u podlozi povećava se i razina mononezasićenih masnih kiselina i ergosterola, a pojačana ekspresija gena *OLE1*, može rezultirati boljom fluidnošću membrane što doprinosi većoj toleranciji na etanol (Ding i sur., 2009). Osim toga, pojačana ekspresija gena *ERG2*, koji kodira za enzim koji sudjeluje u biosintezi ergosterola (glavnog sterola stanične membrane kvasca koji stabilizira membranske lipide i proteine), mogla bi pozitivno utjecati na toleranciju na etanol.

Morita i suradnici (2009) izolirali su mutant kvasca koji je imao visoku toleranciju na smrzavanje te je imao povišenu razinu intracelularnog L-prolina. Pokazano je da mutant ima alel *PRO1* koji kodira za mutiranu γ-glutamil kinazu, koja ima zamijenjenu jednu aminokiselinu na poziciji 154 (aspartat u aspragin). Naime, L-prolin je osmoprotektant i pomaže kod zaštite kvaščeve stanice od smrzavanja, desikacije ili oksidativnog stresa. Kvasac s alelom *PRO1* bolje akumulira L-prolin, te je pri uzgoju u mediju koji sadrži 9% i 18% etanola uočena veća vijabilnost transformiranog soja u odnosu na netransformirani (Ding i sur., 2009).

U stanicama, H^+-ATPaza održava homeostazu iona u citoplazmi i utječe na permeabilnost membrane te ima bitnu ulogu u odgovoru na stres u kvascu *S. cerevisiae*. Pojačana ekspresija gena *PMA1* i *PMA2,* koji kodiraju za ovaj enzim, rezultirala je zaštitom stanica od apoptoze inducirane oksidativnim stresom, toplinskim šokom, toksinima i oštećenjem stanice pri uzgoju u mediju sa etanolom (Ding, 2009).

Geni *GSH1* (koji kodira za γ-glutamilcistein sintetazu) i *SSA1* gen (koji kodira za HSP^{70}) induciraju se u prisutnosti oksidirajućih spojeva. Za razliku od *SSA1*, ekspresija gena *GSH1* bolje je inducirana superoksidnim anionima nego vodikovim peroksidom (Stephen i sur., 1995). Ask i suradnici (2013) konstruirali su sojeve koji imaju pojačanu ekspresiju gena čiji proteinski produkti sudjeluju u metabolizmu glutationa (*GSH1*, *CYS3* i *GLR1*), uslijed čega dolazi do povećane akumulacije glutationa u stanicama kvasca i posljedično bolje zaštite od djelovanja toksičnih metabolita, detoksikacije i antioksidativnog djelovanja.

Također, u kvascu su eksprimirani i geni koji kodiraju za enzime uključene u metabolizam ksiloze. Ksiloza nastaje tijekom hidrolize hemiceluloze, ali ju kvasac *S. cerevisiae* ne može fermentirati. Unosom gena *XYL1* i *XYL2* iz kvasca *Pichia stipitis*, koji

kodiraju za *XR* (ksilulokinazu) i *XDH* (ksilitol dehidrogenazu) u kvasac *S. cerevisiae*, konstruiran je soj sa sposobnošću fermentacije ksiloze (Alriksson i sur., 2010).

2.2. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Uslijed povećanja potrošnje rezervi neobnovljivih izvora goriva i sve veće potrebe za njima, proizvodnja iz obnovljivih sirovina se predstavila kao moguće rješenje problema. Već niz godina javlja se velik interes za istraživanja i razvoj optimalne proizvodnje bioetanola (biogoriva), pri čemu se nastoje pronaći odgovarajući katalizatori te optimalni proizvodni uvjeti (Sarkar i sur., 2010). Glavni nedostaci su dostupnost sirovina i neekonomičnost procesa, no ovi problemi se mogu nadvladati uz mnoge pozitivne aspekte. Biogoriva se često klasificiraju kao primarna, sekundarna goriva te goriva nove generacije („treće“ generacije) (Nigam i Singh, 2011).

Primarna goriva koriste se u neprerađenom obliku, dok se sekundarna goriva dobivaju proizvodnjom iz biomase, kao što su na primjer bioetanol, biodizel, biobutanol i dimetil eter, te se koriste u raznim industrijskim procesima. Biogoriva prve generacije su proizvodi iz šećernih sirovina i zahtijevaju relativno jednostavne proizvodne procese dobivanja krajnjeg proizvoda. Proizvodnja biogoriva prve generacije zastupljena je u brojnim zemljama, no problem koji prati ovu generaciju je izbor sirovina koje su ujedno i sirovine u prehrambenoj industriji (Ivančić Šantek i sur., 2016).

Biogoriva druge generacije proizvode se biotehnološkim ili termokemijskim procesima iz lignocelulozne biomase koja je otpad od poljoprivredne i drvne industrije ili je biljna biomasa koja se ne može iskoristiti u prehrambenoj industriji. Prednost ovih biogoriva je što nisu direktna konkurencija proizvodnji hrane te omogućavaju bolju iskoristivost obradive zemlje. No, iz mnogih istraživanja očito je da je za ove procese potrebna nešto sofisticiranija proizvodna oprema i da bi se procesi isplatili, proizvodnja mora biti većeg razmjera. Da bi se postigli dobri rezultati s ekonomskog i energetskog gledišta potrebna su dodatna istraživanja usmjerena na proizvodnju i tehnologiju konverzije sirovina u proizvod (Nigam i Singh, 2011).

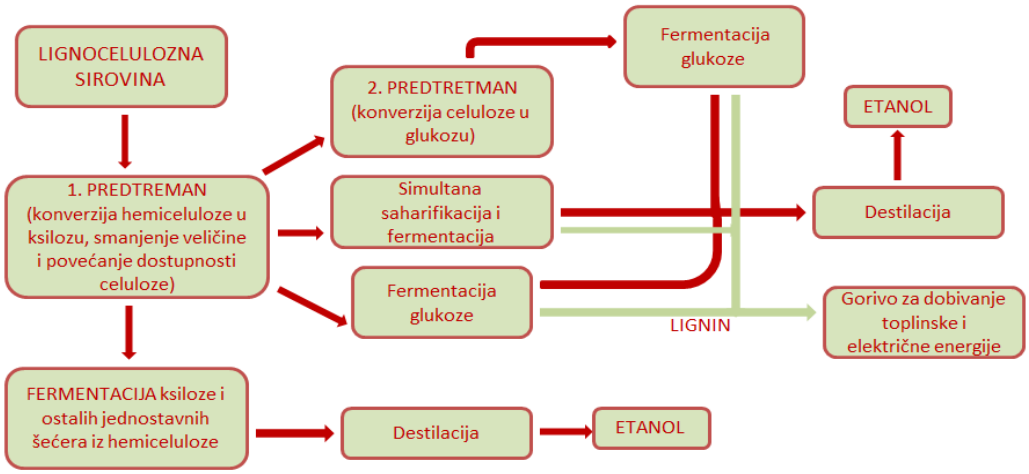
Lignocelulozne sirovine (druga generacija) su jeftine i dostupne sirovine te se općenito mogu klasificirati u četiri grupe, ovisno o porijeklu: šumski otpad, komunalni kruti otpad, otpadni papir i poljoprivredni otpad. Proizvodnja biogoriva iz lignoceluloznih sirovina, od kojih je najznačajniji bioetanol, uključuje tri glavna stupnja: predtretman za delignifikaciju, odnosno oslobađanje celuloze i hemiceluloze prije hidrolize, hidrolizu celuloze i hemiceluloze za dobivanje fermentabilnih šećera (glukoza, ksiloza, arabinoza, galaktoza, manoza) i

fermentaciju šećera (Janušić i sur., 2008). Struktura lignocelulozne sirovine ovisi o tipu i porijeklu sirovine, a glavne komponente su celuloza (35-50%), hemiceluloza (20-35%) i lignin (5-30%) (Jäger i Büchs, 2012). Celuloza je linearan homopolimer građen od glukoze povezane β-1,4 glikozidnim vezama, dok je hemiceluloza heteropolimer D-ksiloze, L-arabinoze, D-glukoze, D-galaktoze, D-manoze i D-glukonske kiseline. Lignin se sastoji od tri glavne fenolne komponente: p-kumaril, koniferil i sinapil alkohola te se sintetizira polimerizacijom komponenti čiji udio ovisi o tipu sirovine (Menon i Rao, 2012).

Istraživanja posljednje (treće) generacije biogoriva usmjerena su prema proizvodnji biogoriva pomoću mikroalgi (Nigam i Singh, 2011). Kao izvor biogoriva koristile bi se mikrobne vrste kao što su kvasci, gljive i mikroalge s ciljem proizvodnje alternativne energije (Patil i sur., 2008).

2.2.1. Obrada lignoceluloznih sirovina

Izazov u proizvodnji biogoriva iz lignoceluloznih sirovina predstavlja izbor pogodnog postupka obrade, koji omogućuje što veću koncentraciju dostupnih fermentabilnih šećera, a samim time i veću produktivnost proizvodnog procesa. Postupci predobrade uključuju otapanje i odvajanje jedne ili više komponenti, čime preostali čvrsti dijelovi biomase postaju dostupniji za daljnje kemijske ili biološke tretmane (Demirbas, 2005). Hidroliza lignoceluloznih sirovina do monosaharida, koje mikroorganizmi mogu koristiti za rast, odvija se u dva osnovna koraka. U prvom koraku mijenja se sastav i struktura sirovine s ciljem povećanja učinkovitosti enzima, pri čemu se nastoji smanjiti ili u potpunosti spriječiti nastanak različitih spojeva koji inhibiraju rast mikroorganizama. U drugom koraku, prethodno obrađenu sirovinu potrebno je enzimski hidrolizirati do jednostavnih šećera. Zbog složenosti i kristalične građe lignoceluloznih sirovina, predobrada i enzimska hidroliza izrazito su bitni procesi jer je potrebno osigurati dostupnost celuloze celulolitičkim enzimima koji ju hidroliziraju do jednostavnijih ugljikohidrata (Mosier i sur., 2005). Kako bi proces proizvodnje bio što ekonomičniji, ekološki prihvatljiviji i isplativiji, potrebno je odabrati najpogodniju kombinaciju predtretmana i fermentacije što ovisi o sirovini i željenim produktima (Slika 3).



Slika 3. Tehnologija proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina (preuzeto iz Janušić i sur., 2008 i prilagođeno).

Metode predobrade lignoceluloznih sirovina dijele se u četiri skupine: kemijske metode (upotreba kiselina i lužina), fizikalne/mehaničke metode (mljevenje, zračenje, ekstruzija, piroliza, tretman parom), fizikalno-kemijske i biološke metode (Menon i Rao, 2012). Ako odabrani predtretman nije dovoljno učinkovit, otežan je proces hidrolize što rezultira nastajanjem toksičnih metabolita koji mogu inhibirati mikrobni metabolizam i fermentaciju (Kodali i Pogaku, 2006).

Kemijski predtretman uključuje kiselinsku hidrolizu, alkalnu hidrolizu, upotrebu organskih otapala te tretman ionskim tekućinama (Menon i Rao, 2012). Najčešće korištene koncentrirane kiseline su sumporna i kloridna, koje se primjenjuju s ciljem uklanjanja lignina iz lignocelulozne sirovine (Dawson i Boopathy, 2007). Uglavnom se koristi 0,5 - 1,5 % razrijeđena sumporna kiselina na temperaturi od 100 do 150 °C i ovakav predtretman omogućuje visoke prinose čime se pospješuje hidroliza celuloze (Mosier i sur., 2005). Alkalna hidroliza primjenjuje se s ciljem uklanjanja lignina (Dawson i Boopathy, 2007), pri čemu sam učinak ovisi o udjelu lignina u materijalu (Mc Millan, 1994). Za razliku od kiselinske hidrolize, predtretman lužinama može se provoditi pri nižim vrijednostima temperature i tlaka, ali tada hidrolize dulje traje i može doći do saponifikacije između lužina i esterskih prstenova ksilana (Sun i Cheng, 2002). Razgradnjom šećera u sastavu hemiceluloze nastaju 2-furaldehid, hidroksimetilfurfural (HMF), mravlja i levulinska kiselina (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

Jedan od fizikalnih predtretmana je mehaničko usitnjavanje, čime se lignocelulozne sirovine usitnjavaju kombinacijom sjeckanja i mljevenja pa veličina čestica nakon sjeckanja

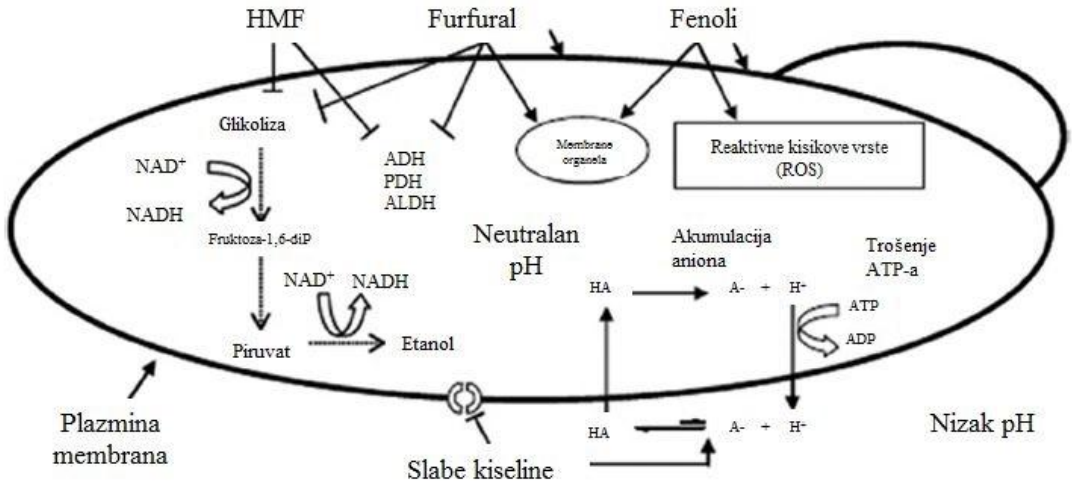
iznosi 10 - 30 mm, dok nakon mljevenja iznosi 0,2 - 2,0 mm. Osim mehaničkog usitnjavanja može se koristiti i postupak predobrade pirolizom u kojem dolazi do razgradnje organske tvari uslijed djelovanja topline bez prisustva kisika ili reagensa (osim vodene pare, na temperaturi iznad 300 °C) pri čemu se naglo razgrađuje celuloza (Sun i Cheng, 2002).

Ekspanzija vodenom parom je predtretman koji spada u skupinu fizikalno - kemijskih predtretmana. Provodi se pri temperaturama 160 – 260 °C i pri tlaku od 0,69 – 4,83 MPa, tako da se usitnjeni materijal podvrgava zasićenoj pari pri visokome tlaku, nakon čega se tlak naglo smanji, što dovodi do eksplozivne dekompresije (Menon i Rao, 2012).

Biološki postupci predobrade lignocelulozne sirovine najčešće se koriste za lignocelulozne sirovine s visokim udjelom vode kako bi se osigurala normalna aktivnost mikroorganizama (Datar i sur, 2007), pri čemu se koriste različite vrste gljiva koje razgrađuju lignin, celulozu i hemicelulozu (Schurz, 1978).

2.2.1.1. Inhibitori rasta i fermentacije nastali predobradom lignoceluloznih sirovina

Predobradom lignoceluloznih sirovina, uz spojeve koji mikroorganizmi mogu fermentirati, nastaju i komponente koje inhibiraju rast ili su toksične za proizvodni mikroorganizam (Slika 4).

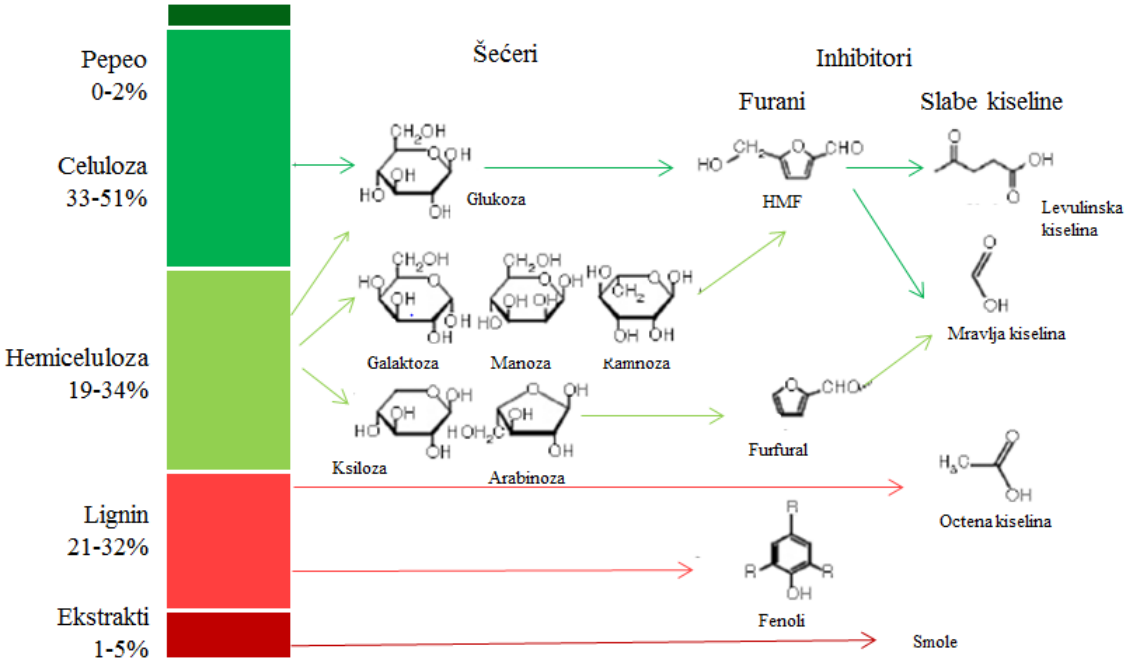


Slika 4. Shematski prikaz poznatih inhibicijskih mehanizama furana, slabih kiselina i fenolnih spojeva na kvasac *S. cerevisiae*. HMF inhibira ADH (alkohol dehidrogenazu), PDH (piruvat dehidrogenazu), ALDH (aldehid dehidrogenazu) te glikolizu. Furani inhibiraju iste enzime kao i HMF, ali i dodatno oštećuju membrane. Slabe kiseline uzrokuju trošenje ATP-a, akumulaciju toksičnih aniona i inhibiciju unosa aromatskih aminokiselina, dok fenolni spojevi uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i oštećenja membrana (prilagođeno iz Almeida i sur., 2007).

Vrsta i koncentracija inhibitora i toksičnih spojeva ovise o vrsti materijala lignocelulozних sirovina, o načinu predtretmana i o uvjetima pri kojima se provodi predtretman (temperatura, pH, tlak) te je potrebno naglasiti da na rast mikroorganizama utječe svaki inhibitor zasebno, ali inhibitori mogu imati i sinergistički efekt (Sanchez i Cardona, 2007). Inhibitori su uglavnom vezani u ligninu čijom se degradacijom oslobađaju aldehidi i fenoli te octena, glukonska i galakturonska kiselina, dok tijekom predobrade može doći do kemijskih modifikacija nekih pentoza i heksoza pri čemu nastaju inhibitori (furaldehid, 5-hidroksimetil furfural i kiseline). Ne-lignocelulozni inhibitori su inhibitori koji potječu iz okruženja u kojem se nalazila korištena sirovina i uključuju dušikove i sumporne spojeve te teške metale i pesticide koji znatno utječu na proces hidrolize i na proizvodni mikroorganizam. Od svih navedenih inhibitora, najmanji utjecaj imaju terpeni, zatim aldehidi, mravlja kiselina, octena kiselina, 5-HMF, a najjači utjecaj ima furfural (Klinke i sur., 2004).

2.2.1.1.1. Furani

Glavni produkti razgradnje pentoza i heksoza su derivati furana (Slika 5), 2-furaldehid (furfural) i 5-hidroksimetilfurfural (HMF). Njihova koncentracija ovisi o uvjetima pri kojima se odvija predtretman pa će tako dužim predtretmanom kiselinama pri višim temperaturama nastajati velike količine 2-furaldehida i HMF-a. Neki mikroorganizmi sposobni su reducirati furane u manje toksične alkohole; HMF reduciraju u 2,5-bis-hidroksimetilfuran, a 2-furaldehid u furfuril alkohol, a oba u anaerobnim uvjetima mogu biti oksidirana do mravlje kiseline. Djelovanje 2-furaldehida ovisi o koncentraciji samog inhibitora, gustoći stanica u kulturi i uvjetima uzgoja (Palmqvist i sur., 1999b). Analizom lignocelulozних derivata, 2-furaldehid se pokazao kao najtoksičniji spoj u koncentraciji većoj od 1 gL^{-1}, pri čemu je negativno djelovao na specifičnu brzinu rasta bakterija, kvasaca i filamentoznih funga (Heer i Sauer, 2008). Isto tako, 2-furaldehid utječe na enzime glikolize i citratnog ciklusa uključene u energetski metabolizam i proizvodnju etanola. Osim 2-furaldehida, inhibiciju rasta stanica i proizvodnju etanola uzrokuje i HMF, koji ujedno produljuje i lag fazu rasta (Soccol i sur., 2011).



Slika 5. Struktura najčešćih inhibitora rasta i fermentacije (prilagođeno iz Almeida i sur., 2007).

2.2.1.1.2. Karboksilne kiseline

Karboksilne kiseline koje nastaju predtretmanom lignoceluloznih sirovina su octena (nastaje od acetilnih skupina hemiceluloze), mravlja (nastaje razgradnjom HMF-a i 2-furaldehida) i levulinska kiselina (nastaje razgradnjom HMF-a) (Slika 5). Kvasac može kao izvor ugljika koristiti slabe kiseline, koje pri nižim koncentracijama pozitivno utječu na prinos etanola (Jönsson i sur., 2013), dok pri višim koncentracijama inhibiraju rast proizvodnog mikroorganizama jer difundiraju kroz staničnu membranu i ulaze u citosol čime snižavaju pH citosola (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

2.2.1.1.3. Fenolni spojevi

Razgradnjom lignina nakuplja se mnogo fenolnih spojeva (Slika 5) s različitim funkcionalnim skupinama kao što su aldehidi, kiseline i/ili ketoni, koji se ugrađuju u membrane čime utječu na njihovu selektivnost i usporavaju rast kvasca. Za razliku od ostalih spojeva, fenolni spojevi prisutni su u manjoj koncentraciji jer imaju manju topivosti, a koncentracija i tip fenolnih spojeva razlikuju se ovisno o strukturi i udjelu lignina u pojedinoj sirovini. Neki od fenolnih spojeva koji nastaju su 4-hidroksibenzaldehid, vanilin, siringinska kiselina (Adeboye i sur., 2014), no mehanizmi kojima fenoli utječu na inhibiciju rasta kvasca

nisu još detaljno istraženi (Palmqvist i Hahn-Hägerdal., 2000). Istraživanje Adeboye i suradnika (2014) pokazalo je da svaki od testiranih fenola iz hidrolizata smreke djeluje inhibitorno na kvasce ovisno o koncentraciji, ali i o funkcionalnim skupinama i broju nezasićenih veza između ugljikovih atoma smanjujući prinos etanola, glicerola i acetata.

2.2.1.1.4. Etanol

Fermentacijom izvora ugljika kao glavni produkt metabolizma nastaje etanol koji je ujedno i inhibitor rasta jer snižava pH te dovodi do smrti stanice. Bioinformatičkom analizom genoma kvasca pronađen je velik broj gena koji sudjeluju u odgovoru na stres uzrokovan etanolom (Alexandre i sur., 2001). S obzirom na to da kvasac može tolerirati do 18 % etanola, metodama genetičkog inženjerstva nastoje se konstruirati sojevi rezistentni na više koncentracije (Jönsson i sur., 2013). Aranda i suradnici (2002) istraživali su utjecaj etanola na ekspresiju kvaščevih gena te su otkrili povezanost između rezistencije na visoku koncentraciju etanola i indukcije proteina koji sudjeluju u odgovoru na toplinski šok (engl. *heat shock proteins*, HSP).

2.2.1.1.5. Sinergističko djelovanje inhibitora

Djelovanje određenog inhibitora može se adicijski ili sinergistički pojačati drugim inhibitorom. Analizom djelovanja pojedinačnih inhibitora i njihovih kombinacije utvrđeno je da octena kiselina i 2-furaldehid djeluju sinergistički na smanjenje specifične brzine rasta te prinos biomase i etanola (Palmqvist i sur., 1999a). Klinke i suradnici (2004) pokazali da kombinacija octene kiseline, aldehida i alkohola s furanskim inhibitorima također uzrokuje sinergističku inhibiciju na rast i prinos proizvoda.

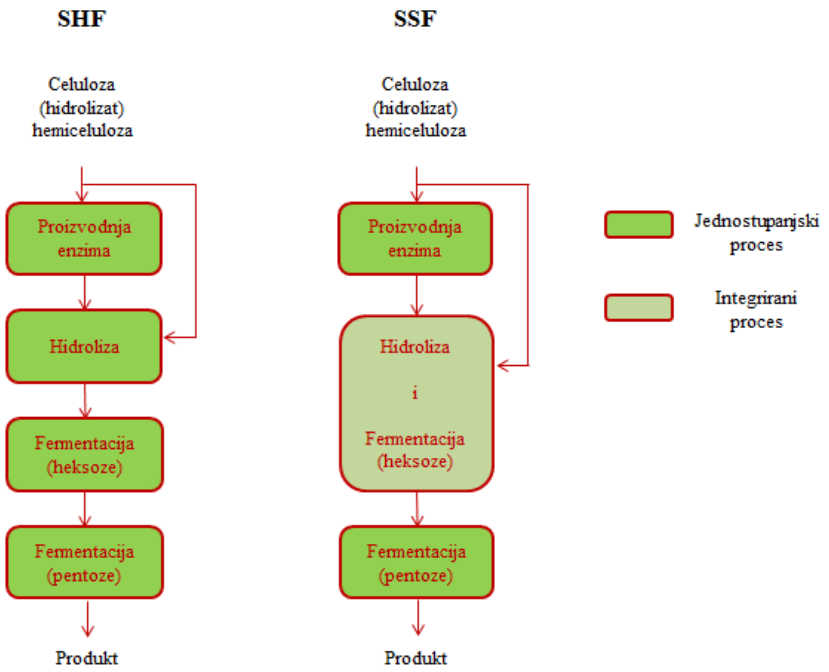
2.2.1.1.6. Uklanjanje (detoksikacija) inhibitora

Uklanjanje inhibitornih/toksičnih komponenti iz predobrađene sirovine potrebno je za postizanje odgovarajuće koncentracije fermentabilnih šećera i neometanu fermentaciju. Tako se inhibirajući spojevi mogu ukloniti ekstrakcijom ionskom izmjenom, visokim temperaturama, reducirajućim agensima, dodatkom $Ca(OH)_2$, tretmanom lakazama i peroksidazama ili upotrebom mikroorganizama. Tretman visokim temperaturama pri niskim pH vrijednostima može ukloniti lako hlapljive inhibitore fermentacije (octena kiselina i furani), a dodatkom $Ca(OH)_2$ može se ukloniti čak do 21 % i hlapivih i nehlapivih inhibitora kao što su furani i fenoli (Jönsson i sur., 2013).

2.2.2. Fermentacija lignoceluloznih sirovina

Fermentacija je mikrobni proces tijekom kojega se supstrati (fermentabilni šećeri) u anaerobnim uvjetima djelovanjem kvasca (najčešće *S. cerevisiae*) prevode u etanol. Prilikom fermentacije lignoceluloznih sirovina u etanol potrebno je provesti postupke predobrade kako bi se iz ligoceluloznog kompleksa oslobodili fermentabilni šećeri i omogućila njihova konverzija u etanol, zbog toga se primjenjuju različiti načini vođenja bioprocesa u bioreaktioru kao što su simultana saharifikacija i fermentacija te odvojena hidroliza i fermentacija (Alfani i sur., 2000).

Simultana saharifikacija i fermentacija (engl. *simultaneous saccharification and fermentation,* SSF) je jednostupanjski proces pri kojem se istovremeno vrši ošećerenje odnosno hidroliza lignoceluloznog kompleksa, a oslobođeni šećeri odmah fermentiraju u etanol čime se izbjegava inhibicija supstratom (Slika 6). Prednosti ovog procesa uključuju povećanu brzinu hidrolize, manju koncentraciju enzima, veći prinos, brži proces te potreba za samo jednim bioreaktorom, dok je odvijanje procesa na temperaturi koja nije optimalna za pojedinačne procese hidrolize i fermentacije glavni nedostatak (Sun i Cheng, 2002).



Slika 6. Različiti načini vođenja procesa - biokatalitička konverzija lignoceluloze (prilagođeno iz Jäger i Büchs, 2012).

Odvojena hidroliza i fermentacija (engl. *separate hydrolysis and fermentation*, SHF) je dvostupanjski proces pri kojem se heksoze i pentoze fermentiraju odvojeno (Slika 6). Hidroliza se provodi na temperaturi od 45 – 50 ˚C tijekom 24 – 96 sati i fermentacija pri od 30 – 35 ˚C tijekom 10 – 24 sata. Prednost dvostupanjskog procesa je provođenje hidrolize i fermentacije pri optimalnim uvjetima jer se ova dva procesa provode u odvojenim bioreaktorima (Taherzadeh i Karimi, 2007).

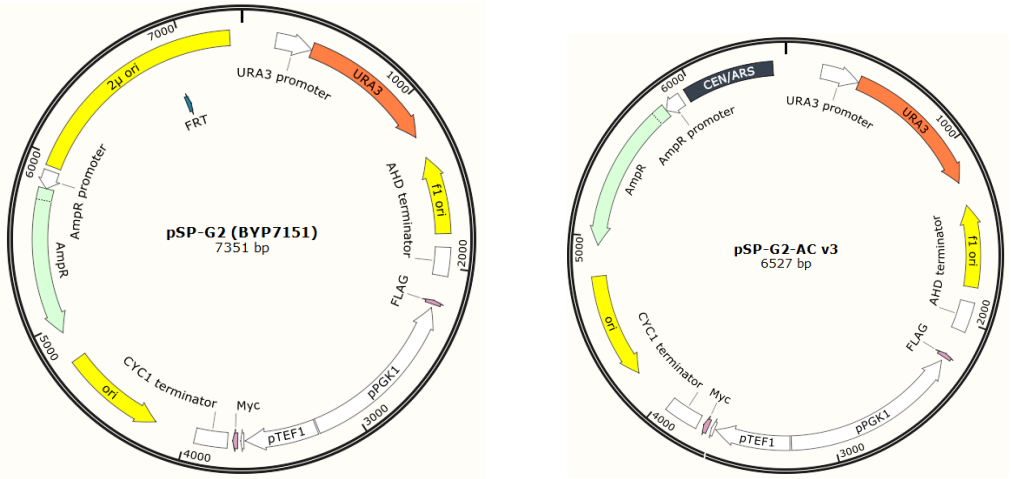
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Plazmidi

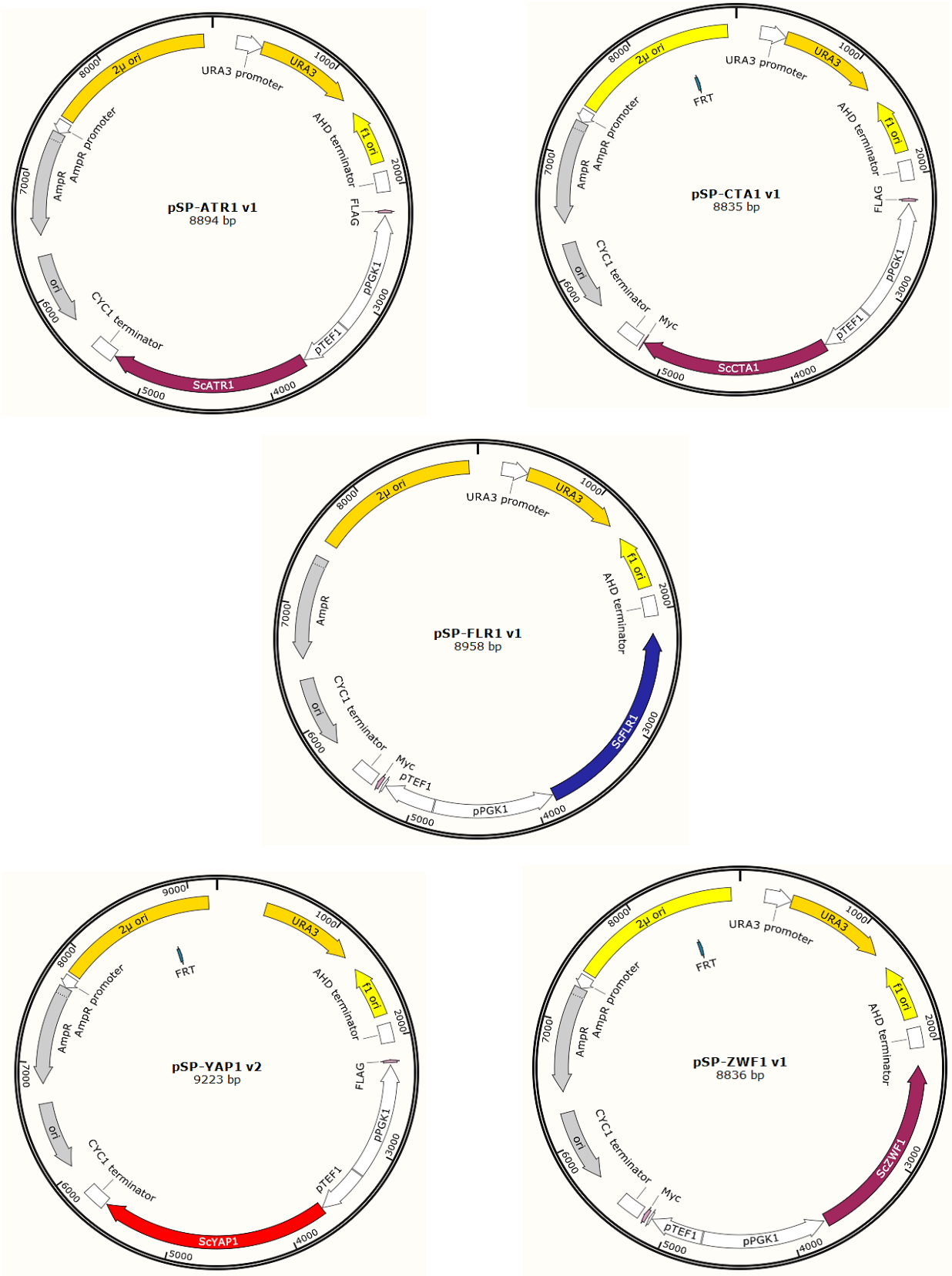
Plazmidi korišteni u ovom radu sadrže bakterijsko ishodište replikacije (*ori*) te gen *bla* koji kodira za enzim β-laktamazu koji je odgovoran za rezistenciju na ampicilin, ove sekvence omogućuje umnažanje i održavanje plazmida u bakteriji *Escherichia coli*. Osim toga, svi plazmidi sadrže i regiju *URA3* koja omogućuje selekciju transformanata kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Korištena su dva polazna plazmidna vektora, pSP-G2 i pSP-G2-AC (Slika 7), od kojih su konstruirani svi navedeni plazmidi. Ova dva plazmida razlikuju se po ishodištu replikacije, pSP-G2 sadrži 2μ ishodište replikacije (*2μ ori*) koje omogućuje održavanje plazmida u stanici kvasca u velikom broju kopija, dok plazmid pSP-G2-AC sadrži regiju *ARS/CEN* koja je omogućuje održavanje malog broja kopija.



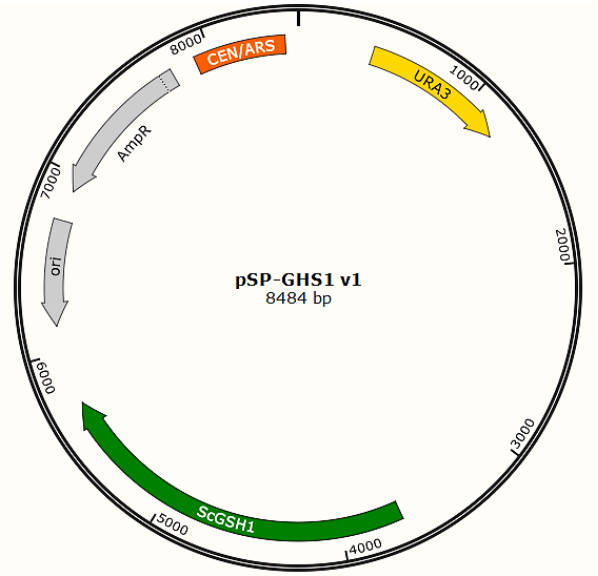
Slika 7. Mape plazmidnih vektora pSP-G2 i pSP-G2-AC, naznače su regije. Označene su regije DNA relevantne za ovaj rad.

Plazmidi pSP-ATR1, pSP-CTA1, pSP-FLR1, pSP-YAP1 i pSP-ZWF1 sadrže kvaščeve gene *ATR1*, *CTA1*, *FLR1*, *YAP1* i *ZWF1* umnožene lančanom reakcijom polimerazom i uklonirane u polilinker polaznog vektora pSP-G2 (Arambašić, 2015; Štafa, usmeno priopćenje; Slika 8). U ovome radu ispitivana je uloga pojačane ekspresije navedenih gena na rezistenciju kvasca *S. cerevisiae* na inhibitore rasta i fermentacije prisutne u lignocelulozni hidrolizatima.



Slika 8. Mape plazmida pSP-ATR1, pSP-CTA1, pSP-FLR1 i pSP-YAP1 i pSP-ZWF1. Različitim bojama prikazani su kvaščevi geni uklonirani u polilinker polaznog plazmida pSP-G2. Označene su regije DNA relevantne za ovaj rad.

Plazmid pSP-GHS1 nastao je ugradnjom kvaščevog gena *GSH1* umnoženog lančanom reakcijom polimeraze u vektor pSP-G2-AC te je u stanici kvasca prisutan u malom broju kopija (Arambašić, 2015; Štafa,usmeno priopćenje; Slika 9).



Slika 9. Mapa plazmida pSP-GHS1. Različitim bojama prikazani su kvaščevi geni uklonirani u polazni plazmid pSP-G2-AC. Označene su regije DNA relevantne za ovaj rad.

3.1.2. Mikroorganizmi

U ovom radu korišten je jedan soj bakterije *Escherichia coli* i nekoliko sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje dvolančanih plazmida korišten je soj *E. coli* DH5α genotipa *F'/endA1 hsdr17(rK-, mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NalR) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)* („New England Biolabs“, Ipswich, MA, SAD).

3.1.2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu konstruirani su u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizma Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta (Pranklin, 2015) sojevi su navedeni u Tablici 1. Dodatno, korišteni su i sojevi transformirani plazmidima navedenima u poglavlju 3.1.1. (Jalšić, 2016)

Tablica 1. Genotip kvaščevih sojeva korištenih u ovom radu.

Soj	Literaturni navod	Genotip
K1 (2421)	Pranklin, 2015	*MAT **a**/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*
K2 (E5)	Pranklin, 2015	*MAT **a**/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*
H1 (2421 x E5)	Pranklin, 2015	*MAT **a**/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*
H2 (E5 x 2421)	Pranklin, 2015	*MAT **a**/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*
I4 (2421 x E5)	Štafa, usmeno priopćenje	*MAT **a**/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*
I7 (E5 x 2421)	Štafa, usmeno priopćenje	*MAT **a**/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*

Sojevi K1 i K2 homozigotni su diploidi nastali parenjem divljih roditeljskih haploidnih sojeva: UWOPS87-2421 (K1, izoliranog iz cvijeta kaktusa) i YIIc17_E5 (K2, izoliranog iz vina) dok su sojevi H1, H2, I4 i I7 heterozigtni diploidi dobiveni križanjem haploidnih sojeva UWOPS87-2421 i YIIc17_E5. Gen *HO* koji kodira za endonukleazu Ho zamijenjen je genom *hygMX* koji nosi rezistenciju na antibiotik higromicin te ovi sojevi ne mijenjaju tipa parenja. Dodatno, gen *URA3* zamijenjen je genom *kanMX* koji nosi rezistenciju na antibiotik kanamicim zbog čega su ovi sojevi auksotrofni mutanti za uracil. Ujedno, sojevi su i auksotrofni mutanti za histidin, no nije poznato koji gen u biosintetskom putu histidina je mutiran.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Sve podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 minuta pri 121 °C i čuvaju pri sobnoj temperaturi (osim ako nije posebno napomenuto) ili se pripremaju iz sterilnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute podloge dobiju se iz tekućih dodatkom 20 g L^{-1} agara prije sterilizacije.

3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije Escherichia coli

LB (Kompletna podloga)

Bacto-tripton	10 g L^{-1}
Bacto-yeast extract	5 g L^{-1}
NaCl	10 g L^{-1}

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

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca Saccharomyces cerevisiae

Kompletna (kompleksna) podloga (YPD)

Bacto-pepton	20 g L^{-1}
Kvaščev ekstrakt	10 g L^{-1}
Glukoza	20 g L^{-1}
H_2O	nadopuniti do 1000 mL

Kemijski definirana podloga

Izvor dušika iz kvasca bez aminokiselina i amonijevog sulfata	1,68 g L^{-1}
Amonijev-sulfat	5,0 g L^{-1}
Glukoza	20,0 g L^{-1}
Drop out (smjesa aminokiselina, D.O.)	1,3 g L^{-1}
H_2O	nadopuniti do 1000 mL

Kemijski definirana podloga koja ne sadrži jednu ili više aminokiselina ili nukleotidnih baza, priprema se na isti način osim što se prilikom pripreme smjese nukleinskih baza i aminokiselina izostavi odgovarajuća tvar rasta.

Minimalna podloga (MM)

Yeast nitrogen base (YNB-soli)	0,2 g L^{-1}
Stock vitamina	100 μL L^{-1}
Amonijev-sulfat	5,0 g L^{-1}
Kalijevdihidrogen fosfat	1,0 g L^{-1}
Magnezijev sulfat (heptahidrat)	1,0 g L^{-1}
Glukoza	20 g L^{-1}
H2O	nadopuniti do 1000 mL

Smjesa aminokiselina ("drop-out powder")	1,3g
adenin sulfat	2,5 g
uracil	1,2 g
L-arginin-klorid	1,2 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g
L-fenilalanin	3,0 g
L-glutaminska kiselina	6,0 g
L-histidin-klorid	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-lizin-klorid	1,8 g
L-metionin	1,2 g
L-serin	22,5 g
L-tirozin	1,8 g
L-treonin	12,0 g
L-triptofan	2,4 g
L-valin	9,0g

Podloga BTP (podloga s bromtimol plavim):

Izvor dušika iz kvasca (bez aminokiselina i amonij sulfata)	6,7 g L^{-1}
Smjesa nukleinskih baza i aminokiselina	1,4 g L^{-1}
Glukoza	20,0 g L^{-1}
*Podesiti pH dodatkom peleta NaOH do pH 7	
BTP	130,0 mg L^{-1}

3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8 M)

Otopina se priprema otapanjem 61,66 g amonijevog acetata u 100 mL destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Ampicilin (20 mg mL^{-1})

Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 ˚C

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

18,61 g Na_2EDTA x $2H_2O$ otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se podesi dodatkom natrijevog hidroksida (približno 2 g peleta) i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL.

Fenol

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

Kloroform/izoamilni alkohol

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

Kalijev acetat (3 M; pH 4,8)

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

Natrijev acetat (3 M; pH 4,8)

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

NaOH/SDS

0,2 mol L^{-1}natrijev hidroksid

SDS 10,0 g L^{-1}

Otopina se ne sterilizira, a priprema se neposredno prije uporabe.

RNaza (10 mg/mL)

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

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

10 mmol L^{-1} Tris-Cl pH 8,0 ili 7,4

1 mmol L^{-1} EDTA pH 8,0

Priprema se iz sterilnih otopina.

Tris-HCl (1 M)

12,1 g Tris otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se do željene vrijednosti podesi dodatkom koncentrirane kloridne kiseline i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL.

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

Zimoliaza 20-T

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

3.1.3.4. Otopine za gel-elektroforezu

Agarozni gel

Priprema se otapanjem agaroze u TBE puferu (1 x) koji se pripremi razrjeđivanjem TBE pufera (10 x). Koncentracija agaroze u gelu može biti od 7 do 20 g L^{-1}, ovisno o veličini fragmenata koji se razdvajaju elektroforezom.

Boja za nanošenje uzorka (6 x)

bromfenol plavo	0,03 %
ksilen cijanol FF	0,03 %
glicerol	60 %
SDS	1 %

100 mmol L^{-1} EDTA pH 8,0

Otopina se može sterilizirati filtracijom i čuva se pri 4 °C.

Etidij-bromid

Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg mL^{-1}, ne sterilizira se i čuva se pri 4 °C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u jednu litru deionizirane vode i također čuva u tamnoj boci.

TBE pufer (10 x)

Tris	108 g L^{-1}
borna kiselina	55 g L^{-1}
0,5 M EDTA pH 8,0	40 mL L^{-1}

3.1.3.5. Otopine za određivanje utjecaja inhibitora na rast kvasca S. cerevisiae

Pripremljene su 1 M otopine octene kiseline, levulinske kiseline i 2-furaldehida koje su zatim sterilizirane i korištene za daljnju pripremu potrebnih koncentracija otopina za određivanje rasta kvasca.

2-furaldehid (1 M)

2-furaldehid (10 M)	4,0 mL
etanol	36,0 mL

levulinska kiselina (1 M)

98 % levulinska kiselina	4,7 g
deionizirana voda	40,0 mL

octena kiselina (1 M)

octena kiselina (16,5 M)	2,4 mL
deionizirana voda	37,6 mL

3.1.3.6. Kemikalije i enzimi

Agaroza	*Appligene*, Illkirch, Francuska
Apsolutni etanol	*Kemika*, Zagreb, Hrvatska
DNA bakteriofaga λ	*Fermentas International Inc.*, Ontario, Kanada
Bromtimol plavo (BTP)	*Sigma-Aldrich*, Buchs, Švicarska
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA, te odgovarajući puferi	*New England Biolabs*, Ipswich, MA, SAD, *Roche Applied Science*, Indianapolis, IN, SAD, *Pharmacia Biotech*, San Francisco, SAD, *Fermentas International Inc*., Ontario, Kanada
Etidij-bromid	*Roche Applied Science*, Indianapolis, IN, SAD
2-Furaldehid	*Acrōs Organics*, Geel, Belgija
Izopropanol	*Kemika*, Zagreb, Hrvatska
Levulinska kiselina	*Acrōs Organics*, Geel, Belgija
Kemikalije za pripremu hranjivih podloga	*Difco*, Detroit, SAD *Merck*, Darmstadt, Njemačka
Kemikalije za pripremu ostalih otopina	*Fluka*, Buchs, Švicarska, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska *Alkaloid*, Skoplje, Makedonija
Natrijev acetat	*Kemika*, Zagreb, Hrvatska
Octena kiselina	*Avantor Performance Materials B.V.* Deventer, Nizozemska
PEG	*Fluka*, Buchs, Švicarska
Ribonukleaza A	*Sigma-Aldrich*, Buchs, Švicarska
Sorbitol	*Barr*, Zagreb, Hrvatska
Tris	*Sigma-Aldrich*, Buchs, Švicarska
Zimoliaza (Zymolyaze 20-T)	*Seikugaku Kogyo Co*., Tokyo, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA

3.2.1.1. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena

Za izolaciju dvolančanog plazmida korištena je standardna metode alkalne lize (Sambrook i Russel, 2001), uz manje modifikacije. 1000 mL prekonoćne kulture bakterije *Escherichia coli* centrifugirano je deset minuta na 5000 okretaja u minuti te je talog resuspendiran u 20 mL TE-pufera i ostavljen 5 minuta na ledu. Suspenziji je dodano 10 mL otopine natrijev hidroksid/SDS i blago je promiješano te je ponovno ostavljeno 5 minuta na ledu. Zatim je dodano 3 volumena (15 mL) 3 M natrijevog acetata i inkubirano 20 minuta pri -20 ˚C. Nakon inkubacije, centrifugirano je 20 minuta na 6000 okretaja u minuti. Supernatant je prebačen u novu kivetu i ponovo centrifugiran pri istim uvjetima. Bistri supernatant preliven je u novu kivetu, određen mu je volumen, pomiješan s 0,6 volumena izopropanola i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija je centrifugirana 30 minuta na 6000 okretaja u minuti te je supernatant bačen, a talog sušen u laminaru. Kad je talog posušen, otopljen je u 300 µL TE-pufera i 10 µL RNaze. Ako je DNA dobro otopljena u TE-puferu slijedi fenolizacija (poglavlje 3.2.1.2.). Plazmidna DNA taložena je amonijevim acetatom i apsolutnim etanolom (poglavlje 3.2.1.3.) i otopljena u 300 µL TE-pufera pH 8,0. Može se DNA još jednom pretaložiti amonijevim acetatom i etanolom te kao u prethodnom koraku i otopiti u 300 µL TE-pufera pH 8,0.

3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol

Otopini DNA dodan je jednaki volumen smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1. Potrebno je snažno promiješati zatim je centrifugirano 2 minute na 11000 okretaja u minuti. Gornja faza oprezno je prenesena u novu kivetu.

Postupak je ponovljen sve dok se nakon centrifugiranja nije prestao pojavljivati proteinski talog (između gornje i donje faze). Ako je proteinski talog uklonjen, gornja faza prenesena je u novu kivetu i dodan je jednaki volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol da bi se uklonio zaostali fenol, snažno je promiješano i nakon centrifugiranja (2 minute na 11000 okretaja u minuti) gornja faza prenesena u novu kivetu.

3.2.1.3. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

Najčešće se DNA taloži smjesom amonijeva acetata i etanola. Volumenu DNA dodano je 1/3 volumena 8 M amonijevog acetata i 8/3 volumena apsolutnog etanola. Uzorak je čuvan najmanje 2 sata pri temperaturi od -20 ˚C. Talog DNA dobiven je centrifugiranjem 20 minuta na 11000 okretaja u minuti pri 4 ˚C.

3.2.1.4. Cijepanje i modifikacija DNA

Cijepanje i modifikacija DNA provedeni su prema uputama proizvođača restrikcijskih i modifikacijskih enzima („New England Biolabs" Ipswich, MA, SAD; „Roche Applied Science" Indianapolis, IN, SAD; „GE Healthcare Bio-Sciences" AB, Uppsala, Švedska; „Fermentas International Inc.", Ontario, Kanada).

3.2.2. Gel elektroforeza

Otopljeni agarozni gel (poglavlje 3.1.3.4.) ohlađen je na oko 60 ˚C i izliven u nosač gela na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Kad je gel skrutnut, izvađen je češalj i nosač gela je postavljen u kadicu za elektroforezu u koju je uliven TBE-pufer (1 x) tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1 mm. Uzorci DNA pomiješani su s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 6:1 i uneseni mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza je u kadicama GNA 100 provođena pri naponu do 70 V u vremenu od 1-3 sata (ovisno o koncentraciji agaroze i veličini fragmenata DNA koji se analiziraju). Za elektroforezu DNA korišten je 0,8 %-tni agarozni gel i TBE-pufer. Nakon provedene elektroforeze DNA je vizualizirana namakanjem gela u otopini etidij-bromida (15 do 20 minuta) te izložena ultraljubičastom svjetlu. Gel je fotografiran kroz crveni filter.

3.2.3. Određivanje utjecaja inhibitora na rast kvasca *S. cerevisiae*

3.2.3.1. Utjecaj inhibitora na rast u tekućem mediju

Za određivanje utjecaja inhibitora (octene i levulinske kiseline te 2-furaldehida i etanola) na rast kvasca *S. cerevisiae,* kulture su uzgojene do stacionarne faze rasta. Kulture su razrijeđene tako da je OD_{600} približno jednak u svim mjerenim uzorcima te su dodane prethodno pripremljene otopine inhibitora (poglavlje 3.1.3.5.) u određenim volumenima kako bi se postigla određena koncentracija inhibitora u pojedinoj kulturi. Kao kontrole korištene su

dvije kulture, jedna u koju nije ništa dodano i druga u koju je dodan volumen sterilne vode koji odgovara najvećem dodanom volumenu matične otopine inhibitora kako bi se korigiralo razrjeđenje kulture. Apsorbancija je mjerena je pomoću spektrofotometra (Slika 10) odmah po dodatku inhibitora (t_0) te nakon 3, 12 i 24 sata, a za svaku kulturu provedena su dva do četiri eksperimenta sa svakim od inhibitora (ovisno o odstupanjima rezultata između dva eksperimenta). Zatim su izračunate srednje vrijednosti koje su normalizirane obzirom na vrijednost apsorbancije u $t_{0,\,a}$ rezultati su prikazani grafički. Zbog flokulacije korištenih sojeva kvasca, apsorbancija je mjerena tako da je u kiveti pomiješan 1 mL kulture i 1 mL 1 M natrij citrata za koji je pokazano da sprječava flokulaciju (Pranklin, 2015).



Slika 10. Spektrofotometar na kojem su provedena mjerenja utjecaja inhibitora na rast u tekućem mediju.

3.*2.3.2. Utjecaj inhibitora na rast kvasca na krutoj podlozi*

Za određivanje utjecaja inhibitora (octene i levulinske kiseline te 2-furaldehida) na krutoj podlozi na rast kvasca *S. cerevisiae* („spot analiza“), kulture su uzgojene do stacionarne faze rasta u 1,5 mL tekuće selektivne podloge bez uracila, ako su nacjepljivani transformirani sojevi koji sadrže plazmide sa genom *URA3* kao selektivnim markerom ili u 1,5 mL selektivne podloge sa uracilom u slučaju netransformiranih sojeva. Kulture su razrijeđene do šestog decimalnog razrjeđenja, pri čemu je prvo decimalno razrjeđenje napravljeno u 1 M natrijevom-citratu zbog flokulacije sojeva. Pripremljene su kompletne i selektivne hranjive

podloge bez dodatka inhibitora i s određenim, različitim koncentracijama inhibitora rasta. 5 µL svakog decimalnog razrjeđenja nacijepljeno je na krutu kompletnu i selektivnu hranjivu podlogu. Nakon dva dana uzgoja pri 28 °C, kulture su izvađene iz termostata te su prebrojane porasle kolonije kako bi se izračunalo preživljenje.

3.2.4. Određivanje stabilnosti plazmida pri uzgoju u neselektivnim uvjetima

Kako bi se odredila stabilnost plazmida u transformiranim sojevima u neselektivnim uvjetima, transformanti koji sadrže plazmid pSP-YAP1 (poglavlje 3.1.1.2) uzgajani su do stacionarne faze rasta u 2 mL selektivne hranjive podloge. Svaki soj nacijepljen je u četiri kompletne tekuće podloge: jednu bez dodatka inhibitora te tri s inhibitorima rasta (octenom i levulinskom kiselinom koncentracije 100 mM te 2-furaldehidom koncentracije 20 mM). Nakon dva dana uzgoja pri 28 °C, porasle kulture su razrijeđene, pri čemu je prvo decimalno razrjeđenje napravljeno u 1 M natrijevom citratu, zbog flokulacije sojeva, i 100 µL razrjeđenja nacijepljeno na krutu kompletnu hranjivu podlogu. Nakon dva dana inkubacije na 28 °C, porasle kolonije su prebrojane i replicirane na selektivnu hranjivu podlogu bez uracila. Nakon dodatna dva dana inkubacije prebroje se kolonije narasle na selektivnoj podlozi i izračuna se postotak stanica u kulturi koje su zadržale plazmid te preživljenje sojeva ovisno o inhibitoru koji je dodan kulturi.

3.2.5. Određivanje fermentacijske sposobnosti kvasca *S. cerevisiae*

Otopina bromtimol plavo (BTP) indikator je promjene pH i to svojstvo koristi se za detekciju promjene pH hranjive podloge, nacijepljene kvascem *S. cerevisiae*, a uzrokovane fermentacijom, odnosno proizvodnjom CO_2 koji prelazi u ugljičnu kiselinu koja snižava pH:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2$$

$$CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$$

Sposobnost kvasca *S. cerevisiae* da proizvodi CO_2 prati se na minimalnoj podlozi u prisutnosti BTP-a (poglavlje 3.1.3.2.) tako da se naprave decimalna razrjeđenja kulture uzgojene do stacionarne faze te se po 3 µL prva četiri decimalna razrjeđenja nacijepi u obliku kapljica na podlogu BTP, a rezultati se očitaju nakon dva dana. Dodatno, 100 µL šestog decimalnog razrjeđenja nacijepi se na podlogu BTP kako bi narasle pojedinačne kolonije koje se na temelju boje i veličine kolonije klasificiraju kao crvene i žute, odnosno male, srednje i velike.

4. REZULTATI I RASPRAVA

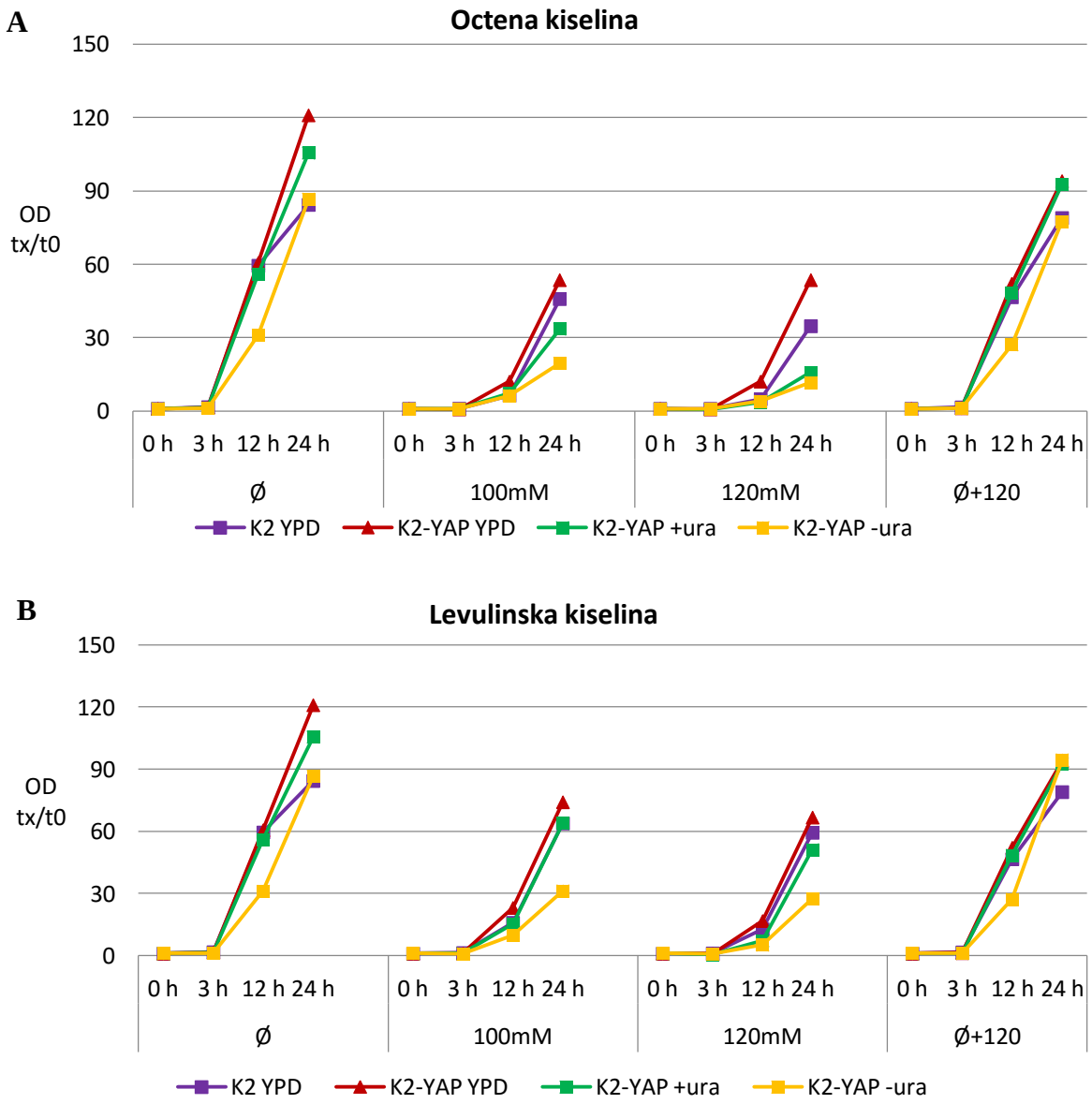
Za ekonomski isplativu proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, potrebno je koristiti proizvodne sojeve koji su rezistentni na visoke koncentracije inhibitora rasta čime se smanjuju troškovi obrade hidrolizata koji se koristi kako sirovina. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj inhibitora rasta, nastalih razgradnjom lignocelulozih sirovina (octene i levulinske kiseline te 2-furaldehida) i etanola, kao konačnog produkta fermentacije, na diploidne sojeve kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te utvrditi utječe li pojačana ekspresija gena *ATR1*, *FLR1*, *YAP1*, *CTA1*, *ZWF1* i *GSH1* na rezistenciju sojeva na inhibitore rasta. Također, provjerena je sposobnost fermentacije konstruiranih sojeva to jest da li pojačana ekspresija ovih gena utječe na sposobnost fermentacije kvasca.

4.1. Utjecaj pojačane ekspresije gena *YAP1* na rezistenciju soja K2 na inhibitore rasta prisutne u tekućim hranjivim podlogama

Prethodni eksperimenti utjecaja inhibitora na rast homozigotnih i heterozigotnih sojeva kvasca u tekućoj hranjivoj podlozi bili su provedeni s maksimalnim koncentracijama od 100 mM octene i levulinske kiseline te 30 mM 2-furaldehida (Pranklin, 2015). U ovome radu istraživano je postoji li pozitivan utjecaj pojačane ekspresije određenih kvaščevih gena na rezistenciju na inhibitore rasta, a posljedično i na prirast biomase, zbog čega je povećana koncentracija octene i levulinske kiseline na 120 mM dok je koncentracija najtoksičnijeg inhibitora, 2-furaldehida, ostala nepromijenjena (poglavlje 3.2.3.1.).

Nakon određivanja koncentracije inhibitora koja značajno usporava ili zaustavlja rast odabranih sojeva, proizvodne sojeve može se dodatno modificirati tehnikama genetičkog inženjerstva kako bi bili otporniji na više koncentracije inhibitora čime se smanjuju troškove proizvodnje (Alriksson i sur., 2010). U ovome radu ispitana je mogućnost povećanja rezistencije na inhibitore rasta nakon unosa i pojačane ekspresije odabranih kvaščevih gena. Naime, gen *YAP1* kodira za transkripcijski faktor *Yap1*, protein koji sudjeluje u odgovoru na oksidativni stres, rezistenciju na H_2O_2 i kontrolira regulon koji sadrži najmanje 32 proteina odgovorna za oksidativni stres (Lee i sur., 1999). Kako bi se ispitao utjecaj pojačane ekspresije gena *YAP1* na rezistenciju na inhibitore rasta, korišten je homozigotni diploidni soj K2-YAP1 nastao transformacijom homozigotnog diploidnog soja K2 plazmidom pSP-YAP1 (Jalšić, 2016). Dodatno, željelo se utvrditi i kako različit sastav hranjivih podloga utječe na

prirast biomase uz dodatak inhibitora rasta pa su korištene: kompleksna (YPD) i kemijski definirana (+ura) hranjiva podloga koje sadrže uracil, dok selektivna kemijski definirana podloga (–ura), ne sadrži uracil i omogućuje rast samo transformiranih stanica koje sadrže plazmid pSP-YAP1.



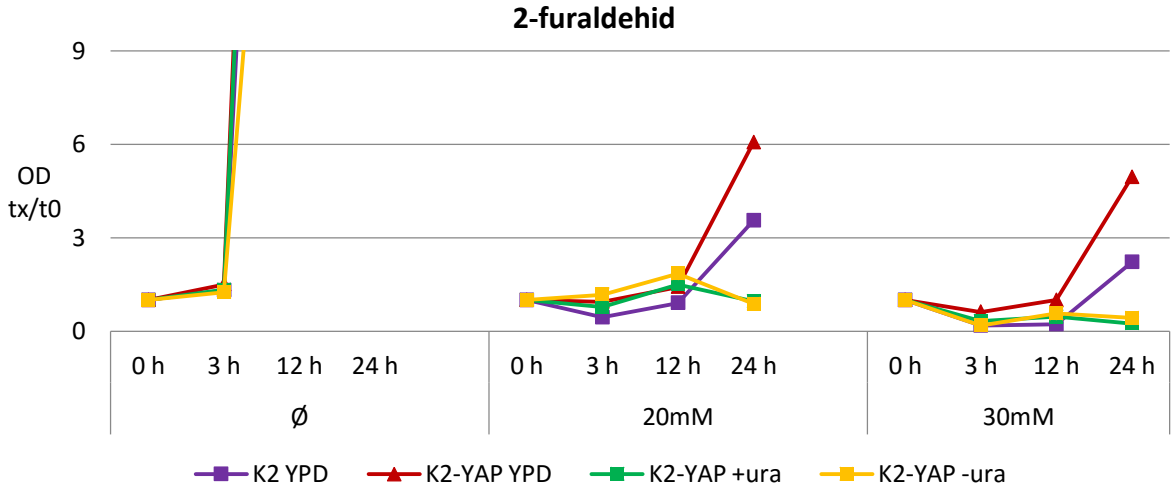
Slika 11. Prirast biomase netransformiranog (K2) i transformiranog (K2-YAP) diploidnog soja u različitim hranjivim podlogama uz dodatak octene kiseline (A) i levulinske (B) kiseline. Ø označava kontrolu (kultura bez inhibitora), Ø+120 označava kontrolu za eksperimente u kojima je dodan inhibitor do finalne koncentracije od 120 mM pri čemu je došlo do znatnijeg povećanja volumena kulture, YPD označava kompleksnu kompletnu, a +ura kemijski definiranu kompletnu podlogu, -ura obilježava selektivnu kemijski definiranu podlogu koja ne sadrži uracil.

I octena i levulinska kiselina djeluju inhibitorno na rast biomase no utjecaj levulinske kiseline je ipak slabiji (Slika 11). Mirisola i Longo (2012) naveli su da pH i sastav

medija igraju bitnu ulogu tijekom kronološkog starenja u *Saccharomyces cerevisiae* te intracelularni pad pH na produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), pri čemu dolazi do disfunkcije mitohondrija i posljedično kronološkog starenja kvasca, a upravo je octena kiselina jedan od induktora kronološkog starenja što posljedično dovodi do stanične smrti (Burtner i sur., 2009).

Iz rezultata na slici 11 je vidljivo da transformirani soj K2-YAP1 ima veći prirast u odnosu na kontrolni soj K2, u kompleksnoj kompletnoj podlozi (YPD) u koju su dodani inhibitori rasta (octena i levulinska kiselina), čime je potvrđeno da pojačana ekspresija gena *YAP1* povećava rezistenciju soja na inhibitore rasta. U skladu s očekivanjima, u svim ispitivanim uvjetima, prirast biomase najveći je u najbogatijoj, kompletnoj kompleksnoj hranjivoj podlozi (YPD), nešto je niži u kompletnoj kemijski definiranoj podlozi (+ura) i najniži je u selektivnoj kemijski definiranoj podlozi koja ne sadrži uracil (-ura).

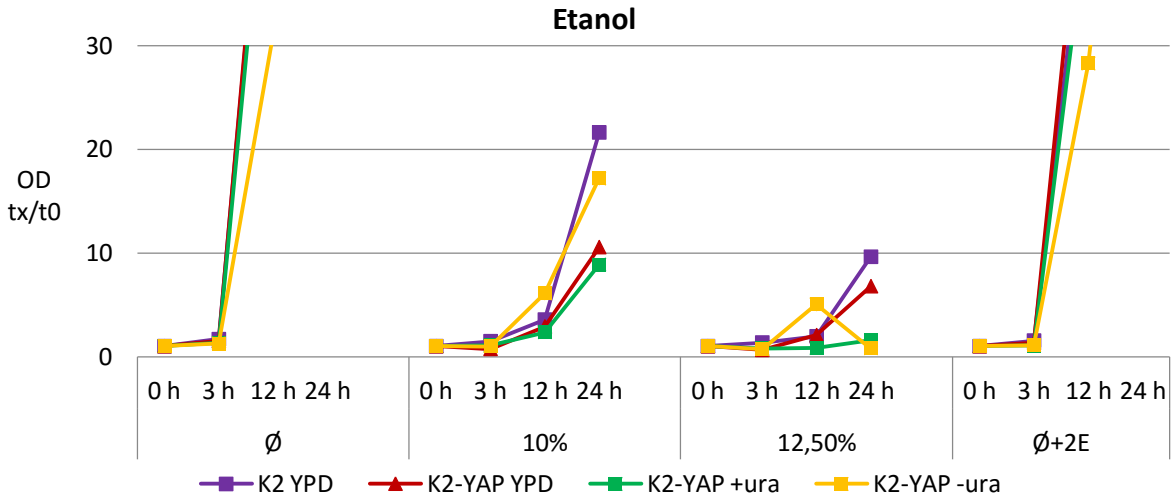
Razgradnjom pentoza prilikom predobrade lignoceluloznih sirovina, uz kiseline, nastaje i 2-furaldehid. Djelovanje 2-furaldehida ovisi o koncentraciji samog inhibitora, gustoći stanica u kulturi i uvjetima uzgoja (Palmqvist i sur., 1999b).



Slika 12. Prirast biomase netransformiranog (K2) i transformiranog (K2-YAP) diploidnog soja u različitim hranjivim podlogama uz dodatak 2-furaldehida. Ø označava kontrolu (kultura bez inhibitora), Ø+120 označava kontrolu za eksperimente u kojima je dodan inhibitor do finalne koncentracije od 120 mM pri čemu je došlo do znatnijeg povećanja volumena kulture, YPD označava kompleksnu kompletnu, a +ura kemijski definiranu kompletnu podlogu, -ura obilježava selektivnu kemijski definiranu podlogu koja ne sadrži uracil. Prirast biomase u kontrolnim kulturama je jednak onom na slici 11, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u prirastu biomase u kulturama u koje je dodan 2-furaldehid.

Usporedbi s karboksilnim kiselinama, 2-furaldehid drastično inhibira rast svih ispitivanih sojeva kvasca te je prirast biomase gotovo 10 puta manji nego pri uzgoju sojeva bez dodatka inhibitora (Slika 12). Prikazani rezultati u skladu su s eksperimentima od Heer i Sauer (2008) koji sugeriraju da je upravo 2-furaldehid glavni toksični spoj za kvasce koji djeluje inhibitorno i na rast stanica i na proizvodnju etanola. Upravo zbog jakog inhibitornog djelovanja 2-furaldehida bitno je naglasiti da u ovim eksperimentima pojačana ekspresija gena *YAP1* pozitivno utječe na rezistenciju soja K2.

Fermentacijom izvora ugljika u anaerobnim uvjetima nastaje etanol kao glavni produkt metabolizma kvasca. Iako kvasac može tolerirati do 18 % etanola, pri koncentracijama većim od 10%, etanol znatno inhibira rasta stanica jer snižava pH i posljedično dovodi do smrti stanice kvasca (Jönsson i sur., 2013).



Slika 13. Prirast biomase netransformiranog (K2) i transformiranog (K2-YAP) diploidnog soja u različitim hranjivim podlogama uz dodatak etanola. Ø označava kontrolu (kultura bez inhibitora), Ø+2E označava kontrolu za eksperimente u kojima je dodan inhibitor do finalne koncentracije od 12,5 % pri čemu je došlo do znatnijeg povećanja volumena kulture, YPD označava kompleksnu kompletnu, a +ura kemijski definiranu kompletnu podlogu, -ura obilježava selektivnu kemijski definiranu podlogu koja ne sadrži uracil. Prirast biomase u kontrolnim kulturama je jednak onom na slici 11, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u prirastu biomase u kulturama u koje je dodan etanol.

Etanol je značajno inhibirao rast stanica kvasca već pri koncentraciji od 10 %, što je rezultiralo nižim prirastom ispitivanog soja. Unatoč tome, najbolji prirast uočen je kod ishodnog netransformiranog soja K2 (Slika 13), što znači da unos gena *YAP1* nije povećao rezistenciju na etanol zbog čega je potrebno provesti dodatna ispitivanja. Dodatno, prirast

biomase u kulturama koje sadrže 12,5 % etanola je jako nizak, što je u skladu s objavljenim rezultatima (Jönsson i sur., 2013).

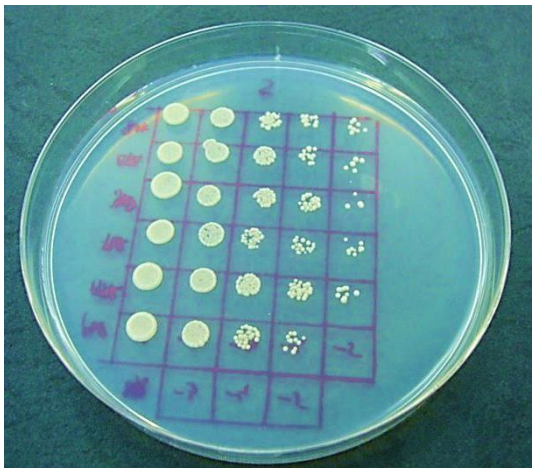
4.2. Utjecaj inhibitora na rast homozigotnih i heterozigotnih diploidnih sojeva na krutim podlogama

U eksperimentima na krutim podlogama korištene su različite koncentracije octene i levulinske kiseline u rasponu od 80 mM do 170 mM. Provjerena je razlika u rastu sojeva ovisno o sastavu korištenih podloga: kompletne kompleksne (YPD), kompletne kemijski definirane (+ura) i selektivne podloge (-ura). Važno je napomenuti da kod rasta na krutim podlogama nema flokulacije koja je inače odgovorna za zaštitu stanica u tekućim podlogama (Soares, 2010).

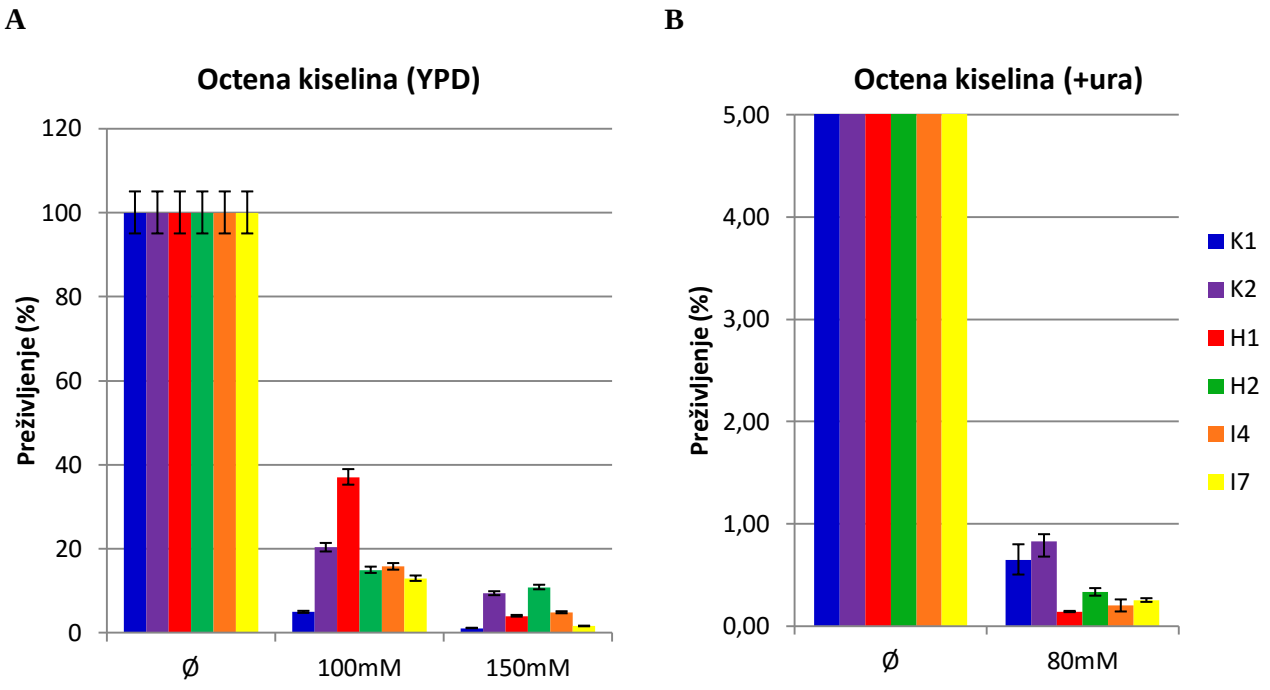
U ovome radu istražena je mogućnost povećanja rezistencije na inhibitore rasta nakon unosa i pojačane ekspresije odabranih kvaščevih gena: *ATR1*, *CTA1*, *FLR1*, *GSH1*, *YAP1*, *ZWF1*. Nakon određivanja koncentracije inhibitora koja značajno usporava ili zaustavlja rast odabranih netransformiranih sojeva, ispitani su odabrani transformanti proizvodnih sojeva, kako bi se ispitala njihova rezistencija na inhibitore rasta. Naime, pojačana ekspresija gena *ATR1* i *FLR1* može doprinijeti povećanoj rezistenciji proizvodnih sojeva na HMF i koniferil aldehid (Alriksson i sur., 2010). Nadalje, pojačana ekspresija gena *GSH1* doprinosi boljoj zaštiti od djelovanja toksičnih metabolita (Ask i sur., 2013), dok produkti gena *YAP1* i *ZWF1* sudjeluju u zaštiti stanice kvasca od oksidativnog stresa i rezistenciji na inhibitore rasta (Alrikson i sur., 2010; Gorisch, 2005)

4.2.1. Utjecaj inhibitora na rast netransformiranih diploidnih sojeva na krutim kompleksnim i kemijski definiranim podlogama

Za homozigotne i heterozigotne diploidne sojeve korištene u ovom radu do sad nije određena koncentracija inhibitora koja značajno smanjuje preživljenje na krutim hranjivim podlogama. Zbog toga su stanice kvasca uzgajane do stacionarne faze rasta nakon čega je kultura razrijeđena, a pojedina razrjeđenja kultura zatim nacijepljena u obliku kapljica na pripremljene kompleksne i kemijski definirane hranjive podloge bez dodatka inhibitora ili s dodatkom različitih koncentracija inhibitora rasta (Slika 14). Za svaki soj izračunato je preživljenje, prebrojane su porasle kolonije na podlogama bez dodatka inhibitora (kontrola) i na podlogama s dodatkom inhibitora octene (Slika 15) i levulinske kiseline (Slika 16) te 2-furaldehida (Slika 17).



Slika 14. Određivanje postotka preživljenja na krutim hranjivim podlogama u koje je dodan odgovarajući inhibitor rasta. Nacijepljena su decimalna razrijeđenja odgovarajućih sojeva u obliku kapljica („Spot analiza“).

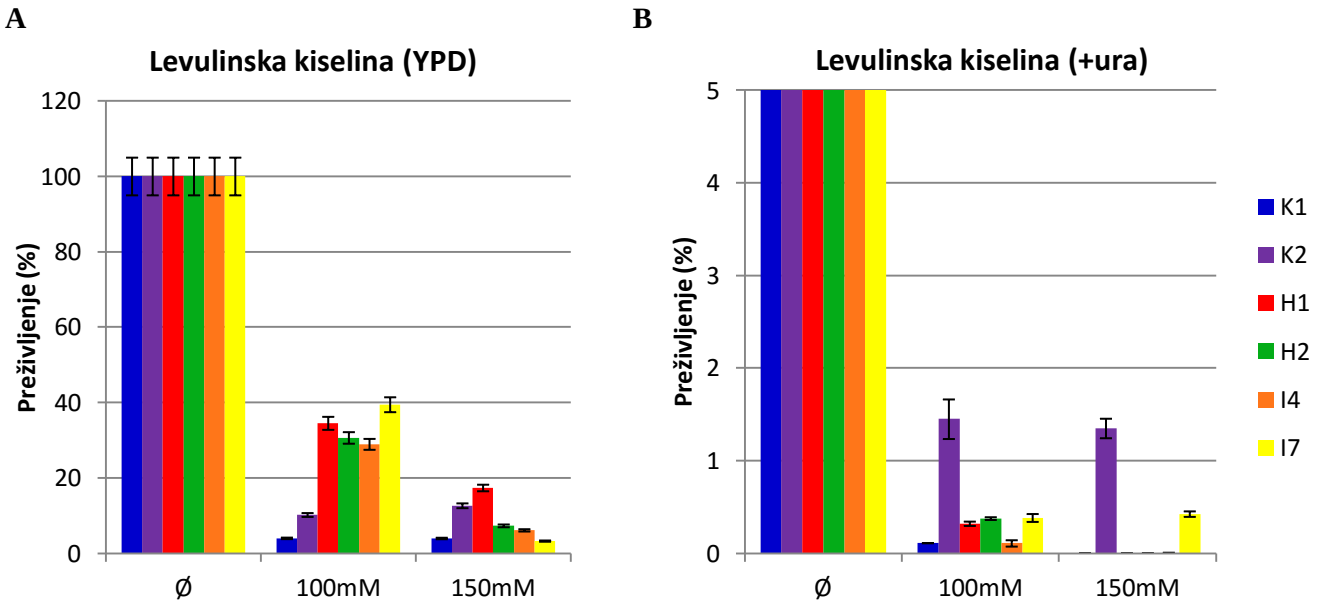


Slika 15. Postotak preživljenja netransformiranih sojeva na kompletnoj kompleksnoj podlozi (YPD) (A) i kompletnoj kemijski definiranoj podlozi (B) uz dodatak različitih koncentracija octene kiseline Preživljenje na slici B u kontrolnim kulturama iznosi 100 %, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u preživljenju kultura koje su nacijepljene na kompletne kemijski definirane podloge u koje je dodana octena kiselina.

Iz rezultata prikazanih na slici 15 vidljivo je da na kompleksnoj kompletnoj (YPD) podlozi s 100 mM octenom kiselinom najbolje raste heterozigotni diploid H1, dok je pad preživljenja na većim koncentracijama (150 mM) za sve sojeve podjednak. Da bi se usporedio

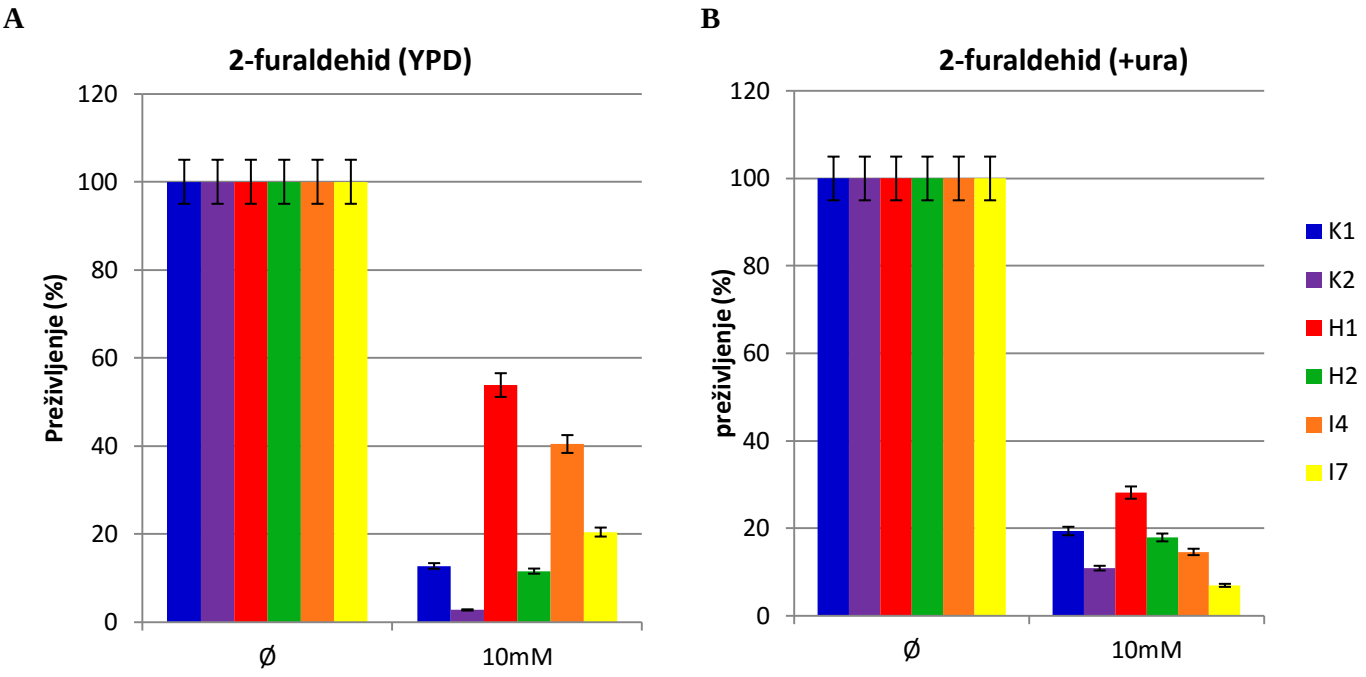
utjecaj sastava hranjive podloge na rast stanica kvasca korištena je i kompletna kemijski definirana podloga uz dodatak 80 mM octene kiseline, a svi su sojevi imali izuzetno nisko preživljenje, manje od 1%. Znatno bolje preživljenje sojeva na kompletnoj kompleksnoj nego na kompletnoj kemijski definiranoj podlozi je i očekivano, jer kompletna kompleksna podloga sadrži sve potrebne čimbenike rasta koje kvasac može direktno metabolizirati, dok kemijski definirana podloga sadrži prekursore iz kojih kvasac mora sintetizirati potrebne tvari rasta (Sherman, 2002).

U skladu s rezultatima u poglavlju 4.1. vidljivo je da svi analizirani sojevi bolje rastu na kompletnoj kompleksnoj nego na kompletnoj kemijski definiranoj podlozi s octenom kiselinom te su na kemijski definiranoj podlozi.



Slika 16. Postotak preživljenja netransformiranih sojeva na kompletnoj kompleksnoj podlozi (YPD) (A) i kompleksnoj kemijski definiranoj podlozi (B) uz dodatak različitih koncentracija levulinske kiseline. Preživljenje na slici B u kontrolnim kulturama iznosi 100 %, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u preživljenju kultura koje su nacijepljene na kompletne kemijski definirane podloge u koje je dodana levulinska kiselina.

Analizirani homozigotni i heterozigotni diploidni sojevi imali su značajan pad preživljenja na kompletnim kompleksnim hranjivim podlogama uz dodatak 150 mM levulinske kiseline (Slika 16A), dok je, kao i u slučaju kompletne kemijski definirane podloge (Slika 16B), preživljenje na podlozi s 150 mM levulinskom kiselinom jedino za najrezistentniji soj K2 bilo iznad 1%. Zanimljivo je da homozigotni diploidni soj K2 nema visoko preživljenje, u odnosu na ostale sojeve, na kompleksnoj kompletnoj podlozi, dok mu je preživljenje na kompletnoj kemijski definiranoj podlozi bolje nego ostalim sojevima.



Slika 17. Postotak preživljenja netransformiranih sojeva na kompletnoj kompleksnoj podlozi (YPD) (A) i kompletnoj kemijski definiranoj podlozi (B) uz dodatak različitih koncentracija 2-furaldehida.

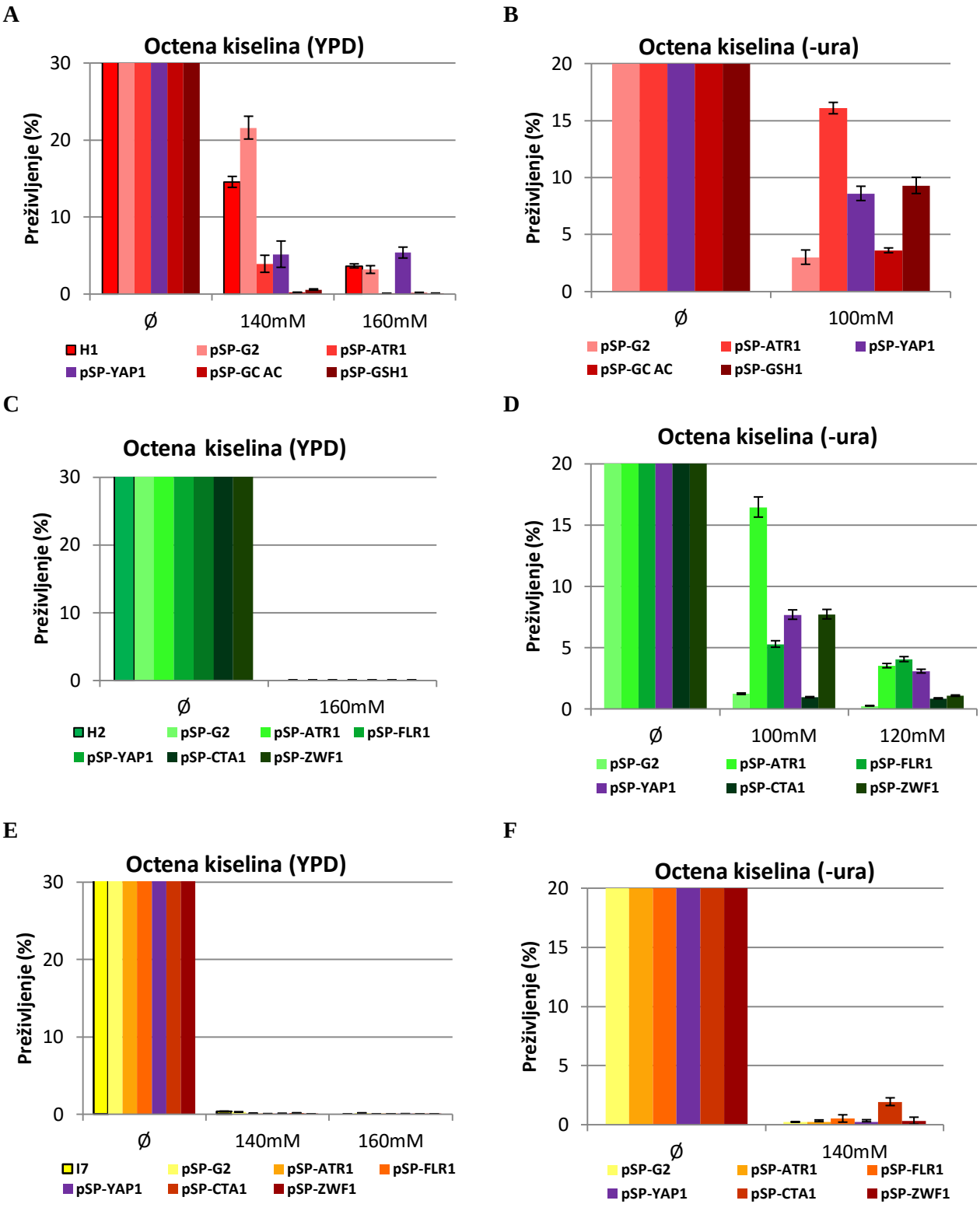
Najveće preživljenje na kompletnim kompleksnim i kemijski definiranim podlogama s 10 mM 2-furaldehidom (Slika 17) imao je heterozigotni dipoloidni soj H1. Ovi rezultati upućuju na to da bi se ovaj soj mogao koristiti prilikom proizvodnje bioetanola na lignocelulozni sirovinama, ali bi još trebalo detaljno analizirati njegov rast u tekućim podlogama s 2-furaldehidom.

4.2.2. Utjecaj pojačane ekspresije gena na rezistenciju sojeva na krutim podlogama

Glavni cilj ovog rada bio je utvrditi da li pojačana ekspresija određenih kvaščevih gena utječe pozitivno na povećanje rezistencije sojeva na najčešće inhibitore rasta i fermentacije koji nastaju hidrolizom lignocelulozni sirovina. Prilikom provedbe eksperimenata korišteni su transformanti heterozigotnih diploidnih sojeva H1, H2 i I7 koji sadrže plazmide: pSP-G2 (plazmidni vektor), pSP-ATR1, pSP-CTA1 i pSP-FLR1 (sadrže gene koji kodiraju za transmembranske pumpe) te pSP-YAP1 i pSP-ZWF1 (sadrže gene koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u odgovoru na oksidativni stres). U ovim eksperimentima korištene su kompletna kompleksna podloga (YPD) i selektivna kemijski definirana podloga koja ne sadrži uracil (-ura) na kojoj rastu samo stanice koje sadrže plazmid.

4.2.2.1. Utjecaj octene kiseline na rast transformiranih sojeva na krutim podlogama

Kako bi se usporedio utjecaj različitog sastava hranjivih podloga i rezistencije između sojeva na podlogama s različitim koncentracijama octene kiseline, rezultati su grupirani tako da su na slici 19 prikazane vrijednosti preživljenja pojedinog soja (H1, H2 i I7) i transformanata. Pokazano je da plazmidi pSP-ATR1 i pSP-YAP1 najviše pozitivno utječu na rezistenciju.



Slika 18. Postotak preživljenja transformiranih sojeva koji potječu od heterozigotnih diploida H1, H2 i I7 na kompletnoj kompleksnoj podlozi (A; C; E) i selektivnoj podlozi bez uracila (B; D; F) uz dodatak različitih koncentracija octene kiseline. Preživljenje svih sojeva na odgovarajućim podlogama bez dodatka inhibitora iznosi 100 %, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u preživljenju kultura.

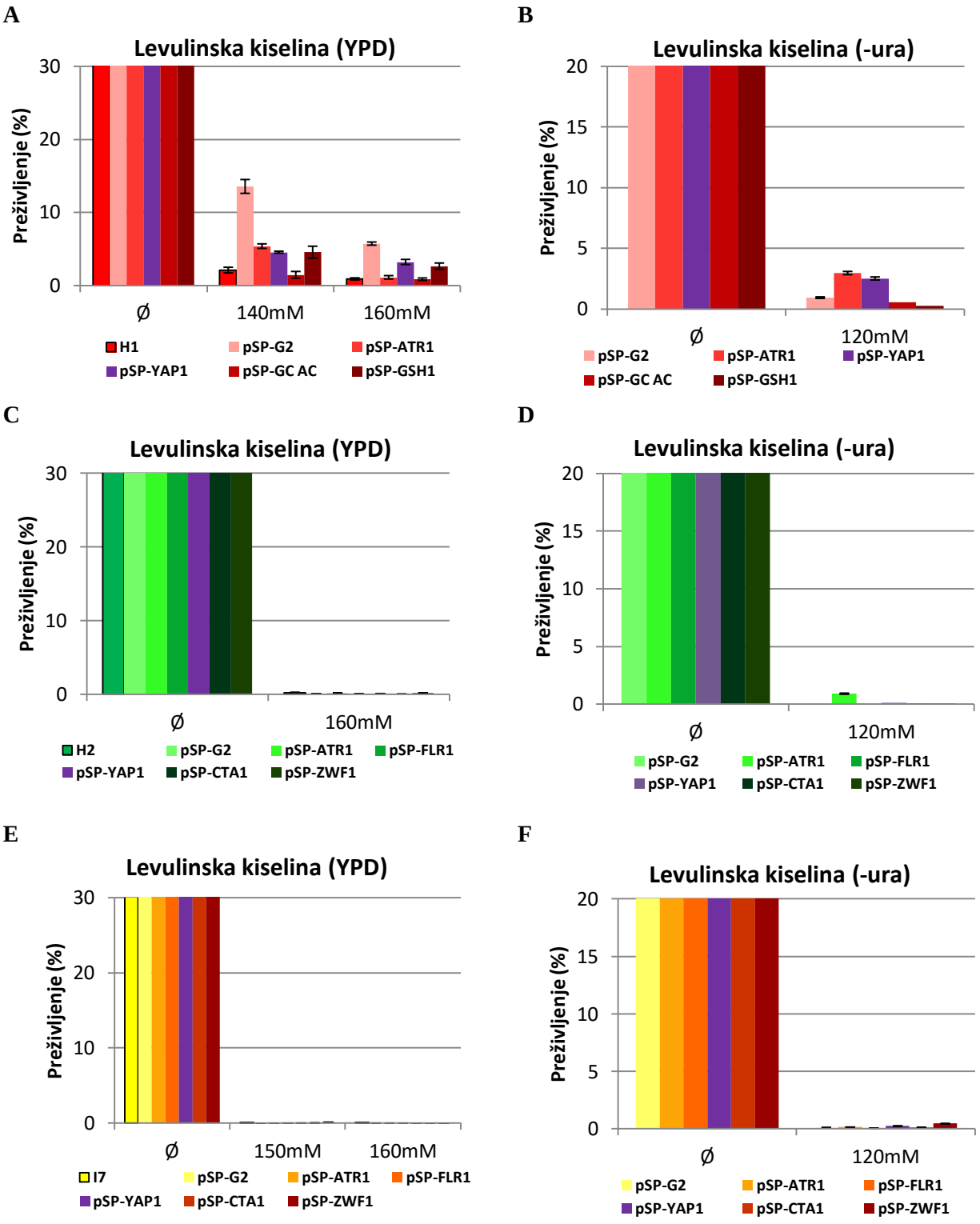
Najveća koncentracija octene kiseline pri kojoj je rastao soj H1 je 160 mM, a postotak preživljenja bio je znatno veći u usporedbi s ostalim netransformiranim sojevima. Najbolje preživljenje imao je transformant H1-YAP (pSP-YAP1, 6 %), što je očekivano budući da *YAP1* kodira za transkripcijski faktor koji sudjeluje u odgovoru na oksidativni stres (Stephen, 1995). Na podlozi bez uracila, u koju je dodana 100 mM octena kiselina najveće preživljenje imao je soj transformiran plazmidom pSP-ATR1 (15%).

Na krutoj kompletnoj kompleksnoj podlozi sa 170 mM octenom kiselinom, vrijednosti preživljenja transformanata soja H2 jako su niske (Slika 18C). Sve vrijednosti preživljenja su brojčano bliske i niti jedan transformant nije pokazao značajno veću rezistenciju na octenu kiselinu kao što je to bilo prilikom uzgoja transformanta soja H1. Na selektivnoj podlozi bez uracila s octenom kiselinom (Slika 18D) najveće vrijednosti preživljenja pri 120 mM imali su transformanti H2-ATR, H2-FLR i H2-YAP (4 %).

Niti jedan transformant soja I7 nije pokazao značajno povećanje rezistencije na octenu kiselinu pri koncentracijama 140 i 160 mM u kompleksnoj kompletnoj podlozi (Slika 18E). Na selektivnoj podlozi koja ne sadrži uracil uz dodatak 140 mM octene kiseline, najviše preživljenje od svega 2 % imao je soj I7-CTA (koji ima pojačanu ekspresiju gena *CTA1* koji kodira za protein transmembranske pumpe). Na kompletnoj i selektivnoj podlozi pri visokim koncentracijama octene kiseline 140 i 160 mM ne razlikuju se značajno postotci preživljenja transformanata.

4.2.2.2. Utjecaj levulinske kiseline na rast transformiranih sojeva na krutim podlogama

Kvasac može kao izvor ugljika koristiti slabe kiseline koje pri nižim koncentracijama pozitivno utječu na prinos etanola (Jönsson i sur., 2013), dok pri višim koncentracijama inhibiraju rast proizvodnog mikroorganizama, jer difundiraju kroz staničnu membranu i ulaze u citosol čime snižavaju pH citosola (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000). Kako bi se usporedio utjecaj različitog sastava hranjivih podloga i rezistencije između sojeva, rezultati su grupirani tako da su na slici 19 prikazane vrijednosti preživljenja pojedinog soja (H1, H2 i I7) i njihovih transformanata na podlogama s različitim koncentracijama levulinske kiseline.



Slika 19. Postotak preživljenja transformiranih sojeva koji potječu od heterozigotnih diploida H1, H2 i I7 na kompletnoj kompleksnoj podlozi (A; C; E) i selektivnoj podlozi bez uracila (B, D; F) uz dodatak različitih koncentracija levulinske kiseline. Preživljenje svih sojeva na odgovarajućim podlogama bez dodatka inhibitora iznosi 100 %, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u preživljenju u kulturama na podlogama.

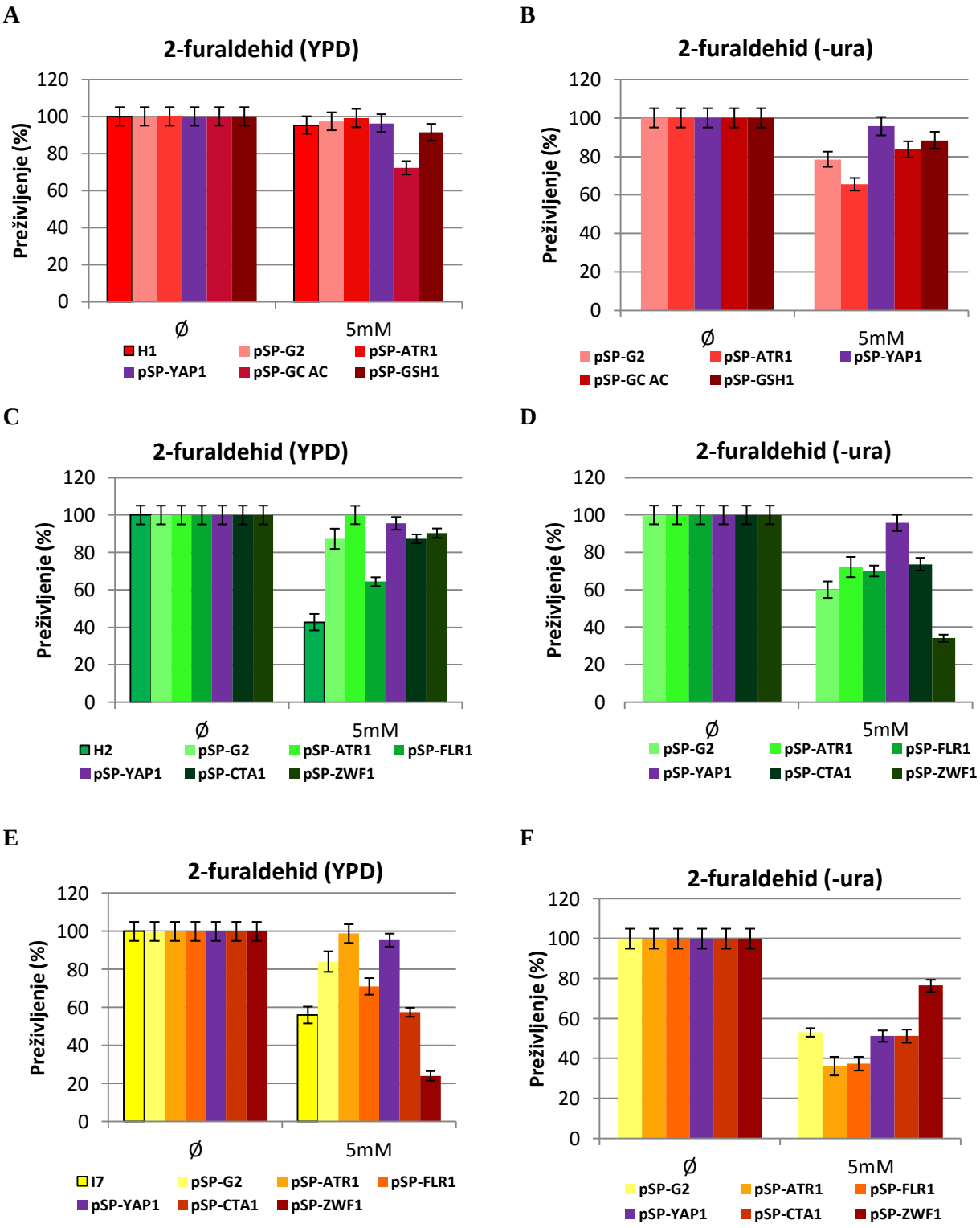
Na slici 19 vidi se da je preživljenje stanica pri uzgoju na krutoj kompletnoj kompleksnoj podlozi koja sadrži levulinsku kiselinu jako nisko te su najveće vrijednosti preživljenja zabilježene pri uzgoju transformanata soja H1. Najveće preživljenje na kompletnoj kompleksnoj podlozi s dodatkom 140 mM levulinske kiseline (14 %) imao je soj H1-pSP-G2 koji je sadržavao samo plazmidni vektor (pSP-G2). Pri uzgoju na selektivnoj hranjivoj podlozi s dodatkom 120 mM levulinske kiseline, vrijednosti preživljenja bile su niske: H1-ATR (pSP-ATR1, 3 %) i H1-YAP (pSP-YAP1; 2,5 %).

Transformanti soja H2 imali su najniže vrijednosti preživljenja na kompletnoj kompleksnoj podlozi usporedbi s ostalim sojevima (niže od 0,06%). Na selektivnoj podlozi maksimalna koncentracija levulinske kiseline na kojoj su rasli sojevi bila je 140 mM, što je manja koncentracija nego na kompletnoj podlozi te je najveću vrijednost preživljenja imao H2-ATR (pSP-ATR1; 0,9 %).

Niske vrijednosti preživljenja na kompletnoj kompleksnoj podlozi koja sadrži levulinsku kiselinu, zabilježene su i prilikom uzgoja transformanata soja I7 koji su rasli do koncentracije 160 mM. Najveći postotak preživljenja detektiran je na selektivnoj podlozi uz dodatak 120mM levulinske kiseline, prilikom uzgoja transformiranog soja I7-ZWF (sadrži gen *ZWF1* koji kodira za proteine koji sudjeluju prilikom oksidativnog stresa; 0,45%).

4.2.2.3. Utjecaj 2-furaldehida na rast transformiranih sojeva na krutim podlogama

Toksično djelovanje 2-furaldehida ovisi o koncentraciji samog inhibitora, gustoći stanica u kulturi i uvjetima uzgoja (Palmqvist i sur., 1999b) te utječe na enzime glikolize i citratnog ciklusa uključene u energetski metabolizam (Soccol i sur., 2011). Kako bi se usporedio utjecaj različitog sastava hranjivih podloga i rezistencije između sojeva, rezultati su grupirani tako da su na slici 20 prikazane vrijednosti preživljenja pojedinog soja (H1, H2 i I7) i njihovih transformanata na podlogama s različitim koncentracijama 2-furaldehida.



Slika 20. Postotak preživljenja transformiranih sojeva koji potječu od heterozigotnih diploida H1, H2 i I7 na kompletnoj kompleksnoj podlozi (A; C; E) i selektivnoj podlozi bez uracila (B, D; F) uz dodatak različitih koncentracija 2-furaldehida. Preživljenje svih sojeva na odgovarajućim podlogama bez dodatka inhibitora iznosi 100 %, ali je skala na osi X izmijenjena kako bi se vidjele razlike u preživljenju kultura.

Vrijednosti preživljenja na kompletnim kompleksnim i selektivnim podlogama s nižim koncentracijama 2-furaldehida bile su znatno veće, nego pri dodatku octene ili levulinske kiseline. Najveće preživljenje na kompletnoj kompleksnoj podlozi s 5 mM 2-furaldehidom ima transformant H1-ATR (pSP-ATR1, slika 20A) koji ima pojačanu ekspresiju gena *ATR1* (kodira za transmembransku pumpu, Alriksson i sur., 2010). Na selektivnoj podlozi dobiveni su slični rezultati, te je najveće preživljenje imao transformant H1-YAP (pSP-YAP1).

Iz slike 20C vidljivo je da je pri dodatku 5mM 2-furaldehida u kompletnu kompleksnu podlogu preživljenje pojedinih transformanata koji potiču od soja H2 veće od 95% (H2-ATR i H2-YAP). Također, netransformirani soj raste slabije i preživljenje je dvostruko niže (42 %) nego upotrebom transformiranih sojeva. Na selektivnoj podlozi uz dodatak 5 mM 2-furaldehida (Slika 20D) transformant H2-YAP (pSP-YAP1) imao je najveće preživljenje (oko 95%) što sugerira da ovaj soj raste jednako u prisutnosti 5 mM 2-furaldehida neovisno o kojoj se podlozi radi. Unos gena *ATR1* i *YAP1* je i u ovom slučaju djelovao pozitivno, odnosno doprinio rezistenciji soja na 2-furaldehid.

Pri nižoj koncentraciji 2-furaldehida (5 mM) na kompletnoj kompleksnoj hranjivoj podlozi (Slika 20E) najveći postotak preživljenja imao je soj I7-ATR (98%) dok je upotrebom netransformiranog soja preživljenje bilo niže (56 %), a na selektivnoj podlozi s 2-furaldehidom najveće preživljenje je imao I7-ZWF (76 %). Almeida i suradnici (2007) navode u svom radu da ekspresija gena *ZWF1* koji kodira za glukoza-6-fosfat dehidrogenazu omogućuje dobar rast na koncentracijama do 50 mM furfurala, iako je mehanizam koji stoji iza tolerancije na furfural još nejasan, pretpostavlja se da je vjerojatno povezan sa povećanom koncentracijom NADPH u stanici. Osim toga, povećanje koncentracije enzima metaboličkog puta pentoza fosfata može imati pozitivan zaštitni utjecaj na oštećenja uzrokovana furfuralom.

4.3. Usporedba rezistencije diploidnih sojeva na inhibitore rasta u tekućim i krutim medijima

Nakon provedenih eksperimenata opisanih u poglavljima 4.1. i 4.2. uspoređene su koncentracije inhibitora rasta koji uzrokuju pad prirasta biomase to jest preživljenja ispod 50 % netransformiranih sojeva (Tablica 2).

Tablica 2. Koncentracije inhibitora rasta koje urokuju značajan pad prirasta biomase ili preživljenja netransformiranih sojeva.

Soj	Octena kiselina		Levulinska kiselina		2-furaldehid	
	Kruta podloga	Tekuća podloga	Kruta podloga	Tekuća podloga	Kruta podloga	Tekuća podloga
K1	100	120	100	120	10	20
K2	100	120	100	120	10	20
H1	100	120	100	120	10	20
H2	100	120	100	120	5	20
I7	100	120	100	120	10	20

Iz tablice 2 vidljivo je da netransformirani sojevi rastu pri većim koncentracijama inhibitora u tekućoj podlozi nego na krutim podlogama, a sposobnost flokulacije sojeva uzgajanih u podlozi može biti jedan od mehanizama uključenih u toleranciju visokih koncentracija inhibitora rasta i krajnjeg produkta etanola te u stanicama kvasca (Soares, 2010).

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da unos određenih gena u stanice kvasca može imati pozitivan utjecaj na rezistenciju sojeva na inhibitore rasta hidrolizata lignoceluloznih sirovina. U tablici 3 navedene su maksimalne koncentracije inhibitora rasta koje omogućuju rast ispitivanih transformiranih sojeva na krutim hranjivim podlogama (preživljenje ispod 2 %).

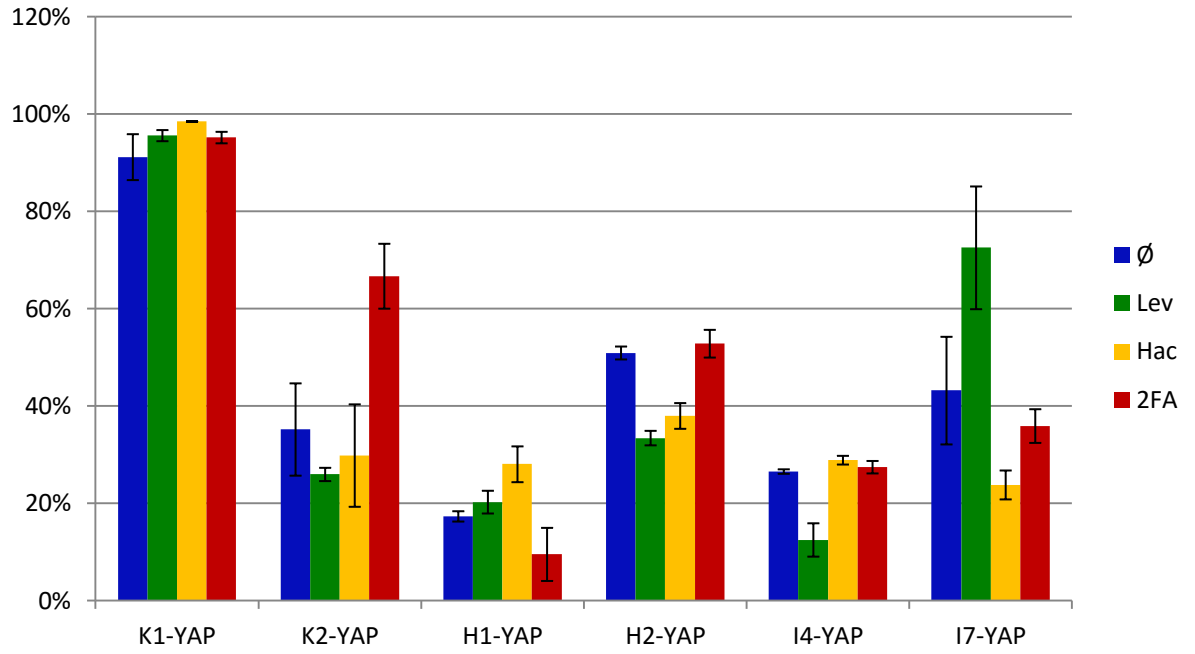
Tablica 3. Maksimalne koncentracije inhibitora rasta koje omogućuju rast ispitivanih transformiranih sojeva na krutim hranjivim podlogama.

Octena kiselina		Levulinska kiselina		2-furaldehid	
YPD	-ura	YPD	-ura	YPD	-ura
H1-YAP H2-YAP (160mM)	I7-ATR (160mM)	H2-YAP H2-ATR (190mM)	H2-YAP (140mM)	H1-ATR I7-ATR (10mM)	H1-ATR, H2-YAP I7-ZWF (10mM)
I7-YAP (170mM)			H1-ATR (160mM)		

Za nastavak ovih eksperimenata, potrebno je napraviti analizu prirasta biomase najrezistentnijih transformiranih sojeva u tekućem mediju. Zanimljivo bi svakako bilo i klonirati gene *ATR1* i *YAP1,* koji su dali najbolje rezultate u provedenim eksperimentima, u jedan plazmidni vektor te transformirati ispitivane sojeve kako bi se utvrdilo postoji li sinergistički efekt na povećanje rezistencije.

4.4. Stabilnost replikativnih plazmida u neselektivnim uvjetima

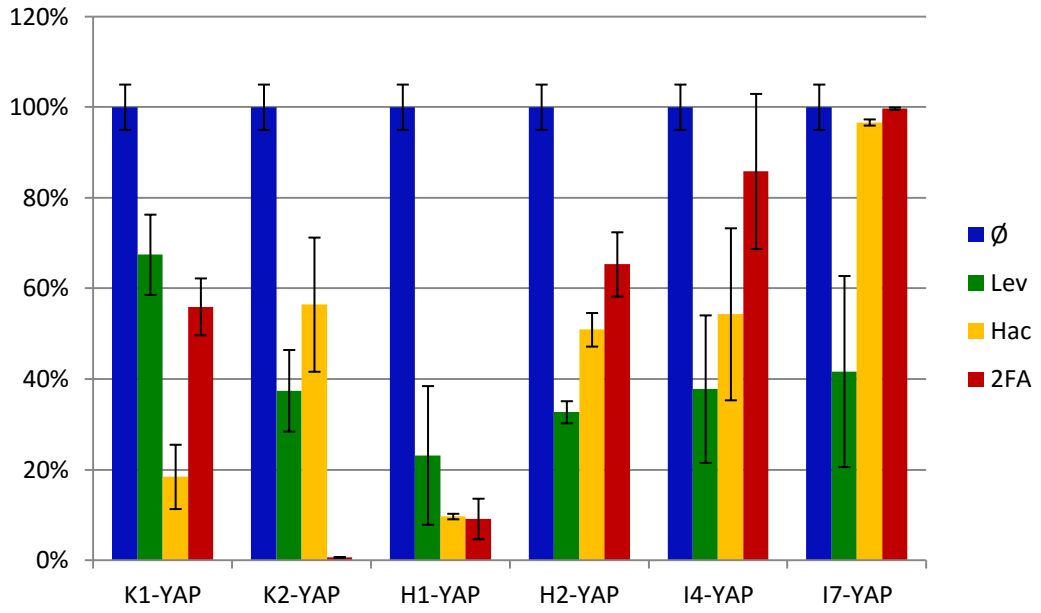
Replikativni plazmidi korišteni u ovom radu sadrže uz odgovarajući kvaščev gen, čija bi pojačana ekspresija mogla povećati rezistenciju transformiranog soja na neki od inhibitora rasta, i gen *URA3* koji služi kao selektivni biljeg. Pri uzgoju u selektivnim uvjetima, to jest na podlozi koja ne sadrži uracil, gen *URA3* omogućuje rast samo transformiranih stanica koje sadrže plazmid. Kako je kemijski sastav lignoceluloznih hidrolizata složen i varira ovisno o polaznoj sirovini, u ovome radu ispitana je stabilnost replikativnih plazmida pri uzgoju u neselektivnim uvjetima, to jest u podlozi koja sadrži uracil. Određivanje stabilnosti plazmida opisano je u podglavlju 3.2.4., a rezultati su prikazani na slikama 21. i 22. Dodatno, ispitano je da li se prisutnost inhibitora rasta (octena, levulinska kiselina i 2-furaldehid) u hranjivoj podlozi može koristiti kao jedini selektivni pritisak kako bi se osigurala stabilnost replikativnog plazmida pSP-YAP1. Za ove eksperimente odabran je plazmid pSP-YAP1 upravo zbog pozitivnog utjecaja pojačane ekspresija gena *YAP1* na rezistenciju sojeva na inhibitore rasta.



Slika 21. Stabilnost plazmida pSP-YAP1 u diploidnim sojevima u neselektivnim uvjetima. Transfomanti su uzgajani u kompletnoj hranjivoj podlozi bez dodatka inhibitora (plavo) ili uz dodatak 100 mM levulinske (zeleno) i octene kiseline (žuto) te 20 mM 2-furaldehida (crveno).

Najmanji postotak gubitka plazmida zabilježen je u soju K1-YAP neovisno o tome da li je soj uzgajan u kompletnoj kompleksnoj podlozi ili u selektivnoj podlozi uz dodatak inhibitora rasta. Kod svih ostalih transformanata zabilježena je relativno niska stabilnost plazmida pSP-YAP1 nakon uzgoja u kompletnoj podlozi, koja se kretala od 18 % (soj H1-YAP1) do 50 % (soj H2-YAP1). Dodatak octene i levulinske kiseline te 2-furaldehida, za većinu ispitivanih sojeva, nije djelovao kao dovoljan selektivni pritisak i posljedično nije pozitivno utjecao na stabilnost plazmida kod ispitivanih transformanata. Iznimno, uočena je povećana stabilnost plazmida u soju K2-YAP nakon dodatka 2-furaldehida i u soju I7-YAP1 nakon dodatka levulinske kiseline.

U ovom je eksperimentalnom sustavu dodatno određeno i preživljenje odgovarajućih sojeva, nakon uzgoja u podlozi s 100 mM octenom ili levulinskom kiselinom i 20 mM furaldehidom, nacjepljivanjem na krute hranjive podloge, a postotci preživljenja prikazani su na slici 22.

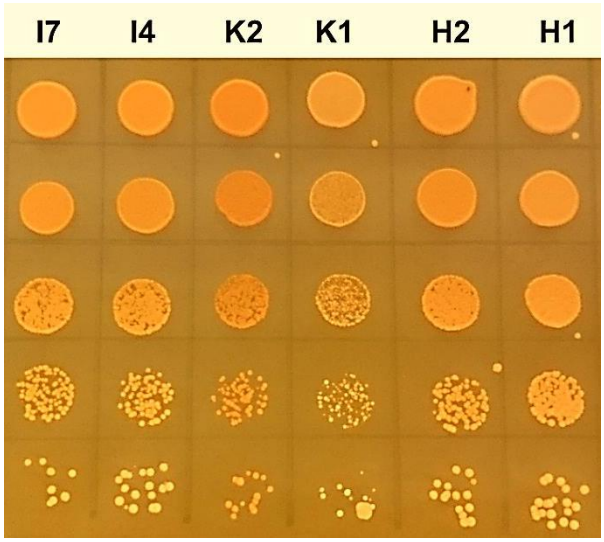


Slika 22. Preživljenje transformiranih sojeva plazmidom pSP-YAP1 bez dodatka inhibitora (plavo) i pri koncentraciji od 100 mM levulinske (zeleno) i octene kiseline (žuto) te 20 mM 2-furaldehida (crveno).

Rezultati preživljenja (Slika 22) za soj K2-YAP u skladu su s rezultatima navedenim u poglavljima 4.1. i 4.2. jer ovaj soj izrazito slabo raste u prisustvu 2-furaldehida. Osim toga, i u ovom je eksperimentalnom sustavu potvrđen jači inhibitorni efekt octene kiseline, u usporedbi s levulinskom. Zanimljivo je da je najveći postotak preživljenja u prisustvu inhibitora imao soj I7-YAP te se može zaključiti da je transformacija soja I7 sa plazmidom pSP-YAP pozitivno djelovala na otpornost soja i na 2-furaldehid i na octenu kiselinu.

4.5. Preliminarni test fermentacijske sposobnosti sojeva

Za proizvodnju etanola na složenom supstratu kao što je hidrolizat lignoceluloznih sirovina bitno je da proizvodni soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dobro podnosi visoke koncentracije inhibitora rasta, ali i da proizvodi i tolerira visoke koncentracije etanola. Kako bi se procijenila fermentacijska sposobnost sojeva, u ovome radu korištene su krute kemijski definirane podloge koje sadrže indikator bromtimol-plavo (BTP, poglavlje 3.1.3.2) Naime, tijekom rasta sojeva na podlozi s indikatorom BTP prati se promjena boje kolonija, a sojevi koji se koriste u vinskoj industriji, i ujedno proizvode i podnose više koncentracije etanola, mijenjanju boju u tamno narančastu do crvenu (Peet, 2008).



Slika 23. Procjena ferementative sposobnosti ispitivanih sojeva na podlozi BTP. Nacijepljena su decimalana razrijeđenja ishodnih, netransfomiranih homozigotnih (K1 i K2) i heterozogotnih (H1, H2, I4 i I7) diploidnih sojeva.

Na slici 23 uočljivo je da tamniju nijansu kolonija, što upućuje na niži pH, te proizvodnju veće količine CO_2 i etanola, ima kontrolni diploidni soj K2 što je i za očekivati jer je ovaj homozigotni diploidni soj nastao križanjem sojeva izoliranih iz vina. Ostali testirani homozigotni i heterozigotni diploidni sojevi, imaju malo svjetlije obojenje od kontrolnog diploidnog soja K2 i potrebno je preciznije testirati njihovu fermentativnu sposobnost, na primjer testnom fermentacijom u vreljnjačama. Dodatno testiranje fermentacijske sposobnosti najbitnije je za soj H2 koji se pokazao najotpornijim na inhibitore rasta pri uzgoju u tekućem mediju i soj H1 koji je imao najbolju rezistenciju na inhibitore rasta pri uzgoju na krutim hranjivim podlogama. Takvi rezultati su u skladu s već prije provedenim eksperimentima (Pranklin, 2015), gdje se pokazalo da soj H1 najslabije flokulira i time je osjetljiviji na inhibitore prilikom uzgoja u tekućem mediju nego što je to soj H2 koji jako dobro flokulira.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti slijedeće:

1. Pojačana ekspresija gena *ATR1* i *YAP1* povećava rezistenciju sojeva na inhibitore rasta prisutne u lignocelulozni hidrolizatima: octenu i levulinsku kiselinu te 2-furaldehid.

2. Prisustvo inhibitora rasta u hranjivoj podlozi ne može se koristiti kao selektivni pritisak koji bi osigurao stabilno nasljeđivanje replikativnog plazmida.

6. LITERATURA

Adeboye, P.T., Bettiga, M., Olsson, L. (2014) The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distunct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolisates. *AMB Express* **4**, 46-55.

Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **498**, 98-103.

Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M. (2000) Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **25(4)**, 184-192.

McMillan, J.D. (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. U: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production (Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., ur.). American Chemical Society, Washington DC, str. 292–324.

Almeida, J.R.M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Gorsich, S., Lidén, G. (2009) Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biot.* **82**, 625-638.

Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grausland, M.F. (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* **82**, 340-349.

Alriksson, B., Sárvári Horváth, I., Jönsson, L.J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multridrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochem*. **45**, 264-271.

Aramabašić K. (2015) Kloniranje gena *ATR1*, *FLR1*, *GSH1* i *YAP1* iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 u bakteriji *Escherichia coli*. Završni rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Aranda, A., Querol, A., del Olmo, M. (2002) Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of *HSP* genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch. Microbiol.* **177**, 304–312.

Ask, M., Mapelli, V., Höck, H., Olsson, L., Bettiga, M. (2013) Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocelullosic materials. *Microb. Cell. Fact.* **12**, 87-96.

Burhans, W.C., Weinberer, M. (2007) DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7545-7556.

Burtner, C.R., Murakami, C.J., Kennedy. B.K., Kaeberlein, M. (2009) A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle* **8**, 1256-1270.

Chemler, J.A., Yan, Y., Koffas, M.A.G. (2006) Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **5**, 1-9.

Cordona C. A., Sanchez O. J. (2007) Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities, *Bioresource Technol.* **98(12)**, 2415–2457.

Datar, R., Huang, J., Maness, P.-C., Mohagheghi, A., Czernik, S., Chornet, E. (2007) Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *Int. J. Hydrogen Energy* **32**, 932-939.

Dawson, L., Boopathy, R. (2007) Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. *Bioresour. Technol.* **98**, 1695-1699.

Demirbas, A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. *Energ. Source.* **27,** 327–337.

Ding, J., Huang., X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K. (2009) Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 253–263.

Donalies, U.E., Nguyen, H.T., Stahl, U., Nevoigt, E. (2008) Improvement of Saccharomyces yeast strains used in brewing, wine, making and baking. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **111**, 67-98.

Dunlop, M.J. (2011) Engineering microbes for tolerance to next-generation biofuels. *Biotechnol. Biofuels* **4**, 32-40.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567.

Gorisch, S.W., Dien, B.S., Nichols, N.N., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Skory, C.D. (2005) Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 339-349.

Grba, S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Plejada d.o.o, Zagreb.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonesca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 937–953.

Hastings, P.J., McGill, C., Shafer B., Strathern, J.N., (1993) *Ends-in* versus *ends-out* recombination in yeast. *Genetics* **135**, 973-980.

Heer, D., Sauer, U. (2008) Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microb. Biotechnol.* **1**, 497-506.

Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisi*ae. *Microbiol. Rev.* **52**, 536-553.

Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R. (1978) Transformation of yeast. *P Natl. Acad. Sci. U S A* **75**, 1929-1933.

Hong, M.-E., Lee, K.-S., Yu, B.J., Sung, Y.-J., Park., S.M., Koo, H.M., Kweon, D.-H., Park, J.C., Jin, Y.-S. (2010) Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *J. Biotechnol*. **149**, 52-59.

Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**, 25−38.

Jäger, G., Büchs, J. (2012) Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *J. Biotechnol.* **7**, 1122-1136.

Jalšić, L. (2016) Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* plazmidom koji sadrži gen *YAP1* odgovoran za rezistenciju na inhibitore rasta. Završni rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Janušić, V., Ćurić, D., Krička, T., Voća, N., Matin., A. (2008) Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Agriculture* **14**, 53-58.

Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. (2013) Bioconversion of lignocelullose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 16-25.

Kanazawa, S., Driscoll, M., Struhl, K. (1988) *ATR1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol. Cell. Biol.* **8(2)**, 664-673.

Khurana, V., Lindquist, S. (2010) Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 436-449.

Klinke, H. B., Thomsen, A. B., Ahring, B. K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 10-26.

Kodali, B., Pogaku, R. (2006) Pretreatman studies of ricebran for the effective production of cellulase. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **5(2)**, 1253-1264.

Kostriken, R., Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Heffron, F. (1983) A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**, 167-174.

Lee, J., Gordon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 16040-16046

Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaeberlein, M., Kennedy, B. (2012) Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Metab.* **16**, 18-31.

Lynd, Lee R., Weimer, Paul J., Zyl Willem H, Pretorious, Isak S., (2002) Microbal cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66(3)** 507-577.

Madeo, F., Engelhardt, S., (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr. Genet.* **41**, 208-216.

Marić, V. (2000) Biotehnologija i sirovine. Stručna i poslovna knjiga d.o.o. Zagreb.

Menacho-Marquez, M., Murguia, J.R. (2007) Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin. Transl. Oncol.* **9**, 221-228.

Menon, V., Rao, M. (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Ener.g Combust.* **38**, 522-550.

Mirisola, M.G., Longo, V.D. (2012) Acetic acid and acidification accelerate chronological and replicative aging in yeast. *Cell Cycle* **11**, 3532-3533.

Morita, Y., Nakamori, S., Takagi, H. (2003) L-Proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding γ-glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 212-219.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource. Technol.* **96**, 673-686.

Nigam, P.S., Singh, A. (2011) Progress in energy and combustion science. *Prog. Energ. Combust.* **37**, 52-68.

Novak, S., Marić, V. (1995) Transport i regulacija metabolizma ugljikohidrata kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: I. Glukoza, fruktoza i manoza. *Kemija u industriji* **44**, 341-353.

Novak, S., Zechner-Krpan, V., Raspor, P., Marić, V. (2000) Transport ugljikohidrata i regulacija metabolizma ugljikohidrata u kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: II. Galaktoza. *Kemija u industriji* **49**, 433-441.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *P. Natl. Acad. Sci. U S A* **78**, 6354-6358.

Owsianowski, E., Walter, D., Fahrenkrog, B. (2008) Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 1303-1310.

Palmqvist, E., Almeida, J.S., Hahn- Hägerdal, B. (1999b) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 447-454.

Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N.Q., Hahn- Hägerdal, B. (1999a) Main interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 46-55.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocelullosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Biores. Technol.* **74**, 25-33.

Paques, F., Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349-404.

Parawira, W., Tekere, M. (2011) Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31(1)**, 20-31.

Patil, V., Tran, K.Q., Giselrød, H.R. (2008) Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *Int. J. Mol. Sci.* **9(7)**, 1188-1195.

Peet. K.C. (2008) Optimizing Microbial Ethanol: Carbon source influence and detrimental genes for ethanol production. Završni rad, Worchester Polytechnic Institute.

Pranklin, A. (2015) Konstrukcija i određivanje osjetljivosti hibridnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na inhibitore rasta. Diplomski rad. Zagreb, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211.

Saccharomyces Genome Database (2016) <http://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>. Pristupljeno 30. ožujka 2016.

Sambrook J., Russell D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* **99**, 5270-5295.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2011) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energ.* **37**, 19-27.

Schiestl, R.H., Petes, T.D. (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7585-7589.

Schurz, J. (1978) Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein Symposium Proceedings (Ghose, T.K., ur.), IIT, New Delhi, str. 37.

Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3-41.

Soares, E.V: (2010) Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Appl. Microbiol*. **110**, 1-18.

Soccol, C.R., Faraco, V., Karp, S., Vandenberghe, L.P.S., Thomaz-Soccol, V., Woiciechowski, A., Pandey, A. (2011) Lignocelullosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. U: Biofuels, (Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C, Dussap, C.-G.,Gnansounou, E., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 101-122.

Stephen, D.W.S., Rivers, S.L., Jamieson, D.J. (1995) The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **16(3)**, 415-423.

Sun Y., Cheng J., (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production, *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.

Symington, L.S., Gautier, J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**, 247–271.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35.

Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials, *BioResources* **2(4)**, 707-738.

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technol.* **101(13)**, 4744–4753.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 197-205.

Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R., Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.

Walker, G.M. (2009) Yeasts. U: Desk encyclopedia of microbiology, 2. izd., (Schaechter, M., ured.) Elsevier Inc., Dundee, str. 1174-1189.

Wyman, C.E. (2001) Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology. *Appl. Bioch. Biotech.* **91**, 5-21.