

---

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Ana Bajić**

**TRANSFORMACIJA I KARAKTERIZACIJA KVASCA**  
*Dekkera bruxellensis*

**Zagreb, 2009.**

---

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod vodstvom doc. dr. Ivana-Krešimira Sveteca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008./2009.

---

**POPIS KRATICA**

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina ("deoxyribonucleic acid")

**5-FOA** – 5-fluoroorotična kiselina ("5-fluoroorotic acid")

**PCR** – lančana reakcija polimerazom ("polymerase chain reaction")

**RAPD** – nasumično umnažanje polimorfne DNA ("random amplification of polymorphic DNA")

**SDS** – natrij dodecil sulfat ("sodium dodecyl sulfate")

**ORF** – otvoreni okvir čitanja ("open reading frame")

**PFGE** – elektroforeza u promjenjivom električnom polju ("pulsed field gel electrophoresis")

**can<sup>R</sup>** - mutanti rezistentni na kanavanin ("canavanine resistance")

**EDTA** – etilendiamintetraoctena kiselina ("ethylenediaminetetraacetic acid")

**PEG** – polietilenglikol ("polyethylen glycol")

**UV** – ultraljubičasto ("ultraviolet")

**pb** – parovi baza

**Mb** – megabaza

---

---

**SADRŽAJ**

1. UVOD .....	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	3
3. MATERIJAL I METODE .....	4
3.1. MATERIJAL .....	4
3.1.1. Mikroorganizmi .....	4
3.1.1.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i> .....	4
3.1.1.3. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
3.1.1.4. Bakteriofag .....	5
3.1.2. Plazmid pDMS+ .....	5
3.1.3. Oligonukleotidi .....	5
3.1.4. Hranjive podloge i otopine .....	6
3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	6
3.1.4.2. Podloge za uzgoj kvasaca <i>Dekkera bruxellensis</i> i <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA .....	9
3.1.4.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica .....	10
3.1.4.5. Otopine za gel-elektroforezu .....	10
3.1.4.6. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southern-u .....	11
3.1.5. Kemikalije i enzimi .....	12
3.2. METODE .....	13
3.2.1. Određivanje utjecaja sorbitola na rast kvasca i aktivnost zimolijaze .....	13
3.2.2. Istraživanje utjecaja SDS-a .....	13
3.2.3. Procjena ploediteta kvasca .....	14
3.2.4. Izrada krivulje preživljenja nakon djelovanja UV-svjetla .....	14
3.2.5. Transformacija kvasca <i>Dekkera bruxellensis</i> .....	14
3.2.5.1. Transformacija pomoću litijevog acetata .....	14
3.2.5.2. Transformacija protoplastiranjem .....	15
3.2.6. Gel elektroforeza .....	16
3.2.7. Hibridizacija DNA metodom po Southern-u .....	16
3.2.8. Izolacija i pročišćavanje DNA .....	16
3.2.8.2. Ekstrakcija DNA fenolom i kloroformom .....	16
3.2.8.3. Izolacija dvolančanog plazmida .....	17
3.2.8.4. Izolacija jednolančanog plazmida .....	17
3.2.8.5. Izolacija kvašćeve DNA .....	18
3.2.9. Tretiranje DNA restrikcijskim enzimima .....	19
3.2.10. Lančana reakcija polimerazom i metoda RAPD .....	19
4. REZULTATI .....	21
4.1. KARAKTERIZACIJA KVASCA <i>Dekkera bruxellensis</i> .....	21
4.1.1. Rast na laboratorijskim hranjivim podlogama .....	21
4.1.2. Utjecaj sorbitola i SDS-a na preživljenje kvasca <i>D. bruxellensis</i> .....	23
4.1.3. Procjena ploediteta kvasca <i>D. bruxellensis</i> .....	24
4.1.4. Izolacija mutanata s inaktiviranim genom <i>URA3</i> .....	25
4.1.5. Utjecaj UV-svjetla na rast kvasca <i>D. bruxellensis</i> i <i>S. cerevisiae</i> .....	26
4.1.6. Usporedna analiza kvasca <i>S. cerevisiae</i> i <i>D. bruxellensis</i> metodom RAPD .....	28
4.2. RAZVOJ METODE ZA TRANSFORMACIJU KVASCA <i>D. bruxellensis</i> .....	29
4.2.1. Transformacija protoplastiranjem .....	29
4.2.1.1. Uspješnost protoplastiranja .....	29
4.2.1.2. Utjecaj koncentracije sorbitola na preživljenje stanica kvasca i aktivnost zimolijaze .....	30
4.2.2. Transformacija pomoću litijevog acetata .....	32

---

---

4.3. PRIPREMA DNA ZA TRANSFORMACIJU .....	33
5. RASPRAVA .....	36
6. ZAKLJUČCI.....	40
7. ZAHVALE.....	41
8. POPIS LITERATURE .....	42
9. SAŽETAK .....	44
10. SUMMARY .....	45

---

---

## 1. UVOD

Kvasac *Dekkera bruxellensis* (također poznat i kao *Brettanomyces bruxellensis*) glavni je uzročnik kvarenja vina širom svijeta jer sintetizira hlapive fenolne spojeve (4-etilfenol i 4-etilgvajakol) koji vinu daju neugodnu aromu. Kvasac *D. bruxellensis* može preživjeti na zidovima vinarija, na unutrašnjim površinama preša i fermentacijskih posuda te u drvu bačvi, a sve su to mjesta sa kojih može kontaminirati mošt, ali i vino tijekom odležavanja (Fugelsang, 1997). Međutim, osim što uzrokuje značajne ekonomske gubitke u proizvodnji vina, ovaj kvasac prepoznat je i kao potencijalni industrijski mikroorganizam koji bi se mogao koristiti u proizvodnji bioetanolu i octene kiseline (Freer i sur., 2003). Upravo iz ovih razloga kvasac *D. bruxellensis* sve češće je predmet znanstvenih istraživanja koja su uglavnom usmjerena prema razumijevanju njegove fiziologije i razvoju brzih metoda za njegovu detekciju u vinu (Suarez i sur., 2007; Ibeas i sur., 1996; Egli i Henick-Kling, 2001; Dias i sur., 2003).

Poput kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kvasac *D. bruxellensis* fakultativni je aerob i tolerira visoke koncentracije etanola. Osim toga obje vrste mogu provoditi alkoholnu fermentaciju u aerobnim uvjetima, a mogu preživjeti i bez mitohondrija, ali se takve stanice znatno sporije dijele te daju male kolonije. Unatoč tome ove dvije vrste kvasca jako su evolucijski udaljene pa se smatra da su navedene karakteristike neovisno evoluirale pod utjecajem sličnih selektivnih pritisaka. Međutim, ove dvije vrste kvasca se i po mnogo čemu razlikuju. Tako se na primjer, stanice kvasca *S. cerevisiae* puno brže dijele i efikasnije koriste glukozu, a *D. bruxellensis* može asimilirati više alternativnih izvora ugljika (Conterno i sur., 2006). Ove karakteristike u skladu su s uobičajenim slijedom događaja koji je opažen tijekom fermentacije mošta kontaminiranog kvascem *D. bruxellensis*. Naime, kvasac *S. cerevisiae* dominira u prvim fazama fermentacije, a zatim ga zamjenjuje *D. bruxellensis*, osobito tijekom odležavanja vina, kada su koncentracije etanola visoke, a koncentracija neprevrelog šećera je znatno smanjena (Renouf i sur., 2006).

Unatoč velikom značaju, i kao kontaminant u vinu, i kao potencijalni industrijski mikroorganizam, kvasac *D. bruxellensis* vrlo je slabo genetički karakteriziran. Interesantan podatak je da ovaj kvasac ima nestabilan genom i promjenjivi kariotip te mu ukupna veličina genoma može varirati od 20 do 30 Mb. Osim toga, u tijeku je određivanje slijeda nukleotida cjelokupnog genoma soja CBS2499, čija veličina genoma je procijenjena na 19,4 Mb. Do sada je sekvencionirano oko 40 % genoma, a uz pretpostavku da ovaj dio genoma predstavlja reprezentativni uzorak, obzirom na gustoću gena, može se zaključiti da ovaj soj sadrži oko 7430 gena koji kodiraju za proteine, što je slično broju gena ostalih hemiascomiceta (Woolfit i sur., 2007).

---

U usporedbi sa srodnim kvascima, proteom kvasca *D. bruxellensis* obogaćen je transporterima uključenim u metabolizam dušika i lipida što također može odražavati njegovu prilagodbu na okoliš sa smanjenom količinom nutrienata. Interesantan je i podatak da kvasac *D. bruxellensis* sadrži gen koji kodira za adenil-deaminazu, jako sličan genu iz *Burkholderia cenocepacia*, te se pretpostavlja da je njegovo postojanje u kvascu *D. bruxellensis* rezultat horizontalnog prijenosa gena (Woolfit i sur., 2007).

---

---

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Obzirom na njegovu važnost, kvasac *Dekkera bruxellensis* nedovoljno je fiziološki i genetički karakteriziran. Naime, ovaj kvasac, kao kontaminant u vinu uzrokuje velike ekonomske štete u vinarskoj industriji, ali je istovremeno prepoznat i kao potencijalni industrijski organizam u proizvodnji bioetanola i octene kiseline. Osim toga, zahvaljujući interesantnim genetičkim karakteristikama, kao što su nestabilnost genoma, kvasac *D. bruxellensis* mogao bi postati i modelni organizam u znanstvenim istraživanjima.

Upravo zbog velike važnosti i nedovoljne istraženosti kvasca *D. bruxellensis*, opći cilj ovog rada je započeti detaljniju genetičku karakterizaciju ovog mikroorganizma. U sklopu toga, provest će se niz analiza u kojima će se svojstva dvaju sojeva kvasca *D. bruxellensis* usporediti sa svojstvima dva standardna laboratorijska soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Između ostalog pokušat će se procijeniti ploeditet sojeva kvasca *D. bruxellensis*, provest će se usporedna analiza osjetljivosti ovih kvasaca na ultraljubičasto zračenje i analiza genoma metodom RAPD.

Specifični cilj rada je razviti metodu za transformaciju, odnosno unošenje DNA u stanicu kvasca *D. bruxellensis* (soj CBS2499) koja uzrokuje promjenu genotipa i fenotipa transformirane stanice. Naime, pregledavanjem znanstvene literature utvrđeno je da ovaj kvasac još nije transformiran, a upravo to je korak koji znatno olakšava karakterizaciju nekog organizma, a neophodan je i za primjenu metoda genetičkog inženjerstva (tehnologija rekombinantne DNA). Ovom tehnologijom u genom kvasca unose se precizne genetičke promjene što omogućava i poboljšavanje proizvodnih svojstava industrijskih mikroorganizama.

Rezultati usporednih analiza kvasaca *D. burxelensis* i *S. cerevisiae* mogli bi poslužiti kao osnova za suzbijanje kontaminacije kvascima iz roda *Dekkera*, a razvoj metode za transformaciju ovog kvasca olakšat će njegovu daljnju genetičku i fiziološku karakterizaciju te omogućiti preciznu manipulaciju njegovim genomom u svrhu konstrukcije sojeva koji bi mogli naći primjenu u industrijskoj proizvodnji bioetanola i octene kiseline.

---



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu korištena je bakterija *Escherichia coli*, te dvije vrste kvasca, *Saccharomyces cerevisiae* i *Dekkera bruxellensis*.

###### 3.1.1.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje plazmida pDMS+ (poglavlje 3.1.2.) u jednolančanom i dvolančanom obliku korištena je bakterija *E. coli*, soj XL1 blue genotipa *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZAM15 Tn10* (Tetr)] (*Stratagene*).

###### 3.1.1.2. Kvasac *Dekkera bruxellensis*

Korištena su dva izolata soja *Dekkera bruxellensis* Van der Walt i to soj CBS2499 i soj CBS74, a neke njihove karakteristike prikazane su u tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Karakteristike sojeva kvasca *Dekkera bruxellensis* Van der Walt (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, CBS).

KARAKTERISTIKE	SOJ KVASCA <i>D. bruxellensis</i>	
	CBS2499	CBS74
podrijetlo	Francuska, Médoc izoliran iz vina	Belgija izoliran iz piva
maksimalna temperatura na kojoj može rasti	40 °C	35 °C
sinteza octene kiseline	da	da
rast na etanolu	da	slabo

###### 3.1.1.3. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

U ovom radu korištena su tri soja kvasca *S. cerevisiae*, i to soj BY4741 genotipa *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*, soj BY4743 genotipa *MATa/MATa his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0* (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, EUROSCARF) i soj Ffmre11 genotipa *MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 ade5 can<sup>R</sup> mre11::kanMX4* (iz zbirke laboratorija).

Haploidni soj (BY4741) korišten je u usporednim analizama sojeva kvasca *D. bruxellensis* (CBS2499 i CBS74), te zajedno s diploidnim sojem (BY4743) za procjenu ploediteta sojeva CBS2499 i CBS74. Genomska DNA soja Ffmre11 korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) za umnažanje sekvencije *mre11::kanMX4*. Ovako umnožena DNA korištena je

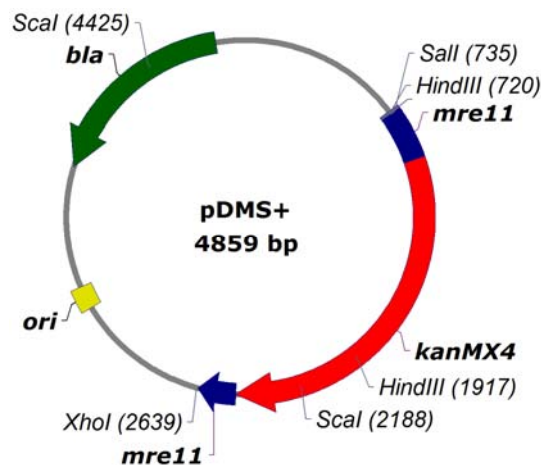
za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* soj CBS2499, a budući da sadrži sekvenciju *kanMX4*, transformanti su selekcionirani na podlozi koja sadrži geneticin.

#### 3.1.1.4. Bakteriofag

Bakteriofag R408 korišten je kao helper fag pri izolaciji jednolančanog plazmida. Ovaj soj faga daje povećan prinos plazmidne DNA u odnosu na DNA helpera (Russel i sur., 1986).

### 3.1.2. Plazmid pDMS+

Za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* korišten je plazmid pDMS+ prikazan na slici 3.1. Ovaj plazmid može se umnožiti u bakteriji *Escherichia coli* zahvaljujući odgovarajućem ishodištu replikacije (*ori*), a budući da sadrži i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (*bla*) stanice koje ga sadrže mogu se selekcionirati na hranjivoj podlozi uz dodatak antibiotika ampicilina. Osim toga plazmid pDMS+ sadrži sekvencu *kanMX4* koja je korištena kao genetički biljeg za selekciju transformanata kvasca *D. bruxellensis* jer je zaslužna za rezistenciju kvašćevih stanica na antibiotik geneticin.



**Slika 3.1.** Plazmid pDMS+. Središnji dio gena *MRE11* zamijenjen je sekvencom *kanMX4*, a prikazana su restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad (*Xho* I, *Sca* I, *Sal* I, *Hind* III).

### 3.1.3. Oligonukleotidi

U ovom radu korišteno je 14 različitih oligonukleotida (Tablica 3.2), od čega su dva (*mre11F1* i *mre11R2*) korišteni za umnažanje sekvencije *mre11::kanMX4* iz soja kvasca FF*mre11*, a preostalih 12 oligonukleotida korišteno je za metodu RAPD.

**Tablica 3.2.** Oligonukleotidi korišteni kao početnice za lančanu reakciju polimerazom i metodu RAPD. Objašnjenje se nalazi u tekstu.

OLIGONUKLEOTID	REDOSLIJED NUKLEOTIDA U OLIGONUKLEOTIDIMA
mre11F1	5'-agagttcacaagcaagcctg-3'
mre11R2	5'-aacaagagcaaaggctgg-3'
ALI F	5'-cagtagcaccagttgttacatcg-3'
ALI R	5'-cgatgtaacaactgggtgctactg-3'
JF3 F	5'-gatgtacttgccagttgccttgc-3'
JF3 R	5'-gcaaggcaactggcaagtacatc-3'
JF4 F	5'-tgctatgcctgttaatgctgcaa-3'
JF4 R	5'-ttgcagcattaacaggcatagca-3'
OPO-F	5'-ggaattcccccttacacggag-3'
OPO-R	5'-ggaattcgcctttgagtgagc-3'
RAD17F1	5'-ctaccaaggctttaaccaga-3'
RAD17R2	5'-ggagcacttttgaatacgg-3'
cycC	5'-gagcggatacatatttgaat-3'
cycD	5'-cttccaactcttaccagtg-3'

### 3.1.4. Hranjive podloge i otopine

Ako nije drugačije navedeno, sve hranjive podloge i otopine autoklaviraju se 15 min pri 120 °C i nadtlaku od 1 atmosfere ili se pripremaju iz sterilnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute hranjive podloge istog su sastava kao i tekuće, ali se prije autoklaviranja dodaje 20 g/L agara. Otopine aminokiselina, nukleinskih baza i antibiotika te otopina 5-fluoroorotične kiseline steriliziraju se filtracijom kroz filtar veličine pora 0,2 µm.

#### 3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Kompleksna podloga (LB):

tripton	10 g/L
yeast extract	5 g/L
NaCl	10 g/L

Podloga sa ampicilinom:

Ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 20 mg/mL) do konačne koncentracije od 50 µg/mL u krutu podlogu (ohlađenu na 58 °C), odnosno do konačne koncentracije od 100 µg/mL u tekuću podlogu.

Kompleksna podloga (2x YT):

tripton	16 g/L
yeast extract	10 g/L
NaCl	5 g/L

### 3.1.4.2. Podloge za uzgoj kvasaca *Dekkera bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiae*

Podloge za ova dva kvasca su istog sastava s malim razlikama u koncentraciji pojedinih sastojaka.

#### Kompleksne hranjive podloge:

Za kvasac *S. cerevisiae* se kao kompletna podloga koristi podloga YPD, a za kvasac *D. bruxellensis* podloga GYP. Te dvije podloge razlikuju se samo u koncentracijama peptona i kvašćevog ekstrakta.

Podloga YPD:

bacto-pepton	20 g/L
yeast extract	10 g/L
glukoza	20 g/L

Podloga GYP:

bacto-pepton	10 g/L
yeast extract	5 g/L
glukoza	20 g/L

Kompleksna podloga sa geneticinom (G418):

Geneticin se dodaje u steriliziranu podlogu GYP kad se ona ohladi do 50 do 60 °C iz osnovne otopine (koncentracije 50 mg/mL).

Podloga sa cikloheksimidom:

Cikloheksimid se dodaje u sterilnu podlogu GYP iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 10 mg/mL) do konačne koncentracije od 10, 50 odnosno 100 mg/L. Osnovna otopina cikloheksimida se sterilizira filtracijom kroz filter veličine pora 0,22 µm i čuva pri -20 °C, a dodaje se nakon autoklaviranja, kad se hranjiva podloga ohladi do 50 do 60 °C.

#### Kemijski definirane podloge:

Kemijski definirane podloge za uzgoj kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* razlikuju se samo u koncentraciji amonijevog sulfata koja iznosi 2 g/L za *D. bruxellensis* i 5 g/L za *S. cerevisiae*.

Minimalna hranjiva podloga:

yeast nitrogen base (bez aminokiselina i amonijevog sulfata)	1,7 g/L
amonijev sulfat	2 (5) g/L
glukoza	20 g/L
agar	25 g/L

Minimalna hranjiva podloga sa uracilom se priprema isto kao i minimalna hranjiva podloga, ali se nakon sterilizacije dodaje 8,3 mL/L otopine uracila (koncentracije 2,4 g/L)

Kompletna hranjiva podloga se priprema isto kao i minimalna podloga, ali se dodaje još i 1,3 g/L smjese aminokiselina i adenina ("drop-out powder", tablica 3.3), te nakon sterilizacije 8,3 mL/L

otopine uracila. Kod pripreme kompletne hranjive podloge bez uracila se nakon sterilizacije ne dodaje otopina uracila.

**Tablica 3.3.** Tvari potrebne za rast kvasca koje se koriste za pripremu kompletne sintetske hranjive podloge.

SASTOJAK	KOLIČINA NUKLEINSKIH BAZA I AMINOKISELINA (g) U SMJESI	KONAČNA KONCENTRACIJA U HRANJIVOJ PODLOZI (mg/L)	KONCENTRACIJA MATIČNE OTOPINE (g/L)
adenin sulfat	2,5	40	5,0
uracil	1,2	20	2,4
L-arginin-HCl	1,2	20	2,4
L-asparaginska kiselina	6,0	100	12
L-glutaminska kiselina	6,0	100	12
L-histidin-HCl	1,2	20	2,4
L-izoleucin	1,8	30	3,6
L-leucin	3,6	60	7,2
L-lizin-HCl	1,8	30	3,6
L-metionin	1,2	20	2,4
L-fenilalanin	3,0	50	6,0
L-serin	22,5	375	45,0
L-treonin	12,0	200	24,0
L-triptofan	2,4	40	4,8
L-tirozin	1,8	30	18,0
L-valin	9,0	150	18,0

Podloga sa 5-fluoroorotičnom kiselinom (5-FOA):

Istog je sastava kao i kompletna hranjiva podloga osim što se umjesto 8,3 mL/L dodaje 16,6 mL/L otopine uracila, te 1 g/L 5-fluoroorotične kiseline (5-FOA). Priprema se tako da se sve komponente osim otopine uracila i 5-fluoroorotične kiseline otope u polovini ukupnog volumena i steriliziraju autoklaviranjem, te se doda 16,6 mL otopine uracila. U drugoj polovini volumena otopi se 1 g 5-FOA, te se zatim sterilizira filtracijom kroz filter veličine pora 0,2  $\mu$ m. Nakon toga se obje otopine temperiraju na 55 °C, dodaju u istu posudu, izmiješaju, te izliju u Petrijeve zdjelice.

Podloga sa kanavaninom:

Istog je sastava kao kompletna hranjiva podloga, ali bez arginina, uz dodatak 10 mL/L kanavanina (koncentracije 6 mg/mL). Osnovna otopina kanavanina se sterilizira filtracijom kroz filter veličine pora 0,22  $\mu$ m i čuva pri -20 °C, a dodaje se nakon autoklaviranja, kad se hranjiva podloga ohladi do 50 do 60 °C.

Regeneracijski agar :

Istog je sastava kao kompletna kemijski definirana podloga, ali sadrži i 182 g/L sorbitola. U ovom radu je korišten regeneracijski agar u kojem su koncentracije sorbitola bile 0,2 M; 0,4 M; 0,5 M; 0,75 M; 1 M, 2 M. Tekuća regeneracijska podloga se priprema isto kao kruta, ali bez dodatka agara.

---

### 3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8 M): Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Ampicilin (20 mg/mL): Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C.

EDTA (0,5 M; pH 8): 186,1 g EDTA x 2H<sub>2</sub>O otopi se u 80 mL destilirane vode, pH se podesi dodatkom NaOH (približno 2 g peleta) i dopuni destiliranom vodom do 100 mL.

Fenol: Redestilirani fenol otopljen na 67 °C i zasićen jednakim volumenom TE-pufera (pH 8). Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri 4 °C.

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

Glukoza (40 g/L): Otopina se sterilizira na 0,5 bara nadtlaka.

GTE-pufer: 50 mM glukoza; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0). Priprema se iz sterilnih otopina, neposredno prije upotrebe.

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

Litijev klorid (5 M): Čuva se pri 4 °C.

Natrijev acetat (3 M): 24,6 g bezvodnog natrijevog acetata otopi se u destiliranoj vodi, pH 5,2 se podesi ledenom octenom kiselinom i dopuni destiliranom vodom do 100 mL vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

NaOH/SDS: 0,2 M NaOH; 10 g/L SDS. Otopina se ne sterilizira, a priprema se neposredno prije upotrebe.

PEG/NaCl: 130 g/L PEG<sub>6000</sub>; 1,6 M NaCl. Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C.

RN-aza: Ribonukleaza A otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM natrijevom kloridu do konačne koncentracije 10 mg/mL i 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 mM Tris-HCl (pH 8,0 ili 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0). Priprema se iz sterilnih otopina.

Tris-HCl (1 M): 12,1 g Tris-a otopi se u 80 mL destilirane vode, pH se do željene vrijednosti podesi dodatkom koncentrirane HCl i dopuni do 100 mL. Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti su: pH 7,4 7,0 mL; pH 7,6 6,0 mL; pH 8,0 4,2 mL.

SCE: 1,0 M sorbitol; 0,1 M natrijev citrat; 0,06 M EDTA. Otopina se ne sterilizira.

STE: 5 g/L SDS; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0); 0,05 M EDTA (pH 8,5). Otopina se ne sterilizira.

---

---

Zimoliaza 20-T: 15 mg enzima zimoliaze (Zymolyase 20-T) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 g/L i čuva pri -20 °C.

#### 3.1.4.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica

##### Otopina za transformaciju pomoću litijevog acetata

PEG <sub>4000</sub> 50 %	16 mL
Litijev acetat 1 M pH 7,0-7,4	5 mL
Tris-HCl 1 M pH 8,0	7,5 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,04 mL
H <sub>2</sub> O	1,75 mL

Otopina za transformaciju priprema se od prethodno steriliziranih otopina.

##### Otopine za transformaciju protoplasta

Kalcijev klorid (1 M)

Kalcijev klorid (0,1 M): Priprema se razrjeđivanjem kalcijevog klorida (1 M) sterilnom destiliranom vodom.

SDS (10 g/L): Priprema se iz otopine SDS-a koncentracije 100 g/L.

Sorbitol (1 M)

TpC: 1 M sorbitol; 10 mM kalcijev klorid; 10 mM Tris-HCl (pH 7,4). Priprema se iz sterilnih otopina.

TpPEG: 200 g/L PEG<sub>6000</sub>; 10 mM kalcijev klorid; 10 mM Tris-HCl (pH 7,4). Priprema se neposredno prije upotrebe i sterilizira filtracijom.

Zimoliaza 100-T: 15 mg enzima zimoliaze (Zymolyase 100-T) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 g/L i čuva pri -20 °C.

#### 3.1.4.5. Otopine za gel-elektroforezu

##### TAE-pufer (50x):

Tris	24,2 g
ledena octena kiselina	5,7 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	10,0 mL
destilirana voda	do 100,0 mL

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku, te se naknadno razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Nije ga potrebno sterilizirati.

---

Agarozni gel:

Priprema se otapanjem agaroze u TAE-puferu (1x) kojeg se pripremi razrjeđivanjem TAE-pufera (50x). Koncentracija agaroze u gelu može biti 7 do 20 g/L, ovisno o potrebi.

Boja za nanošenje uzorka:

brom-fenol-plavo	2,5 g/L
ksilen-cijanolo	2,5 g/L
ficoll 400	250,0 g/L

Otopina se ne sterilizira i čuva se pri 4 °C.

Etidijev bromid:

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

## 3.1.4.6. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southern-u

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

Amonijev acetat (1 M): Priprema se razrjeđivanjem amonijevog acetata (8 M).

HCl (0,25 M)

DNA-nosač (nespecifična DNA): DNA sperme haringe otopljena u TE-puferu (pH 8) u koncentraciji od 20 mg/mL. Čuva se pri -20 °C.

NaOH (0,4 M)

NaOH/amonijev acetat: 0,5 M NaOH; 1 M amonijev acetat.

Otopina 1: SSC 20x 10 mL; SDS (10 %) 1 mL; destilirana voda 89 mL.

Otopina 2: SSC (20x) 0,5 mL; SDS (100 g/L) 1,0 mL; destilirana voda 98,5 mL.

Otopina za predhibridizaciju: Za 80 mL otopine: SSC (20x) 20,0 mL; smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija ("blocking reagent") 0,8 g; Na-sol N-lauroilsarkozina (100 g/L) 0,8 mL; SDS (100 g/L) 160 µL; DNA-nosača 8 mg.

Otopina za hibridizaciju: Ima isti sastav kao otopina za predhibridizaciju samo što sadrži i 20-50 ng/mL obilježene DNA (DNA-sondu).

Pufer 1: 0,10 M Tris-HCl (pH 7,5); 0,15 M NaCl.

Pufer 2: Priprema se otapanjem smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija ("blocking reagent") u puferu 1 do koncentracije od 10 g/L.



---

Pufer 3: Tris (1 M; pH 9,7) 50 mL; natrijev klorid (5 M) 10 mL; magnezijev klorid (1 M) 25 mL; pH 9,5 se podese dodatkom HCl i dopuni destiliranom vodom do 500 mL.

SSC (20 x): 3,0 M natrijev klorid; 0,3 M natrijev citrat.

### 3.1.5. Kemikalije i enzimi

5-FOA:	Meilford Laboratories Ltd., Suffolk
Agaroz:	Appligene, Strassbourg.
Apsolutni etanol:	Novokem, Zagreb.
DNA bakteriofaga $\lambda$ :	New England Biolabs, Beverly.
DNA sperme haringe:	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
EDTA:	Kemika, Zagreb.
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA:	New England Biolabs, Beverly, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Amersham Biosciences, San Francisco.
Etidijev bromid:	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
Izopropanol:	Alkaloid, Skopje.
Sastojci hranjivih podloga:	Difco, Detroit Merck, Darmstadt.
Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela:	QIAGEN, Hilden.
PEG:	Appligene, Strassbourg.
<u>Sorbitol</u> :	Pliva, Zagreb.
Ribonukleaza A:	Sigma Chemical Co., St. Louis.
Tris: Tris Ultra Pure	Sigma Chemical Co., St. Louis.
Zimolijaza (Zymolyase 100-T i 20-T):	Seikugaku Kogyo Co., Tokyo.
Kemikalije za pripremu ostalih otopina:	Sigma Chemical Co., St. Louis, Kemika, Zagreb, Alkaloid, Skopje.
Geneticin	Sigma Chemical Co., St. Louis
Kanavanin	Sigma Chemical Co., St. Louis
Cikloheksimid	Sigma Chemical Co., St. Louis

---

---

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje utjecaja sorbitola na rast kvasca i aktivnost zimolijaze

#### Utjecaj sorbitola na rast kvasca

Utjecaj je istraživao na dva načina, pripremom razrjeđenja u sorbitolu i naciepljivanjem u regeneracijski agar koji sadrži sorbitol.

Razrjeđenja u sorbitolu:

Pripremi se peto decimalno razrjeđenje sve tri kulture kvasca (stacionarna faza) u vodi, 0,5 M sorbitolu i 1 M sorbitolu, te se 100  $\mu$ L naciepi na površinu krute podloge GYP. Iz broja poraslih kolonija izračuna se broj stanica po mililitru, te postotak preživjelih stanica u odnosu na stanice razrijeđene u vodi.

Naciepljivanje u regeneracijski agar sa različitim koncentracijama sorbitola:

Pripreme se decimalna razrjeđenja (od prvog do petog) u vodi odnosno SDS-u (10 g/L) te se po 100  $\mu$ L svakog razrjeđenja naciepi na površinu podloge GYP, a po 100  $\mu$ L trećeg, četvrtog i petog decimalnog razrjeđenja se naciepi u 50 mL regeneracijskoga agara (0; 0,5 M i 1 M sorbitol) temperiranog na 42 °C, te se podloga izlije u dvije Petrijeve zdjelice. Iz broja poraslih kolonija izračuna se broj stanica po mililitru, te postotak preživljenja.

#### Utjecaj sorbitola na aktivnost zimolijaze

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenese se u 400 mL tekuće kompletne podloge i preko noći uz aeraciju inkubira pri 28 °C do koncentracije stanica od 1 do  $2.5 \times 10^7$  st/mL. Točan broj stanica odredi se brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Stanice se izdvoje centrifugiranjem 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti, te isperu s 150 mL sterilne destilirane vode, a zatim još dva puta s 25 mL vode centrifugiranjem pri istim uvjetima. Isprane stanice se resuspendiraju u 1,5 mL TE pufera te se po 200  $\mu$ L suspenzije se doda u šest epruveta koje sadrže TE pufer; TE pufer i zimoliazu; 0,2 M sorbitol i zimoliazu; 0,4 M sorbitol i zimoliazu; 0,5 M sorbitol i zimoliazu i 0,75 M sorbitol i zimoliazu. Nakon 5, 10, 20, 40 odnosno 60 minuta po 100  $\mu$ L sadržaja tih epruveta se pomiješa sa SDS-om i prati se razbistravanje otopine.

### 3.2.2. Istraživanje utjecaja SDS-a

Utjecaj SDS-a na preživljenje stanica kvasca provodi se tako da se 100  $\mu$ L kulture kvasca *D. bruxellensis* u stacionarnoj fazi razrijedi sa 900  $\mu$ L SDS-a (10 g/L), te se nakon 30 sekundi odnosno nakon 10 i 30 minuta naciepi 100  $\mu$ L tako pripremljenog razrjeđenja na krutu podlogu GYP. 100  $\mu$ L trećeg decimalnog razrjeđenja kulture kvasca *S. cerevisiae* se doda u 900  $\mu$ L SDS-a. Nakon 30 sekundi odnosno nakon 10 i 30 minuta, 100  $\mu$ L se naciepi na krutu podlogu GYP. Osim toga 100

---

---

$\mu\text{L}$  petog decimalnog razrjeđenja jedne i druge kulture se nacijepi na krutu podlogu. Iz broja poraslih kolonija izračuna se broj stanica po mililitru, te postotak preživjelih stanica.

### 3.2.3. Procjena ploiditeta kvasca

Ploiditet kvasca *D. bruxellensis* se može procijeniti usporedbom sa standardnim haploidnim i diploidnim sojem kvasca *S. cerevisiae*. Kvasci *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* se uzgoje u tekućoj kompletnoj podlozi do stacionarne faze, te se po 100  $\mu\text{L}$  petog decimalnog razrjeđenja svake kultura nacijepi na krute kompleksne podloge. Po 200  $\mu\text{L}$  originalnih suspenzija se nacijepi na podlogu sa kanavaninom (sastav podloge opisan u poglavlju 3.1.4.2.). Nakon 5 dana inkubacije pri 28 °C očitaju se rezultati, te se izračuna broj stanica po mililitru ishodne suspenzije i učestalost mutanata rezistentnih na kanavanin.

### 3.2.4. Izrada krivulje preživljenja nakon djelovanja UV-svjetla

U svrhu izrade krivulje preživljenja, jedna kolonija kvasca nacijepi se u 20 mL tekuće kompleksne podloge i uzgaja pri 28 °C uz aeraciju do stacionarne faze rasta (3 do 5 dana), odnosno do gustoće od oko  $2 \times 10^8$  stanica/mL (točan broj stanica može se odrediti brojanjem u Thoma-ovoj komorici). Zatim se razrjeđivanjem ove kulture u vodi pripremi 20 mL suspenzije za zračenje koja sadrži  $2 \times 10^6$  stanica/mL. Prije ozračivanja, iz suspenzije za zračenje izuzme se 100  $\mu\text{L}$  suspenzije koja se koristi za određivanje ukupnog broja živih stanica pripremom odgovarajućeg decimalnog razrjeđenja i naciepljivanjem na krutu kompleksnu podlogu. Nakon toga se suspenzija za zračenje izlaže djelovanju ultraljubičastog svjetla te se u određenim vremenskim intervalima izuzimaju alikvoti koji se koriste za pripremu razrjeđenja i naciepljivanje na krute kompleksne podloge. Naciepljene krute podloge inkubiraju se pri 28 °C do pojave kolonija (5 dana). Na temelju očitanih rezultata može se nacrtati krivulja preživljenja stanica ovisno o primijenjenoj dozi ultraljubičastog svjetla.

### 3.2.5. Transformacija kvasca *Dekkera bruxellensis*

#### 3.2.5.1. Transformacija pomoću litijeveg acetata

Postupak korišten u ovom radu modifikacija je postupka kojeg su opisali Gietz i Woods (1994).

#### Uzgoj i ispiranje stanica

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenese se u 400 mL podloge GYP i uz aeraciju inkubira pri 28 °C do koncentracije stanica od oko  $1,5 \times 10^7$  st/mL. Točan broj stanica odredi se brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Za transformaciju se koristi 150 mL uzgojene kulture ( $2 \times 10^9$  stanica). Stanice se izdvoje centrifugiranjem 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti, isperu s 25 mL

---

---

sterilne destilirane vode, ponovno centrifugiraju 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti, a zatim resuspendiraju u 1 mL sterilne destilirane vode.

### Transformacija

Nakon centrifugiranja 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti, ukloni se supernatant, te se stanice sada koriste za transformaciju. Na stanice se doda 1 mL 0,1 M litijevog acetata, te slijedi inkubacija u termostatu na 28 °C tijekom 20 minuta. Na stanice se zatim dodaje 5 µl transformirajuće DNA i 5 µL DNA-nosača (DNA sperme haringe otopljena u TE-puferu), lagano se promiješa te se ostavi 20 minuta na 28 °C. Slijedi dodatak 300 µL otopine za transformaciju stanica (sastav opisan u poglavlju 3.1.4.4.), te inkubacija pri 28 °C tijekom 20 minuta. Stanice se zatim inkubiraju u vodenoj kupelji 30 minuta pri 42 °C, te centrifugiraju 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti. Otopina za transformaciju stanica se ukloni mikropipetom, te se stanice resuspendiraju u 3,5 mL podloge GYP. Nakon inkubacije od šest sati na 28 °C, stanice se izdvoje centrifugiranjem, resuspendiraju u ostatku supernatanata, te nacijepe na podlogu sa geneticinom za selekciju transformanata. Uzgoj stanica se vrši pri 28 °C, a rezultati transformacije se očitavaju nakon 5 do 7 dana.

#### 3.2.5.2. Transformacija protoplastiranjem

Postupak korišten u ovom radu je modifikacija postupka kojeg je opisao Zgaga (1991).

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenese se u 400 mL tekuće kompletne podloge i preko noći uz aeraciju inkubira pri 28 °C do koncentracije stanica od 1 do  $2.5 \times 10^7$  st/mL. Točan broj stanica odredi se brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Stanice se izdvoje centrifugiranjem 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti, te isperu s 400 mL sterilne destilirane vode, a zatim sa 200 mL sorbitola (1 M) centrifugiranjem pri istim uvjetima. Isprane stanice suspendiraju se u 25 mL sorbitola (1 M) uz dodatak 100 µL zimolijaze. Tijek protoplastiranja prati se miješanjem 100 µL suspenzije kvašćevih stanica sa 500 µL SDS (10 g/L).

Protoplastiranje je završeno kada miješanjem suspenzije i SDS-a nastane bistra otopina.

Suspenzija protoplasta centrifugira se 10 minuta pri 2000 okretaja u minuti, te ispire sa 25 mL sorbitola (1 M), a zatim sa 25 mL TpC-a, pri istim uvjetima. Protoplasti se na kraju suspendiraju u TpC-u tako da u 100 µL suspenzije bude 2 do  $5 \times 10^8$  protoplastiranih stanica. Ovako pripremljeni protoplasti mogu se čuvati nekoliko sati na 4 °C. 100 µL suspenzije protoplasta pomiješa se s otopinom DNA (sa ili bez dodatka DNA nosača) ukupnog volumena do 10 µL i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorku se doda 1 mL TpPEG-a i ostavi još 20 minuta na sobnoj temperaturi. Ova suspenzija se prenese u 5 mL tekuće regeneracijske podloge (sastav opisan u poglavlju 3.1.4.2.) te se inkubira pri 28 °C. Nakon regeneracije protoplasta slijedi nacjepljivanje na podlogu koja sadrži 200 µg/mL geneticina.

---

---

Može se pratiti i uspješnost regeneracije protoplasta. Nakon završenog protoplastiranja 10  $\mu\text{L}$  suspenzije protoplasta se razrijedi sa 990  $\mu\text{L}$  1 M sorbitola i lagano promiješa odnosno sa 990  $\mu\text{L}$  sterilne destilirane vode i vorteksira. Po 100  $\mu\text{L}$  takvog razrjeđenja se nacijepi u 75 mL regeneracijskog agara temperiranog na 42  $^{\circ}\text{C}$ , izlije u tri Petrijeve zdjelice i ostavi da se skrutne. Nakon 5 dana inkubacije vide se rezultati.

### **3.2.6. Gel elektroforeza**

U ovom radu za gel-elektroforezu korištene su elektroforetske kadice proizvedene u Amersham Bioscience, model GNA 100 i TAE-pufer. Otopljeni agarozni gel (poglavlje 3.1.4.5.) ohladi se na oko 60  $^{\circ}\text{C}$  i izlije u nosač gela na koji se postavi češalj za formiranje jažica. Nakon što se gel skrutne, češalj se izvadi, a nosač gela se postavi u kadicu za elektroforezu u koju se ulije TAE-pufer (1x) tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1 mm. Uzorci DNA pomiješaju se s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 6:1 i unesu mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza se u kadicama GNA 100 najčešće provodi pri naponu do 70 V u vremenu od 1 do 3 sata (ovisno o koncentraciji agaroze i veličini fragmenata DNA koji se analiziraju). Nakon provedene elektroforeze, gel se 15 do 20 minuta inkubira u otopini etidijevog bromida, osvijetli UV-svjetlom na transiluminatoru i fotografira kroz crveni filtar.

### **3.2.7. Hibridizacija DNA metodom po Southern-u**

Hibridizacija DNA metodom po Southern-u provedena je pomoću kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i detektiranje homologne DNA ("Boehringer Mannheim GmbH") prema uputama proizvođača, uz manje modifikacije (Gjuračić i Zgaga, 1996).

### **3.2.8. Izolacija i pročišćavanje DNA**

#### **3.2.8.1. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom**

DNA se taloži amonijevim acetatom i etanolom dodatkom 1/3 volumena amonijevog acetata (8 M) i 8/3 volumena apsolutnog etanola te nakon toga centrifugira 20 minuta na 14000 okretaja u minuti pri 4  $^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.8.2. Ekstrakcija DNA fenolom i kloroformom**

Otopini DNA doda se 0,5 volumena fenola i 0,5 volumena kloroforma, snažno se promiješa te centrifugira 2 minute pri 12000 okretaja u minuti. Gornja faza prenese se u novu kivetu, a cijeli postupak se ponavlja sve dok se nakon centrifugiranja ne prestane pojavljivati proteinski talog (između gornje i donje faze). Nakon toga se gornjoj fazi (u novoj kiveti) doda jednaki volumen

---

---

kloroforma, snažno promiješa, te nakon centrifugiranja (2 minute na 12000 okretaja u minuti) gornja faza prenese u novu kivetu.

### 3.2.8.3. Izolacija dvolančanog plazmida

Za izolaciju dvolančanog plazmida korištene su standardne metode alkalne lize (Maniatis i sur., 1982), uz manje modifikacije. Plazmid korišten za transformaciju kvasca izoliran je iz velikog volumena bakterijske kulture (500 do 1000 mL) i pročišćen polietilenglikolom.

#### Izolacija iz velikog volumena

500 mL prekonoćne kulture bakterije *Escherichia coli* centrifugira se deset minuta na 5000 okretaja u minuti, te se talog resuspendira u 10 mL GTE-pufera i ostavi 10 minuta na ledu. Suspenziji se doda 20 mL otopine NaOH/SDS te se sve blago promiješa i ponovno ostavi 10 minuta na ledu. Nakon toga, doda se 15 mL natrijevog acetata (3 M), inkubira 20 minuta pri -20 °C te centrifugira 15 minuta na 15000 okretaja u minuti. Supernatant se prebaci u novu kivetu i ponovno centrifugira pri istim uvjetima, prelije se u novu kivetu, odredi mu se volumen i pomiješa s 0,6 volumena izopropanola. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi centrifugira se 30 minuta na 10000 okretaja u minuti, te se supernatant odbaci, a talog ispere hladnim 70 %-tnim etanolom i otopi u TE-puferu (pH 8). Ovako dobivena DNA može se pročistiti PEG-om.

#### Pročišćavanje PEG-om

U 8 mL otopine DNA (u TE-puferu, pH 8,0) doda se 3 mL litijevog klorida (5 M) i centrifugira 10 minuta na 10000 okretaja u minuti pri 4 °C. Supernatant se prenese u novu kivetu, doda se isti volumen (11 mL) izopropanola i centrifugira pri istim uvjetima. Supernatant se odbaci, a talog ispere s hladnim 70 %-tnim etanolom, osuši na zraku, te otopi u 0,5 mL TE-pufera (pH 8,0) uz dodatak 5 µL RN-aze. Nakon inkubacije 30 minuta pri sobnoj temperaturi doda se 0,5 mL otopine PEG/NaCl (ds) i centrifugira 5 minuta na 12000 okretaja u minuti pri 4 °C. Supernatant se odbaci, a talog otopi u 400 µL TE-pufera i ekstrahira fenolom i kloroformom (poglavlje 3.2.8.2.). Plazmidna DNA taloži se amonijevim acetatom i apsolutnim etanolom (poglavlje 3.2.8.1.) i otopi u 300 mL TE-pufera (pH 8,0). DNA se još jednom pretaloži amonijevim acetatom i etanolom, te otopi u TE-puferu (pH 8,0).

### 3.2.8.4. Izolacija jednolančanog plazmida

Za izolaciju jednolančanog plazmida korištena je metoda opisana u radu Russel i sur. (1986), uz manje modifikacije. Sve podloge, korištene u ovoj metodi, sadrže ampicilin kako bi pod selektivnim pritiskom izrasle samo one stanice koje sadrže plazmid.

#### Infekcija bakterije bakteriofagom

---

---

Bakterija *E. coli*, soj XL1 blue (poglavlje 3.1.1.1) koja sadrži plazmid, naciepljuje se na krutu M9 podlogu, da bi stanice zadržale episom odgovoran za sintezu pilusa, preko kojeg bakteriofag inficira stanicu. Jedna takva kolonija prenese se u 2 mL tekuće 2YT podloge i inkubira na 37 °C uz miješanje kroz 6 do 7 sati (Predkultura I). 50 µL predkulture I pomiješa se sa 25 do 50 µL osnovne suspenzije faga (titar  $10^{11}$  do  $10^{12}$  faga/mL) i prenese u 1 mL 2YT podloge.

Ova tzv. predkultura II, inkubira se 1 sat na 37 °C uz lagano miješanje. 500 µL predkulture II prebaci se u 50 mL 2YT podloge i inkubira preko noći na 37 °C. Da bi se postigao visok prinos plazmida važna je dobra aeracija.

#### Izolacija jednolančanog plazmida

Dobivena kultura centrifugira se 10 minuta pri 6000 okretaja u minuti pri čemu se odvoji veći dio stanica. Preostale stanice u supernatantu obaraju se ponovnim centrifugiranjem 10 minuta pri 8000 okretaja u minuti. Supernatantu se doda 12,5 mL (0,25 vol) polietilenglikola i ostavi stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi. Talog se odvoji centrifugiranjem 10 minuta pri 10000 okretaja u minuti. Supernatant se odbaci, a talog se još jednom centrifugira 5 minuta pri istom broju okretaja, kako bi se potpuno uklonio preostali PEG. Talog se suspendira u 3 mL TE pufera (pH 8).

Suspenziji se doda po 1,5 mL fenola i kloroforma, uz jako miješanje (oko 15 sekundi) pri svakom dodavanju i ostavi stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi. Faze se potpuno odvajaju centrifugiranjem 5 minuta pri 6000 okretaja u minuti, pri čemu DNA ostaje u gornjoj vodenoj fazi. Vodena faza podvrgne se istom postupku još 1 do 2 puta, ovisno o količini proteina. Ekstrakcija se ponovi još jednom, samo sa 3 mL kloroforma.

DNA se taloži dodatkom 8 M amonij acetata do konačne koncentracije 2 M, te dodatkom etanola u dvsotrukoj količini od ukupnog volumena. Taloženje se provodi najmanje 2 sata na -20 °C. Nakon taloženja DNA se odvoji centrifugiranjem pri 10000 okretaja u minuti, u vremenu od 30 minuta i otopi u 300 µL TE pufera (pH 8). Taloženje se ponovi, a dobiveni talog DNA se otopi u 50 µL TE pufera.

#### 3.2.8.5. Izolacija kvaščeve DNA

Za izolaciju kvaščeve DNA korištena je metoda koju su opisali Winston i suradnici (1983). 3 mL kulture kvasca u stacionarnoj fazi centrifugira se 5 minuta na 5000 okretaja u minuti, te se talog stanica ispere s 3 mL destilirane vode, zatim s 3 mL SCE i na kraju otopi u 200 µL SCE. Nakon dodatka 20 µL zimolijaze stanice se inkubiraju 1 sat na 37 °C, te im se doda 800 µL STE i inkubira 20 minuta pri 70 °C. Uzorci se ohlade u ledu te im se doda 200 µL kalijevog acetata (3 M) i ostave u ledu (pri 4 °C) još najmanje 45 minuta. Nakon centrifugiranja 30 minuta na 15000 okretaja u minuti, 970 µL supernatanta se prenese u novu kivetu uz dodatak 630 µL izopropanola. Nakon

---

centrifugiranja 20 minuta na 14000 okretaja u minuti pri 4 °C talog DNA se osuši vakuum sisaljkom i otopi u 300 µL TE-pufera (pH 8,0) pufera, te pretaloži amonijevim acetatom i etanolom.

### 3.2.9. Tretiranje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje DNA provedeno je prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima ("New England Biolabs"<sup>™</sup>, Beverly, "Boehringer Mannheim GmbH", Mannheim i "Pharmacia Biotech", San Francisco).

### 3.2.10. Lančana reakcija polimerazom i metoda RAPD

Lančana reakcija polimerazom (Mullis i sur.,1986) provedena je u aparatu Mastercycler personal, proizvođača Eppendorf, a u ovom radu korištena je za umnažanje sekvence *mre11::kanMX4* iz soja kvasca FFmre11 (poglavlje 3.1.1.3.) koja je korištena za transformaciju kvasca *D. bruxellensis*. Oligonukleotidi korišteni kao početnice (mre11F1 i mre11R2) opisani su u poglavlju 3.1.3., a sastav reakcijske otopine i uvjeti pri kojima je reakcija provedena prikazani su u tablicama 3.4 i 3.5.

**Tablica 3.4.** Sastav reakcijske otopine za provođenje PCR-reakcije.

KOMPONENTA	VOLUMEN U SMJESI
DNA kalup ( 0,05 µg/mL)	4,0 µL
dNTPs (20 mM)	1,5 µL
mre11F1 (10 µM)	2,5 µl
mre11R2 (10 µM)	2,5 µL
pufer sa MgCl <sub>2</sub>	5,0 µL
Taq polimeraza (1 jedinica/µL)	1,0 µL
voda (sterilna, deionizirana)	33,5 µL

**Tablica 3.5.** Uvjeti pri kojima je provedena PCR-reakcija.

KORAK PCR-REAKCIJE		VRIJEME (MINUTA)	TEMPERATURA (°C)
prva denaturacija DNA		4,5 min	95
30 ciklusa	denaturacija DNA	0,5 min	94
	sparivanje početnica	0,5 min	48
	sinteza DNA	2 min	70
završna sinteza DNA		10 min	70

Metoda RAPD („Random Amplification of Polymorphic DNA“, nasumično umnažanje polimorfne DNA) također je provedena u aparatu Mastercycler personal. Osnova ove metode je lančana reakcija polimerazom, ali se provodi pri uvjetima koji omogućavaju manje specifično sparivanje oligonukleotida i kalupa, a to se postiže snižavanjem temperature pri kojoj se početnice sparuju s kalupom i povećavanjem koncentracije MgCl<sub>2</sub> u reakcijskoj otopini. Usporedna analiza dvaju sojeva kvasca *Dekkera bruxellensis* (CBS2499 i CBS74) i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (soj BY4741) provedena je pri uvjetima prikazanim u tablici 3.6, a sastav reakcijskih smjesa prikazan je



u tablici 3.7. Svi oligonukleotidi korišteni kao početnice tijekom optimizacije ove metode prikazani su prikazane u poglavlju 3.1.3.

**Tablica 3.6.** Uvjeti metode RAPD pri usporednoj analizi kvasaca *Dekkera bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiae*.

KORAK RAPD-REAKCIJE		VRIJEME (MINUTA)	TEMPERATURA (°C)
prva denaturacija DNA		5	95
30 ciklusa	denaturacija DNA	1	95
	sparivanje početnica	1	30
	sinteza DNA	2	72
završna sinteza DNA		8	72

**Tablica 3.7.** Sastav reakcijskih otopina za provođenje metode RAPD.

KOMPONENTA	VOLUMEN U SMJESI	KONCENTRACIJA U SMJESI
Taq polimeraza	0,2 µL	1 jedinica
dATP, dTTP, dCTP, dGTP (2 mM)	5 µL	0,2 mM
početnice RAD17F i RAD17R (25 pmol/µL)	2 µl	1 pmol/µL
MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	5 µL	1,5 mM
pufer za Taq polimerazu (10x)	5 µL	1x
genomska DNA kvasca	2 µL	2 ng/µL
voda (sterilna, deionizirana)	30,8 µL	

## 4. REZULTATI

U ovom poglavlju opisani su eksperimenti koji su provedeni s ciljem djelomične karakterizacije (poglavljje 4.1.) i razvoja metode za transformaciju kvasca *Dekkera bruxellensis* (poglavljje 4.2.). Karakterizacija kvasca *D. bruxellensis* osnivala se na uspoređivanju njegovih osobina s laboratorijskim sojem kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Tako je, između ostalog, provedena usporedna analiza ovih kvasaca metodom RAPD te je preživljenje dvaju sojeva kvasca *D. bruxellensis*, nakon ozračivanja ultraljubičastim svjetlom, uspoređeno s preživljenjem haploidnog i diploidnog soja kvasca *S. cerevisiae*. Osim toga kvasac *D. bruxellensis* uspješno je transformiran fragmentom DNA koji se u stanici kvasca ne može samostalno replicirati, pri čemu su transformanti selekcionirani na podlozi s antibiotikom geneticinom, a prisutnost transformirajuće DNA u stanicama dokazana je molekularnom analizom transformanata.

### 4.1. KARAKTERIZACIJA KVASCA *Dekkera bruxellensis*

U sklopu karakterizacije kvasca *D. bruxellensis* provjerena je njegova mogućnost rasta na različitim laboratorijskim hranjivim podlogama (poglavljje 4.1.1.) te osjetljivost na sorbitol i SDS (poglavljje 4.1.2.). Eksperimenti koji su za cilj imali procijeniti ploeditet dvaju sojeva kvasca *D. bruxellensis* opisani su u poglavlju 4.1.3., a uspješno su izolirani mutanti s inaktiviranim genom *URA3* (poglavljje 4.1.4.). Osim toga izrađena je krivulja preživljenja nakon zračenja ultraljubičastim svjetlom (poglavljje 4.1.5.) te je provedena usporedna analiza dvaju sojeva kvasca *D. bruxellensis* i jednog soja kvasca *S. cerevisiae* metodom RAPD (poglavljje 4.1.6.).

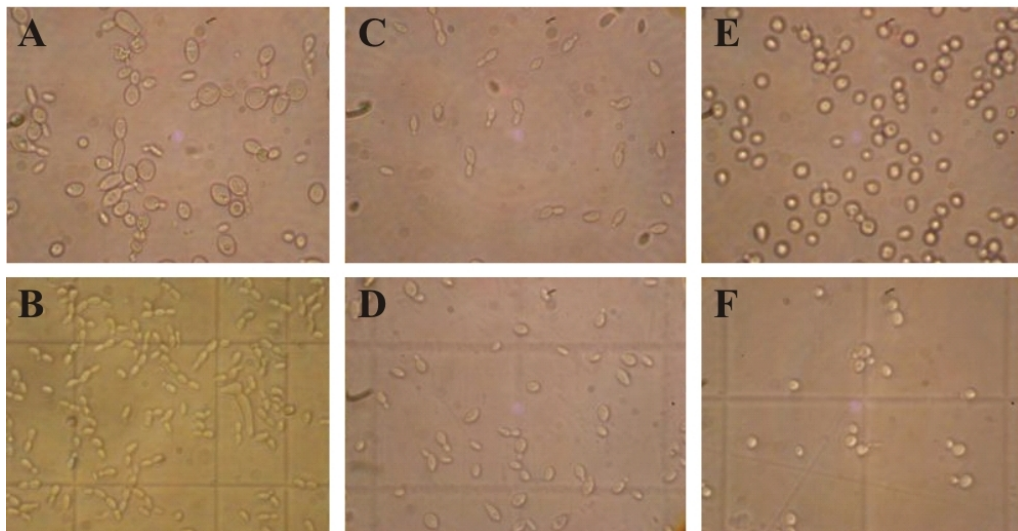
#### 4.1.1. Rast na laboratorijskim hranjivim podlogama

Mikroskopska slika stanica kvasca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* nakon uzgoja u tekućoj i na krutoj kompleksnoj podlozi prikazana je na slici 4.1.

U svrhu optimizacije uzgoja kvasca *D. bruxellensis* te izolacije auksotrofnih mutanata i selekcije transformanata provjerena je mogućnost rasta ovog kvasca na kompleksnim i kemijski definiranim podlogama (sastav podloga opisan u poglavlju 3.1.4.2.) te rast na podlogama u prisutnosti antibiotika cikloheksimida i geneticina.

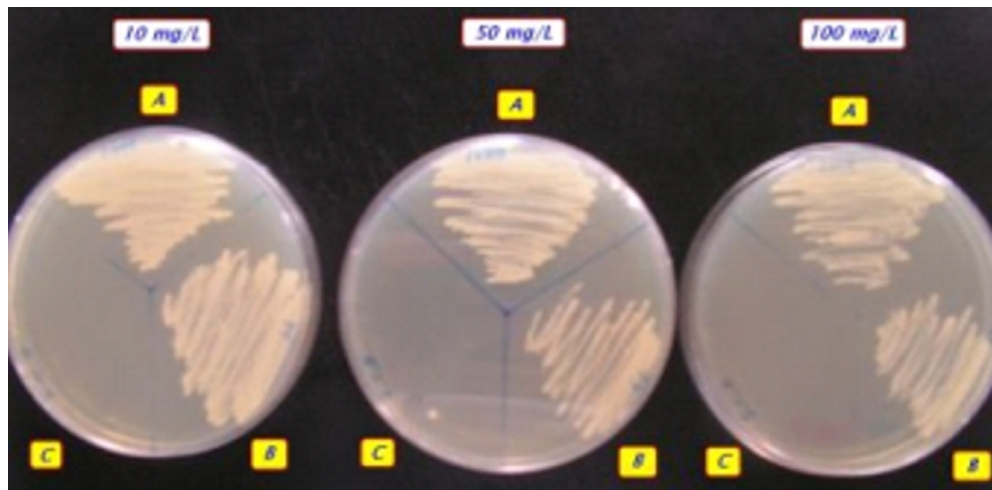
Za brojanje kolonija na krutoj podlozi potrebna je inkubacija od 4 do 5 dana ovisno o soju, što je znatno duže nego za kvasac *S. cerevisiae* (rezultati su vidljivi nakon dva dana). Kvasac *D. bruxellensis* najbolje raste na kompleksnim podlogama (YPD i GYP), a u ovom radu je dalje kao kompleksna podloga korištena podloga GYP.

---



**Slika 4.1.** Mikroskopska slika stanica kvasca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*, nakon uzgoja u tekućoj (A, C i D) i na krutoj kompleksnoj hranjivoj podlozi (B, D i F), pri povećanju od 400 puta. A i B – *D. bruxellensis* (CBS2499); C i D – *D. bruxellensis* (CBS74), E i F – *S. cerevisiae* (BY4741)

Rast sojeva kvasca u prisutnosti antibiotika cikloheksimida provjeren je zbog toga što se ovaj antibiotik uobičajeno koristi za izolaciju kvasaca iz roda *Dekkera*. Naime, za razliku od većine drugih kvasaca *D. bruxellensis* je rezistentan na cikloheksimid. Eksperiment je proveden tako da je po jedna kolonija odgovarajućeg soja kvasca razmazana na kompleksnu hranjivu podlogu s različitim koncentracijama cikloheksimida te su ovako nacijepljene podloge inkubirane pri 28 °C do pojave kolonija (Slika 4.2).



**Slika 4.2.** Usporedni test osjetljivosti kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* na cikloheksimid. Prikazani su rezultati rasta kvasca *D. bruxellensis*, soj CBS2499 (A), *D. bruxellensis*, soj CBS74 (B) i *S. cerevisiae*, soj BY4741 (C) na kompleksnim podlogama s različitim koncentracijama cikloheksimida (10, 50 i 100 mg/L)

Iz rezultata prikazanih na slici 4.2 jasno se vidi da je rast kvasca *S. cerevisiae*, soj BY4741(haploid) zaustavljen već pri koncentraciji cikloheksimida od 10 mg/L, dok oba soja kvasca *D. bruxellensis*

jednako dobro rastu i pri 10 puta većoj koncentraciji što je u skladu sa prijašnjima analizama (Rodrigues i sur., 2000).

Jedan od ciljeva ovog rada bio je transformirati kvasac *D. bruxellensis* pomoću DNA koja sadrži sekvencu *kanMX4* koja je odgovorna za rezistenciju na antibiotik geneticin. Zbog toga je istražen utjecaj koncentracije ovog antibiotika na inhibiciju rasta netransformiranih sojeva kvasca *D. bruxellensis*. Eksperiment je proveden tako da je kvasac uzgojen do stacionarne faze rasta te je 100  $\mu$ L petog decimalnog razrjeđenja nacijepljeno na kompleksne podloge s različitom koncentracijom geneticina. Budući da nakon nacijepljivanja kvasca na podloge sa koncentracijama geneticina od 50 do 400  $\mu$ g/mL nije porasla niti jedna kolonija, ispitana je mogućnost rasta na podlogama koje su sadržavale 10 do 50  $\mu$ g/mL geneticina, a rezultati tog su prikazani u tablici 4.1.

**Tablica 4.1.** Utjecaj koncentracije geneticina u podlozi na rast kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*.

KONCENTRACIJA GENETICINA U KOMPLEKSNOJ PODLOZI ( $\mu$ g/mL)	<i>D. bruxellensis</i>		<i>S. cerevisiae</i>
	CBS2499	CBS74	BY4741
0	75	103	87
10	90	118	101
20	53	41	78
30	40	28	64
40	0	0	0
50	0	0	0

Iz rezultata prikazanih u tablici 4.1 vidi se da je rast oba kvasca potpuno inhibiran pri koncentracijama geneticina iznad 30  $\mu$ g/mL. Budući da je ovdje pokazano da je osjetljivost kvasca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* na geneticin jednaka, slijedi zaključak da će se prilikom selekcije transformanata *D. bruxellensis* moći koristiti ista koncentracija geneticina koja se koristi pri transformaciji kvasca *S. cerevisiae*.

#### 4.1.2. Utjecaj sorbitola i SDS-a na preživljenje kvasca *D. bruxellensis*

U ovom radu razvijena je metoda za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* (poglavlje 4.2.). Rezultati dobiveni tijekom pokušaja da se metoda protoplastiranjem prilagodi za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* (poglavlje 4.2.1.) upućivali su da sorbitol i SDS imaju različito djelovanje na kvasac *S. cerevisiae* i kvasac *D. bruxellensis*. Zbog toga je provedena usporedna analiza djelovanja sorbitola i SDS-a na ove dvije vrste kvasca. Eksperimentalni postupak opisan je u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2., a rezultati su prikazani u tablicama 4.2 i 4.3.

**Tablica 4.2.** Utjecaj sorbitola na preživljenje kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*.

KONCENTRACIJA SORBITOLA (M)	<i>D. bruxellensis</i> (CBS2499)		<i>S. cerevisiae</i> (BY4741)	
	STANICA/mL	PREŽIVLJENJE (%)	STANICA/mL	PREŽIVLJENJE (%)
0,0	$2,35 \times 10^7$	100	$1,16 \times 10^8$	100
0,5	$1,53 \times 10^7$	65,1	$1,4 \times 10^8$	120,7
1,0	$5,45 \times 10^6$	23,1	$1,46 \times 10^8$	125,8

Iz rezultata prikazanih u tablici 4.2 jasno se vidi da s porastom koncentracije sorbitola opada preživljenje stanica kvasca *D. bruxellensis*, te da sorbitol nema negativan utjecaj na preživljenje stanica kvasca *S. cerevisiae*.

Eksperiment ispitivanja utjecaja SDS-a na preživljenje stanica kvasca proveden je tako da su u otopini SDS-a koncentracije 10 g/L pripremljena razrjeđenja stacionarne kulture kvasca, te u određenim vremenskim intervalima nacijepljena na krutu kompleksnu podlogu. Eksperimentalni postupak opisan je u poglavlju 3.2.2., a rezultati su prikazani u tablici 4.3.

**Tablica 4.3.** Utjecaj SDS-a na preživljenje stanica kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*. Prvi redak se odnosi na ukupan broj stanica koje je određen razrjeđivanjem stanica u vodi, te je s obzirom na taj broj određen postotak preživljenja.

VRIJEME (MIN)	<i>D. bruxellensis</i> (CBS2499)		<i>S. cerevisiae</i> (BY 4741)	
	STANICA/mL	PREŽIVLJENJE (%)	STANICA/mL	PREŽIVLJENJE (%)
0	$9,0 \times 10^6$	100	$2,49 \times 10^8$	100
manje od 1	$5,16 \times 10^4$	0,57	$7,45 \times 10^7$	29,9
10	0	0	$1,84 \times 10^7$	7,38
30	0	0	$4,5 \times 10^6$	1,8

Iz rezultata prikazanih u tablici 4.3 očito je da su stanice kvasca *D. bruxellensis* znatno osjetljivije na djelovanje SDS-a od stanica kvasca *S. cerevisiae*.

#### 4.1.3. Procjena ploediteta kvasca *D. bruxellensis*

Jedna od metoda koja se koristi za utvrđivanje da li je neki soj kvasca haploid ili diploid osniva se na određivanju udjela stanica koje porastu na podlozi sa kanavaninom. Kanavanin je aminokiselina koja je jako slična argininu, ali ako se ugradi u polipeptidni lanac zaustavlja daljnju sintezu proteina i uzrokuje smrt stanice. Zbog sličnosti s argininom, kanavanin u stanicu ulazi zahvaljujući arginin-permeazi za koju kodira kvašćev gen *CAN1* pa na podlozi s kanavaninom mogu rasti samo one stanice koje nemaju funkcionalni gen *CAN1*, odnosno stanice koje su zbog mutacije u ovom genu izgubile aktivnost arginin-permeaze. Određivanje, odnosno procjena ploediteta ovom metodom osniva se na pretpostavci da je vjerojatnost da će stanice rasti na podlozi s kanavaninom to manja

što stanice imaju veći broj kopija gena *CAN1* jer se s povećanjem broja kopija ovog gena smanjuje vjerojatnost da će stanica izgubiti aktivnost arginin-permeaze.

Metoda koja je korištena za procjenu ploiditeta kvasca *D. bruxellensis* opisana je u poglavlju 3.2.3. Istom postupku podvrgnuta su dva soja kvasca *D. bruxellensis* i dva standardna soja kvasca *S. cerevisiae* od kojih je jedan haploid (soj BY4741), a drugi diploid (soj BY4743). Rezultati dva neovisna eksperimenta prikazana su u tablici 4.4.

**Tablica 4.4.** Učestalost pojave stanica rezistentnih na kanavanin (*can<sup>R</sup>*). Objašnjenje je u tekstu.

KVASAC	1. EKSPERIMENT		2. EKSPERIMENT	
	BROJ KOLONIJA	UČESTALOST <i>can<sup>R</sup></i>	BROJ KOLONIJA	UČESTALOST <i>can<sup>R</sup></i>
<i>S. cerevisiae</i> (haploid)	49	$1,58 \times 10^{-6}$	29	$1,47 \times 10^{-6}$
<i>S. cerevisiae</i> (diploid)	0	$< 4,03 \times 10^{-8}$	0	$< 2,66 \times 10^{-9}$
<i>D. bruxellensis</i> (CBS2499)	0	$< 6,75 \times 10^{-8}$	0	$< 1,21 \times 10^{-8}$
<i>D. bruxellensis</i> (CBS74)	0	$< 2,09 \times 10^{-8}$	0	$< 3,68 \times 10^{-9}$

Učestalost pojave stanica koje mogu rasti na podlozi s kanavaninom izračunata je u odnosu na ukupni broj stanica koji je izračunat na temelju broja kolonija izraslih na podlozi bez kanavanina. U slučajevima kad na podlozi s kanavaninom nije porasla niti jedna kolonija može se pretpostaviti da je učestalost pojave stanica rezistentnih na kanavanin manja od 1/ukupni broj stanica.

U skladu s očekivanjima, iz rezultata prikazanih u tablici 4.4, vidi se da su u slučaju kvasca *S. cerevisiae* na podlozi s kanavaninom porasle samo stanice haploidnog soja. Činjenica da na podlozi s kanavaninom nije porasla niti jedna kolonija sojeva kvasca *D. bruxellensis* upućuje na zaključak da oba soja ovog kvasca imaju najmanje dva gena koji omogućuju ulazak kanavanina u stanicu. Razlog tome može biti da su oba soja diploidi ili da su disomični za odgovarajući kromosom. Osim toga moguće je da je ovaj gen u kvascu *D. bruxellensis* dupliciran kao i da u genomu ovog kvasca postoji više različitih gena koji kodiraju za arginin-permeazu i omogućuju ulazak kanavanina u kvašćevu stanicu.

#### 4.1.4. Izolacija mutanata s inaktiviranim genom *URA3*

U svrhu primjene metoda genetičkog inženjerstva i karakterizacije nekog mikroorganizma poželjno je izolirati auktotrofne mutante. U ovom radu izolirani su mutanti kvasca *D. bruxellensis* koji imaju inaktiviran gen *URA3* (jedan od gena biosintetskog puta za sintezu uracila) i to zahvaljujući

svojstvu 5-fluoroorotične kiseline (5-FOA) da inhibira diobu stanica koje imaju funkcionalni gen *URA3* (Boeke i sur., 1984).

Na podlogu sa 5-FOA naciepljene su stanice nakon uzgoja u tekućoj kompleksnoj podlozi, ali i kolonije izrasle nakon ozračivanja UV-svjetlom. Kolonije izrasle na podlozi sa 5-FOA kasnije su dodatno provjerene naciepljivanjem na kemijski definirane podloge: minimalna, minimalna sa uracilom, kompletna i kompletna bez uracila (sastav podloga opisan u poglavlju 3.1.4.2.). Rezultati te dodatne provjere prikazani su u tablici 4.5.

**Tablica 4.5.** Auksonografska analiza kolonija izraslih na podlozi s 5-FOA.

HRANJIVA PODLOGA	<i>D. bruxellensis</i>	
	SOJ CBS74	SOJ CBS2499
minimalna	-	-
minimalna s uracilom	+	+
kompletna	+	+
kompletna bez uracila	-	-

Rezultati prikazani u tablici 4.5 potvrđuju da dobiveni mutanti zaista imaju nefunkcionalan gen *URA3*, te da njihov rast nije ovisan o preostalim tvarima rasta. Proveden je i eksperiment koji je za cilj imao utvrditi učestalost povratne mutacije. Proveden je na način da su dobiveni mutanti uzgojeni u tekućoj kompleksnoj podlozi, te su stanice izdvojene centrifugiranjem i isprane sa sterilnom destiliranom vodom. Nakon toga suspenzija stanica je naciepljena na kompletnu sintetsku podlogu bez uracila te na kompleksnu podlogu za određivanje ukupnog broja. Budući da na podlozi bez uracila nije porasla niti jedna kolonija može se zaključiti da je učestalost povratne mutacije manja od  $1,4 \times 10^{-8}$  (tj. od recipročne vrijednosti ukupnog broja stanica po mililitru).

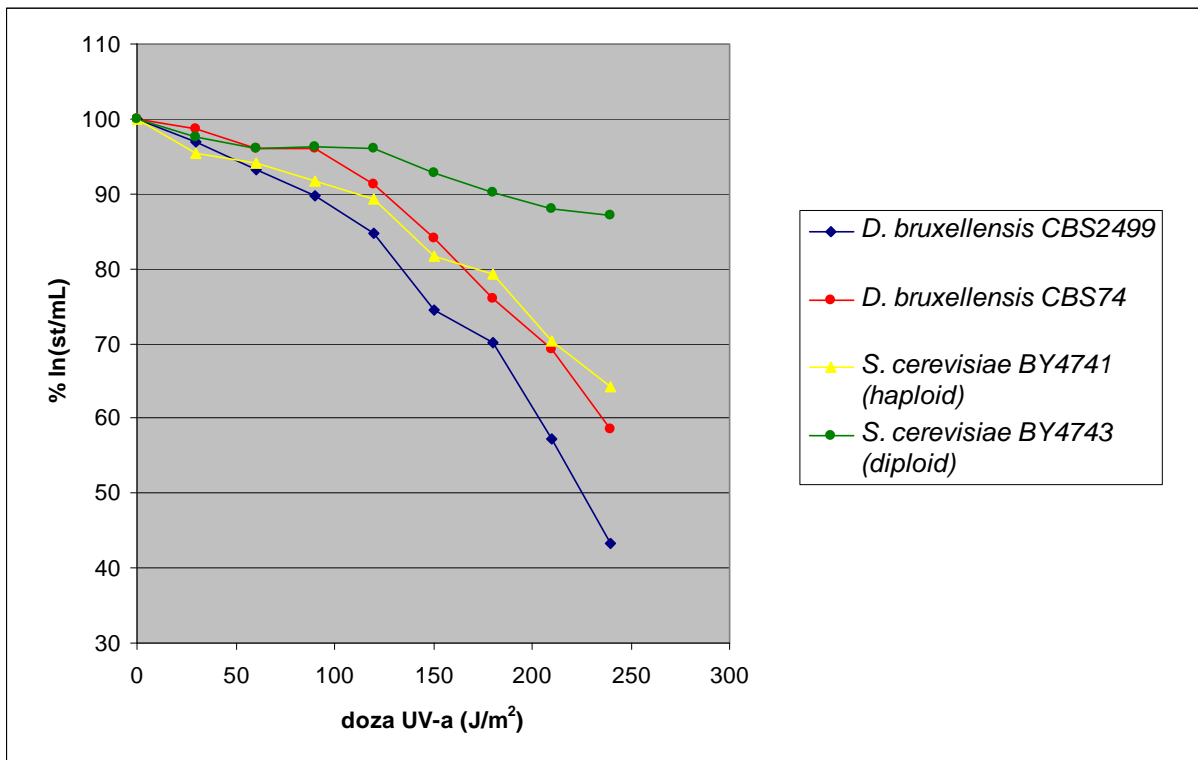
#### 4.1.5. Utjecaj UV-svjetla na rast kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*

Sposobnost popravka oštećenja DNA nastalih djelovanja ultraljubičastog svjetla vrlo je bitna karakteristika koja daje uvid u genetička svojstva određenog mikroorganizma. Stoga je u ovom radu istražena osjetljivost kvasca *D. bruxellensis* na djelovanje ultraljubičastog svjetla te je uspoređena sa osjetljivošću haploidnog i diploidnog soja kvasca *S. cerevisiae*. Postupak je opisan u poglavlju 3.2.4.

**Tablica 4.6.** Preživljenje stanica kvasca nakon zračenja ultraljubičastim svjetlom. Preživljenje je izračunato kao srednja vrijednost dvaju eksperimenata.

DOZA UV-SVJETLA (J/m <sup>2</sup> s)	PREŽIVLJENJE (%)			
	<i>D. bruxellensis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	SOJ CBS2499	SOJ CBS74	SOJ BY4741 (HAPLOID)	SOJ BY4743 (DIPLOID)
0	100	100	100	100
30	66,21	83,22	55,8	71,9
60	41,8	59,25	44,5	59,0
90	27,95	44,78	31,55	60,35
120	15,9	30,79	22,55	58,33
150	3,53	10,5	7,95	41,04
180	1,98	3,68	6,0	26,81
210	0,36	1,43	1,78	22,58
240	0,06	0,37	0,82	16,5

Prema očekivanju iz rezultata prikazanih u tablici 4.6 vidi se da velike doze UV-svjetla znatno smanjuju preživljenje svih ispitanih sojeva. Osim toga vidi se da je najslabije preživljenje pri svim dozama UV-svjetla kod soja CBS2499 kvasca *D. bruxellensis*. Međutim kako bi razlike u preživljenju bile bolje vidljive rezultati su prikazani u obliku dijagrama (Slika 4.3).



**Slika 4.3.** Krivulja preživljenja stanica kvasca nakon zračenja utraljubičastim svjetlom.

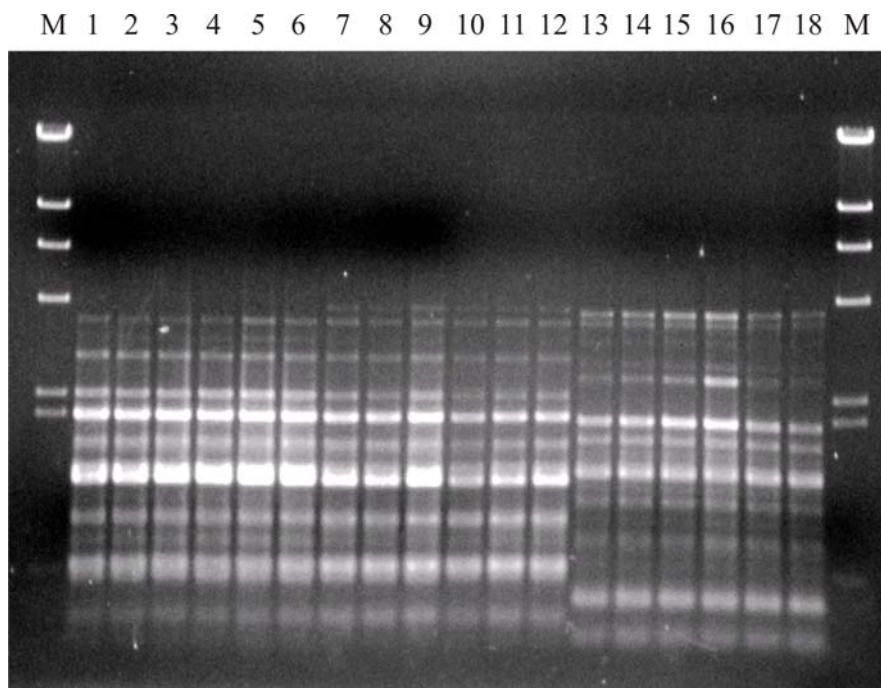
U svrhu grafičkog prikaza rezultata postotak preživljenja izražen je kao postotak logaritma preživjelih stanica. Iz slike 4.3 jasno se vidi kako je preživljenje soja CBS2499 kvasca *D. bruxellensis* najslabije pri svim dozama UV-svjetla, a najotporniji je diploidni soj kvasca *S.*



*cerevisiae*. Krivulje preživljenja soja CBS74 kvasca *D. bruxellensis* i haploidnog soja kvasca *S. cerevisiae* se otprilike podudaraju, a po osjetljivosti na ultraljubičasto svjetlo se nalaze negdje između dva prije spomenuta soja (CBS2499-najosjetljiviji i BY4743-najotporniji).

#### 4.1.6. Usporedna analiza kvasaca *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis* metodom RAPD

Kvasac *D. bruxellensis* je vrlo čest uzročnik kvarenja vina zbog čega je jako važan razvoj brzih metoda za njegovu detekciju. U tu svrhu se u ovom radu je provedena optimizacija uvjeta RAPD metode pri kojima je moguće razlikovati taj kvasac od ostalih vrsta. S ciljem optimizacije uvjeta provedeno je šest eksperimenata, a najbolji rezultati su dobiveni s početnicama RAD17F i RAD17R. Prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.10. analizirano je 18 uzoraka genomske DNA, po šest za svaki soj (*D. bruxellensis*, sojevi CBS74 i 2499, *S. cerevisiae*, soj BY4741), a rezultati analize prikazani su na slici 4.4. Iz rezultata očito je da se pri ovim uvjetima metode RAPD jednostavno mogu razlikovati kvasci *Dekkera bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiae*, međutim, ova metoda može se koristiti i za razlikovanje sojeva unutar vrste *D. bruxellensis*. Pažljivijom usporedbom rezultata (Slika 4.4) može se primijetiti da se u svim uzorcima soja CBS74 (uzorci 7-12), pojavljuje jedna vrpca više nego u uzorcima soja CBS2499 (uzorci 1-6). Ova vrpca je slabijeg intenziteta, a nalazi se iznad najveće vrpce koju daje soj CBS2499.



**Slika 4.4.** Usporedna analiza kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* metodom RAPD. M – DNA bakteriofaga lambda pocijepana restrikcijom endonukleazom *Hind*III; 1-6: *D. bruxellensis* (soj CBS2499); 7-12: *D. bruxellensis* (soj CBS74); 13-18: *S. cerevisiae* (soj BY4741)

---

## 4.2. RAZVOJ METODE ZA TRANSFORMACIJU KVASCA *D. bruxellensis*

U ovom poglavlju opisani su eksperimenti koji su provedeni s ciljem razvoja metode za transformaciju kvasca *D. bruxellensis*. U sklopu toga isprobane su dvije metode koje se uspješno koriste za transformaciju kvasca *S. cerevisiae*, a to su metoda protoplastiranjem (poglavlje 4.2.1.) i metoda pomoću litijevog acetata (poglavlje 4.2.2.). U svim eksperimentima korišten je kvasac *D. bruxellensis*, soj CBS2499, koji je i uspješno transformiran metodom pomoću litijevog acetata.

### 4.2.1. Transformacija protoplastiranjem

Ova metoda osniva se na transformaciji protoplasta koji se pripremaju enzimskom razgradnjom stanične stijenke kvasca. U skladu s tim najprije je bilo potrebno utvrditi da li su uvjeti protoplastiranja pri kojima se pripremaju protoplasti kvasca *S. cerevisiae* pogodni i za pripremu protoplasta kvasca *D. bruxellensis*. U prvom redu to je koncentracija sorbitola koji se koristi kao izotonična otopina za održavanje protoplasta, te aktivnost zimolijaze koja se koristi za razgradnju stanične stijenke.

#### 4.2.1.1. Uspješnost protoplastiranja

Prvi eksperiment protoplastiranja kvasca *D. bruxellensis* (soj CBS2499) proveden je kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.2. Nakon 40 minuta djelovanja zimolijaze pripremljena razrjeđenja otopine protoplasta u vodi odnosno 1 M sorbitolu nacijepljena su u regeneracijski agar u svrhu praćenja regeneracije protoplasta. Nakon 5 dana inkubacije izbrojane su porasle kolonije. Broj kolonija iznosio je 3831 (suspenzija protoplasta razrijeđena u vodi) odnosno 2411 (suspenzija protoplasta razrijeđena u 1 M sorbitolu).

Pretpostavka je bila da protoplasti razrijeđeni u vodi neće preživjeti, dok će oni razrijeđeni u sorbitolu preživjeti. Prema tome, ovi rezultati su neočekivani i upućuju na to da 1 M sorbitol ima negativan utjecaj na preživljenje protoplasta kvasca *D. bruxellensis*.

Zbog toga je sljedeći eksperiment proveden isto kao prethodni, ali su stanice umjesto u 1 M sorbitolu ispirane u sterilnoj destiliranoj vodi, te su korištene različite koncentracije sorbitola kako pri protoplastiranju zimoliazom, tako i kod pripreme razrjeđenja i regeneracijskog agara. Razrjeđenja su pripremljena nakon 15, 30, 45 i 70 minuta djelovanja zimolijaze, te su nacijepljena u regeneracijski agar s odgovarajućom koncentracijom sorbitola, a rezultati su prikazani u tablici 4.7.

---

**Tablica 4.7.** Preživljenje stanica kvasca *D. bruxellensis* (soj CBS2499) tijekom protoplastiranja u različitim koncentracijama sorbitola ovisno o vremenu djelovanja zimolijaze i koncentraciji sorbitola. Prikazan je broj poraslih kolonija i postotak preživljenja u odnosu na ukupni broj stanica.

VRIJEME DJELOVANJA ZIMOLIAZE (MIN)	KONCENTRACIJA SORBITOLA			
	0 M	0,5 M	1 M	2 M
15	1936 (35,9 %)	8512 (157,6 %)	108 (2 %)	0
30	2136 (39,6 %)	2185 (40,5 %)	32 (0,59 %)	0
45	3014 (55,8 %)	1302 (24,1 %)	33 (0,61 %)	0
70	2210 (40,9 %)	659 (12,2 %)	16 (0,3 %)	0

Rezultati prikazani u tablici 4.7 potvrđuju pretpostavku da 1 M sorbitol ima negativan utjecaj na preživljenje protoplasta kvasca *D. bruxellensis*, pa je u sljedećim eksperimentima istražen i njegov utjecaj na neprotoplastirane stanice (Tablica 4.8). Osim toga, rezultati upućuju na to da je koncentracija sorbitola možda bitna i za djelovanje zimolijaze, zbog čega je istražen i utjecaj sorbitola na aktivnost tog enzima (poglavlje 4.2.1.2.).

#### 4.2.1.2. Utjecaj koncentracije sorbitola na preživljenje stanica kvasca i aktivnost zimolijaze

Sorbitol je šećerni alkohol koji se koristi za održavanje protoplasta prilikom provođenja transformacije protoplastiranjem. Budući da je uloga osmotskog stabilizatora veoma bitna za navedenu metodu provedeni su dodatni eksperimenti u kojima je istražen utjecaj sorbitola na preživljenje stanica kvasca *D. bruxellensis* te na aktivnost zimolijaze. U tu svrhu razrjeđenja stacionarne kulture kvasca *D. bruxellensis* (soj CBS2499) i *S cerevisiae* (BY4741) su naciijepljena na površinu krute hranjive podloge i u regeneracijski agar sa različitim koncentracijama sorbitola (postupak opisan u poglavlju 3.2.1.). Rezultati dvaju neovisnih eksperimenata su prikazani u tablici 4.8.

**Tablica 4.8.** Preživljenje stanica kvasaca *D. bruxellensis*, soj CBS2499 i *S. cerevisiae*, soj BY4741 u regeneracijskom agaru sa različitim koncentracijama sorbitola. Kvasci su naciepljeni na površinu GYP podloge i u krute podloge temperirane na 42 °C, nakon čega su podloge izliveno u Petrijeve zdjelice.

NACJEPLJIVANJE (KONCENTRACIJA SORBITOLA)	PREŽIVLJENJE (%)			
	<i>D. bruxellensis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	1. EKSPERIMENT	2. EKSPERIMENT	1. EKSPERIMENT	2. EKSPERIMENT
Na GYP (0 M)	100	100	100	100
U GYP (0 M)	86,4	112	60,14	55,6
Regeneracijski agar (0 M)	86,6	99,3	68,2	66,8
Regeneracijski agar (0,5 M)	65	84,9	63,8	62,1
Regeneracijski agar (1 M)	12,3	2,5	57,4	44,8

Iz rezultata prikazanih u tablici 4.8 jasno se vidi da 1 M sorbitol negativno djeluje na rast stanica kvasca *D. bruxellensis* čak i kada one nisu protoplastirane, dok se kod kvasca *S. cerevisiae* taj utjecaj ne vidi. Osim toga iz rezultata se vidi smanjenje preživljenja kod kvasca *S. cerevisiae* ukoliko su stanice naciepljene u podlogu temperiranu na 42 °C, što upućuje na to da je kvasac *S. cerevisiae* možda osjetljiviji na povišenu temperaturu od *D. bruxellensis*. Primijećen je sporiji rast stanica oba kvasca u regeneracijskom agaru sa 1 M sorbitolom.

Osim utjecaja koncentracije sorbitola na rast stanica ispitan je i njegov utjecaj na aktivnost zimolijaze (postupak opisan u poglavlju 3.2.1.). Za analizu je korišten kvasac *S. cerevisiae*, soj BY4741. Praćeno je razbistravanje otopine nakon miješanja suspenzije stanica i SDS-a (Tablica 4.9).

**Tablica 4.9.** Aktivnost zimolijaze u ovisnosti o koncentraciji sorbitola. Aktivnost zimolijaze prati se razbistravanjem otopine nakon dodatka otopine SDS-a pa je izostanak razbistravanja označen s "-", djelomično razbistravanje s "+/-", a potpuno razbistravanje s "+".

KONCENTRACIJA SORBITOLA (M)	VRIJEME (MIN)				
	5	10	20	40	60
0,0	-	-	-	-	-
0,2	-	-	-	-	-
0,4	-	-	-	-	+/-
0,5	-	-	-	+/-	+
0,75	-	-	+/-	+	+

Rezultati prikazani u tablici 4.9 upućuju da aktivnost zimolijaze, odnosno uspješnost protoplastiranja raste s porastom koncentracije sorbitola. Međutim primijećeno je da je otopina sa 0,75 M sorbitolom bistrija od ostalih i prije miješanja s otopinom SDS-a.

Na temelju rezultata prikazanih u ovom poglavlju može se zaključiti da metoda protoplastiranjem, uz korištenje sorbitola kao osmotskog stabilizatora, nije pogodna za transformaciju kvasca *D.*

*bruxellensis*. Naime, čini se da je protoplastiranje uspješnije pri većim koncentracijama sorbitola, koje inhibiraju rast ovog kvasca. Međutim, kvasac *D. bruxellensis* u ovom je radu uspješno transformiran metodom pomoću litijeveg acetata (poglavlje 4.2.2.).

#### 4.2.2. Transformacija pomoću litijeveg acetata

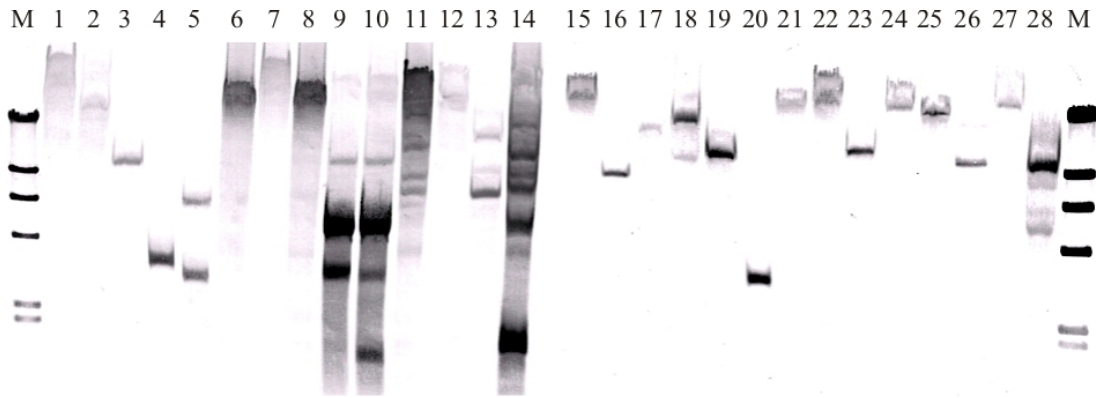
Budući da nisu pronađeni pogodni uvjeti za provođenje transformacije kvasca *D. bruxellensis* protoplastiranjem, isprobana je druga metoda koja se standardno koristi za transformaciju kvasca *S. cerevisiae*. Ova metoda osniva se na povećanju propusnosti stanične membrane tretiranjem stanica otopinom litijeveg acetata. Transformacija kvasca *D. bruxellensis* provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5.1., a za transformaciju je korištena DNA plazmida pDMS+ (opisan u poglavlju 3.1.2.) u jednolančanom i dvolančanom obliku te fragment DNA umnožen lančanom reakcijom polimeraze (priprema DNA za transformaciju opisana je u poglavlju 4.3.). Transformanti su selekcionirani na podlozi GYP koja je sadržavala 150 µg/mL antibiotika geneticina, a rezultati transformacije prikazani su u u tablici 4.10.

**Tablica 4.10.** Rezultati transformacije kvasca *D. bruxellensis*. Kvasac je transformiran s plazmidom pDMS+ pocijepanim endonukleazama *XhoI* i *SalI* (pDMS/XS), plazmidom pDMS+ pocijepanim endonukleazom *XhoI* (pDMS/X), plazmidom pDMS+ u jednolančanom obliku (sspDMS) te sekvencom *mre11::kanMX4* koja je umnožena lančanom reakcijom polimerazom.

TRANSFORMIRAJUĆA DNA	BROJ TRANSFORMANATA
pDMS/XS*	34
pDMS/XS	1
pDMS/X*	0
pDMS/X	0
sspDMS*	0
sspDMS	0
<i>mre11::kanMX4</i> *	1
<i>mre11::kanMX4</i>	0

\*uzorci DNA u koje je dodan DNA nosač

Iz rezultata prikazanih u tablici 4.10 vidi se da je najveća uspješnost transformacije kvasca postiguta s plazmidom pDMS+ pocijepanim endonukleazama *XhoI* i *SalI* i to uz dodatak DNA nosača. Kolonije transformanata rasle su i na podlozi koja je sadržavala 200 µg/mL geneticina, te su podvrgnute molekularnoj analizi metodom po Southern-u. Postupak je proveden kao što je to opisano u poglavlju 3.2.7. s tim da je za cijepanje genomske DNA korištena endonukleaza *XhoI*, a kao neradioaktivno označena sonda korištena je sekvenca *kanMX4* koja hibridizira samo s DNA koja je korištena za transformaciju. Rezultati molekularne analize prikazani su na slici 4.5.

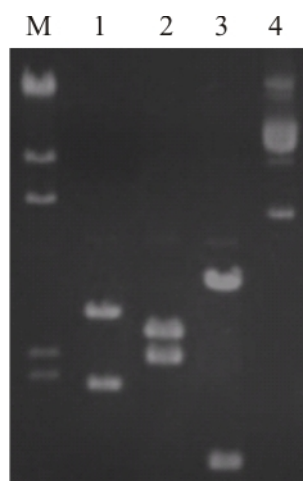


**Slika 4.5.** Rezultati molekularne analize transformanata. Prikazani su rezultati analize 28 kolonija koje su izrasle na podlozi za selekciju transformanata. (M: DNA bakteriofaga lambda pocijepana restrikcijском endonukleazom *HindIII*).

Na temelju rezultata molekularne analize može se tvrditi da stanice izrasle na podlozi za selekciju transformanata zaista sadrže transformirajuću DNA, odnosno da je kvasac *D. bruxellensis* (soj CBS2499) uspješno transformiran metodom pomoću litijevog acetata.

#### 4.3. PRIPREMA DNA ZA TRANSFORMACIJU

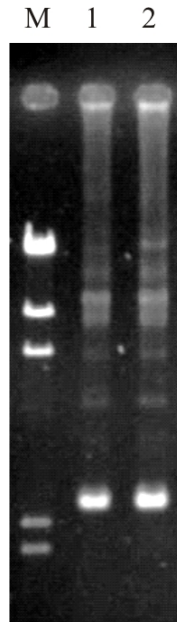
Za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* korištena je DNA plazmida pDMS+ u jednolančanom i dvolančanom obliku, te sekvenca *mre11::kanMX4* umnožena lančanom reakcijom polimerazom (poglavlje 4.2.2., Tablica 4.10). Plazmid pDMS+ izoliran je u dvolančanom obliku (poglavlje 3.2.8.3.) te je pocijepan odgovarajućim restrikcijским enzimima kako u svrhu pripreme DNA za transformaciju kvasca tako i u svrhu provjere njegove strukture. Iz rezultata prikazanih na slici slici 4.6 vidi se da struktura plazmida pDMS+ odgovara onoj prikazanoj u poglavlju 3.1.2.



**Slika 4.6.** Provjera strukture plazmida pDMS+. M: DNA bakteriofaga lambda pocijepana restrikcijском endonukleazom *HindIII*; 1: plazmid pDMS+ pocijepan endonukleazama *XhoI* i *SalI*; 2: plazmid pDMS+ pocijepan endonukleazom *ScaI*; 3: plazmid pDMS+ pocijepan endonukleazom *HindIII*; 4: nepocijepani (kružni) plazmid pDMS+.

Cijepanjem ovog plazmida restrikcijskim enzimima *XhoI* i *SalI* u svrhu pripreme DNA za transformaciju nastaje linearni fragment duljine 1903 pb koji na svojim krajevima sadrži 3'- i 5'-krajeve gena *MRE11* između kojih se nalazi sekvenca *kanMX4*.

Plazmid pDMS+ izoliran je u jednolančanom obliku prema protokolu koji je opisan u poglavlju 3.2.8.4., a uspješnost izolacije provjerena je gel-elektroforezom (slika 4.7).



**Slika 4.7.** Rezultati elektroforeze jednolančanog plazmida pDMS+ tretiranog endonukleazom *XhoI* (1) i jednolančanog plazmida pDMS+ koji nije tretiran endonukleazom (2). Objašnjenje se nalazi u tekstu.

Rezultati prikazani na slici 4.7 potvrđuju uspješnost izolacije jednolančane DNA jer tretiranje uzorka s *XhoI* koji cijepa samo dvolančanu DNA neznatno utječe na rezultat elektroforeze izoliranog plazmida. Na temelju toga može se reći da izolirani plazmid sadrži neznatnu količinu plazmida u dvolančanom obliku.

Sekvenca *mre11::kanMX4* umnožena je lančanom reakcijom polimerazom (poglavlje 3.2.10), a uspješnost umnažanja potvrđena je gel-elektroforezom (slika 4.8).

M 1



**Slika 4.8.** Provjera uspješnosti sinteze sekvence *mrel1::kanMX4* lančanom reakcijom polimerazom. M: DNA bakteriofaga lambda pocijepana endonukleazom *HindIII*; 1 sekvenca *mrel1::kanMX4* umnožena lančanom reakcijom polimerazom.



---

## 5. RASPRAVA

Kvasac *D. bruxellensis* je mikroorganizam koji ima sve značajniju ulogu biotehnologiji. Najpoznatiji je kao opasan uzročnik kvarenja vina koji uzrokuje velike ekonomske gubitke u vinarskoj industriji, ali posljednjih godina prepoznat je i kao potencijalni proizvodni organizam u industrijskoj proizvodnji bioetanolu i octene kiseline. U prilog važnosti ovog kvasca govori i činjenica da je u tijeku projekt sekvencioniranja njegovog genoma, ali još uvijek je nedovoljno genetički karakteriziran jer je većina istraživanja usmjerena samo na razvoj metoda za brzu detekciju ovog kvasca u moštu i vinu.

Upravo zbog velike važnosti kvasca *D. bruxellensis* u biotehnologiji s jedne strane i činjenice da je nedovoljno genetički karakteriziran, cilj ovog rada bio je provesti genetičku karakterizaciju i razviti metodu za transformaciju kvasca *D. bruxellensis*. U tu svrhu provedeni su neki jednostavni eksperimenti kao što je provjera rasta na standardnim laboratorijskim podlogama i osjetljivost na neke antibiotike. Zahvaljujući tome izolirani su auksotrofni mutanti i provedeni testovi procjene ploediteta. Osim toga proveden je niz usporednih testova kvasca *Dekkera bruxellensis* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao što su analiza genoma metodom RAPD i izrada krivulje preživljenja nakon zračenja ultraljubičastim svjetlom. S ciljem razvoja metode za transformaciju ovog kvasca isprobane su dvije metode koje se standardno koriste za transformaciju kvasca *S. cerevisiae*. Metoda protoplastiranjem pokazala se nepogodnom za transformaciju ovog kvasca ali su rezultati provedenih eksperimenata uputili na vrlo interesantne razlike između kvasca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*. Međutim, metoda transformacije korištenjem litijeveg acetata pokazala se uspješnom, a to je potvrđeno i molekularnom analizom transformanata.

U sklopu provjere rasta na laboratorijskim podlogama pokazano je da kvasac *D. bruxellensis*, osim na kompleksnim, dobro raste i na minimalnim kemijski definiranim podlogama na kojima rastu i prototrofi kvasca *S. cerevisiae*. Osim toga, ustanovljeno je da kvasac *D. bruxellensis*, jednako kao i divlji sojevi kvasca *S. cerevisiae*, ne raste na podlozi s 5-fluoroorotičnom kiselinom i pa su uspješno izolirani mutanti s nefunkcionalnim genom *URA3* (objašnjeno u poglavlju 4.1.4.). Također, jednako kao i divlji sojevi *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* ne raste ni na podlozi sa kanavaninom pa je bilo moguće provesti i usporedni test procjene ploediteta (objašnjeno u poglavlju 4.1.3.). U skladu s prethodnim rezultatima (Rodrigues i sur., 2001) potvrđeno je da su oba istraživana soja kvasca *D. bruxellensis* (CBS2499 i CBS74) rezistentna na antibiotik cikloheksimid (poglavlje 4.1.1., slika 4.2), ali je određena i minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika geneticina te je pokazano da obje vrste kvasca (*D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*) pokazuju jednaku osjetljivost na ovaj antibiotik

---

---

(poglavlje 4.1.1., tablica 4.1). Na temelju ovog rezultata odlučeno je da će se tijekom transformacije, za selekciju transformanata kvasca *D. bruxellensis* koristiti ista koncentracija geneticina koja se koristi pri transformaciji kvasca *S. cerevisiae*, a to je 150 do 200 µg/mL (Gietz i Woods, 1994).

Većina istraživanja koja se provodi na kvascu *D. bruxellensis* usmjerena je prema razvoju brzih metoda za njegovu detekciju. U ovom radu provedena je optimizacija metode RAPD te je provedena usporedna analiza kojom se jasno razlikuju različite vrste kvasaca (*D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*), ali je moguće razlikovati i dva različita soja kvasaca *D. bruxellensis* (poglavlje 4.1.6., slika 4.4). Karakteristike dvaju analiziranih sojeva kvasca *D. bruxellensis* dane su u poglavlju 3.1.1.2.

Pretraživanjem znanstvene literature ustanovljeno je da do sada nije objavljeno niti jedno istraživanje mehanizama popravka DNA u kvascu *D. bruxellensis*, a upravo na tome bi se mogle osnivati metode za suzbijanje kontaminacije vina ovim mikroorganizmom. Zbog toga je u ovom radu izrađena krivulja preživljenja dva soja kvasca *D. bruxellensis* i dva standardna laboratorijska soja kvasca *S. cerevisiae* od kojih je jedan diploid, a drugi haploid (poglavlje 4.1.5.). Iz rezultata prikazanih na slici 4.3 vidi se da je, u skladu s očekivanjem haploidni soj kvasca *S. cerevisiae* znatno osjetljiviji od diploidnog soja. Osim toga vidi se da je soj kvasca *D. bruxellensis*, soj CBS2499 osjetljiviji od soja CBS74 što je također u skladu s očekivanjima jer se pretpostavlja da je soj CBS2499 haploid (Woolfit i sur., 2007) dok bi soj CBS74 mogao biti potpuni ili djelomični diploid. Međutim, interesantno je da soj CBS74 pokazuje osjetljivost kao haploidni soj kvasca *S. cerevisiae*, a soj CBS2499 je još osjetljiviji. Ovi rezultati mogli bi se objasniti najmanje na dva načina. Jedna je mogućnost da *D. bruxellensis* ima manje uspješan popravak pirimidinskih dimera (najčešće oštećenje DNA koje nastaje djelovanjem ultraljubičastog svjetla) mehanizmima koji su specifični za popravak ovog oštećenja (enzimska fotoreaktivacija i nukleotidni ekscizijski popravak). Drugi razlog zbog kojeg je kvasac *D. bruxellensis* osjetljiviji na ultraljubičasto zračenje može biti manje uspješan popravak DNA homolognom rekombinacijom koji se može koristiti kao alternativni način popravka pirimidinskih dimera, a posebno dolazi do izražaja pri velikim dozama zračenja jer kao posljedica nukleotidnog ekscizijskog popravka u molekuli DNA mogu nastati dvolančani lomovi. U skladu s drugim objašnjenjem, poznato je da se dvolančani lomovi DNA u kvascu *S. cerevisiae* gotovo uvijek i jako uspješno popravljaju homolognom rekombinacijom (Li i Hayer, 2008), dok u literaturi nema nikakvih podataka o mehanizmima popravka DNA u kvascu *D. bruxellensis*. Međutim iz rezultata analize transformanata koja je provedena u ovom radu očito je da se dvolančani lomovi u kvascu *D. bruxellensis*, vrlo rijetko ili možda uopće ne popravljaju homolognom rekombinacijom (objašnjeno u daljnjem tekstu).

---

---

Pregledom znanstvene literature ustanovljeno je da do sad nije opisana transformacija, odnosno unošenje DNA u stanicu kvasca *D. bruxellensis* koja rezultira promjenom genotipa i fenotipa transformirane stanice, a upravo to je neizostavan korak u genetičkoj karakterizaciji i primjeni metoda genetičkog inženjerstva u svrhu konstrukcije proizvodnih sojeva mikroorganizama. S ciljem razvoja metode za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* isprobana je metoda protoplastiranjem i metoda pomoću litijeveg acetata. Metoda transformacije protoplastiranjem, korištenjem sorbitola kao osmotskog stabilizatora pokazala se neprikladnom za transformaciju kvasca *D. bruxellensis* (poglavlje 4.2.1.), ali rezultati eksperimenata dobiveni tijekom pokušaja optimizacije ove metode uputili su na interesantne razlike u svojstvima kvasca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae*. Naime, primijećeno je da je kvasac *D. bruxellensis* znatno osjetljiviji na prisutnost sorbitola (poglavlje 4.2.1.2., tablica 4.8) i SDS-a. Osjetljivost kvasca *D. bruxellensis* na 1 M sorbitol, koji se inače koristi kao izotonična otopina za protoplastirane stanice kvasca *S. cerevisiae*, može upućivati na to da je osmotski tlak u stanici kvasca *D. bruxellensis* manji nego u stanici kvasca *S. cerevisiae*. Naravno, moguće je i da je inhibicija diobe stanica sorbitolom posljedica nekog drugog fiziološkog mehanizma. Međutim povećana osjetljivost stanica kvasca *D. bruxellensis* na SDS može se objasniti povećanom propusnošću, a možda i smanjenom čvrstoćom stanične stijenke što bi mogla biti i posljedica manjeg osmotskog tlaka unutar stanice. Ovi rezultati, kao i činjenica da je kvasac *D. bruxellensis* nešto osjetljiviji na ultraljubičasto zračenje, mogli bi poslužiti kao osnova za razvoj metoda za suzbijanje kontaminacije kvascem *D. bruxellensis*.

U ovom radu, kvasac *D. bruxellensis* uspješno je transformiran metodom pomoću litijeveg acetata (poglavlje 4.2.2.). Pri tome je u stanicu kvasca unešena DNA na kojoj se nalazi sekvenca (*kanMX4*) odgovorna za rezistenciju na antibiotik geneticin pa su transformanti selekcionirani na kompleksnim podlogama koje su sadržavale taj antibiotik. Uspješnost transformacije potvrđena je molekularnom analizom transformanata metodom po Southern-u. Ova metoda osniva se na elektroforezi cjelokupnog genoma istraživnog organizma koji je prethodno pocijepan nekom restriksijskom endonukleazom. Nakon toga se DNA iz agaroznog gela prenosi i pričvršćuje na membranu. Posljednji korak omogućuje pronalaženje, odnosno vizualizaciju položaja određene sekvence DNA na membrani, a to se postiže hibridizacijom s odgovarajućom komplementarnom DNA (odnosno sondom čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.10.). U svrhu analize transformanata provedene u ovom radu kao sonda je korištena upravo sekvenca *kanMX4* koja je i korištena za transformaciju.

---

Rezultati molekularne analize transformanata (slika 4.5) potvrđuju uspješnost transformacije, odnosno dokazuju prisutnost transformirajuće DNA u stanicama koje su selekcionirane na podlozi sa genetinom. Osim toga, na temelju ove analize može se donijeti zaključak i o mehanizmu ugradnje transformirajuće DNA u genom transformirane stanice. Naime kada se transformirajuća DNA u genom ugrađuje homolognom rekombinacijom tada se ona uvijek ugrađuje u isto mjesto kvašćevog genoma pa svi transformanti pokazuju isti ili jako sličan signal. Međutim, iz rezultata analize transformanata kvasca *D. bruxellensis* očito je da gotovo svi transformanti daju različiti signal što jasno upućuje na zaključak da se transformirajuća DNA u ovom kvascu ugrađuje ilegitimnom (nehomolognom rekombinacijom). U skladu s tim može se zaključiti i da se popravak dvolančanog loma u DNA u kvascu *D. bruxellensis* također popravljiva ilegitimnom rekombinacijom.

---

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Metoda protoplastiranjem, koja se koristi za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uz upotrebu sorbitola kao osmotskog stabilizatora, nije pogodna za transformaciju kvasca *Dekkera bruxellensis*.
  2. Metoda pomoću litijevog acetata pogodna je za transformaciju kvasca *Dekkera bruxellensis* ugradnjom transformirajuće DNA u njegov genom pri čemu se transformanti mogu selekcionirati na podlozi s geneticinom.
  3. Dvolančani loma u molekuli DNA, u kvascu *Dekkera bruxelensis* najvjerojatnije se popravljaju ilegalnim, a ne homolognom rekombinacijom
-

## 7. ZAHVALE

Posebno bih se željela zahvaliti svom mentoru doc. dr. Ivanu-Krešimiru Svetecu koji me naučio kako kritički prosuđivati činjenice, te kako isplanirati i provesti eksperimente. Osim toga, zahvalila bih mu se na strpljenju i odgovorima na moja brojna pitanja, korisnim savjetima i velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Također se zahvaljujem profesoru Zoranu Zgagi koji mi je omogućio da sudjelujem u ovom istraživanju i vidim kako izgleda baviti se znanstvenim radom, dipl. ing. Anamariji Štafi na pomoći prilikom obavljanja eksperimenata, dipl. ing Berislavu Lisniću te svim ostalim zaposlenicima laboratorija na korisnim savjetima i na prijateljskom raspoloženju.

---

---

## 8. POPIS LITERATURE

- Boeke, J.D., LaCrute, F., Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-346.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F. (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**: 139-147.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2003) Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* **20**: 377-384.
- Egli, C.M., Henick-Kling, T. (2001) Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) region. *Am. J. Enol. Viticult.* **52**: 241-247.
- Freer, S.N., Dien, B., Matsuda, S. (2003) Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World J. Microb. Biot.* **19**: 101-105.
- Fugelsang, K.C. (1997) Wine microbiology. Chapman and Hall, New York, NY.
- Gietz, R.D., Woods, R.A. (1994) High efficiency transformation with lithium acetate. U: Molecular Genetics of Yeast, A Practical Approach (Johnston, J.R., ured.) IRL press, Oxford, UK, str. 121-134.
- Gjuračić, K., Zgaga, Z. (1996) Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 173-81.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J. (1996) Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry wines by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 998-1003.
- Li X., Heyer, W.D. (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18(1):99-113**.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
-

- 
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A. (2006) Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1208-1219.
- Rodrigues, N., Goncalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2000) Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 588-599.
- Russel, M., Kidd, S., Kelley, M.R. (1986) An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene* 45: 333-338.
- Siurkus, J. (2004) Preliminary molecular biology studies of *Dekkera bruxellensis* yeast. M.Sc. thesis. Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.
- Suarez, R., Suarez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderon, F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chemistry.* **102**: 10-21.
- Winston, F., Chumley, F., Fink, G. R. (1983). Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol.* **101**: 211-228.
- Woolfit, M., Rozpedowska, E., Piškur, J., Wolfe, K. H. (2007) Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell.* **6**: 721–733.
- Zgaga, Z. (1991) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with UV-irradiated single-stranded plasmid. *Mutat. Res.* **263**: 211-215.
-



## 9. SAŽETAK

Ana Bajić

### TRANSFORMACIJA I KARAKTERIZACIJA KVASCA

#### *Dekkera bruxellensis*

Kvasac *Dekkera bruxellensis*, poznat i kao *Brettanomyces bruxellensis*, jedan je od najčešćih uzročnika kvarenja vina širom svijeta, a posljedica su značajni ekonomske gubitci u vinarskoj industriji. Usprkos tome, zanimljiva svojstva (karakteristike, osobine) ovog kvasca mogla bi naći primjenu u industriji, npr. njegova tolerancija na visoke koncentracije etanola mogla bi se iskoristiti u proizvodnji bioetanola. Međutim, unatoč njegovoj sve većoj važnosti kvasac *D. bruxellensis* je slabo genetički karakteriziran i do sada nema podataka u literaturi da je transformiran egzogenom DNA. U ovom radu opisana je prva uspješno provedena transformacija. Uz to, rezultati usporedne analize kvasaca *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* bi mogli poslužiti kao osnova za sprječavanje kontaminacije vina kvascem *D. bruxellensis*.

Ključne riječi: *Dekkera bruxellensis*, transformacija, genetička karakterizacija, kvasac.

---

## 10. SUMMARY

Ana Bajić

### TRANSFORMATION AND CHARACTERIZATION OF THE YEAST *Dekkera bruxellensis*

Yeast *Dekkera bruxellensis*, also known as *Brettanomyces bruxellensis*, is one of the most common causes of wine spoilage worldwide and consequently causes substantial economic losses in the wine industry. Nevertheless, interesting properties of this yeast could be exploited in industry, e.g. its ability to tolerate the high ethanol concentrations could be used in bioethanol production. Despite its arising importance yeast *D. bruxellensis* has been poorly genetically characterized and so far there is no evidence that it was transformed by exogenous DNA. In this study first successful transformation of yeast *Dekkera bruxellensis* is described. Additionally, results obtained by comparative analyses of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* could serve as a basis to combat wine spoilage by *D. bruxellensis*.

Key words: *Dekkera bruxellensis*, transformation, genetic characterization, yeast.

---