

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Saša JANDRIĆ

**OKSIGENAZNA AKTIVNOST METAGENOMSKIH  
KLONOV IN STATISTIČNA ANALIZA  
PARAMETROV USPEŠNOSTI EKSPRESIJE  
OBSTOJEČIH METAGENOMSKIH KNJIŽNIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Saša JANDRIĆ

**OKSIGENAZNA AKTIVNOST METAGENOMSKIH KLONOV IN  
STATISTIČNA ANALIZA PARAMETROV USPEŠNOSTI  
EKSPRESIJE OBSTOJEČIH METAGENOMSKIH KNJIŽNIC**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**OXYGENASE ACTIVITIY OF METAGENOMIC CLONES AND  
STATISTICAL ANALYSIS OF PARAMETERS CONCERNING  
EFFECTIVENESS OF METAGENOMIC LIBRARIES EXPRESSION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomska naloga je bila opravljena v Laboratoriju Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Blaž Stres in za recenzentko doc. dr. Tjaša Danevčič.

Mentor: prof. dr. Blaž Stres

Recenzentka: doc. dr. Tjaša Danevčič

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Blaž STRES  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Saša JANDRIĆ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25:575.111:577.152.1:519.237(043)=163.6
KG	metagenomika/metagenomske knjižnice/mikrobne združbe/kunci/oksigenaze/oksigenazna aktivnost/spektrfotometrija/statistične analize/multivariantna analiza
AV	JANDRIĆ, Saša
SA	STRES, Blaž (mentor)/DANEVČIČ, Tjaša (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2016
IN	OKSIGENAZNA AKTIVNOST METAGENOMSKIH KLONOV IN STATISTIČNA ANALIZA PARAMETROV USPEŠNOSTI EKSPRESIJE OBSTOJEČIH METAGENOMSKIH KNJIŽNIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 54 str., 5 pregl., 24 sl., 5 pril., 142 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Oksigenaze so podskupina oksidoreduktaz, ki neposredno vgrajujejo kisikov atom v organske spojine. Oksigenaze imajo številne vloge v biologiji in so zanimive tudi z industrijskega vidika. Eden od načinov odkrivanja novih encimov je tudi s pomočjo metagenomike. V diplomski nalogi nas je zanimal odnos med praktičnimi in teoretičnimi vidiki metagenomskega iskanja bioloških učinkovin iz okolja. S pomočjo statističnih orodij smo analizirali različne metagenomske parametre in določali kateri parametri iz izbrane literature s področja funkcionalne metagenomike določajo uspešnost odkrivanja tarčnih zaporedij. Ugotovili smo, da sta izbira ustreznega vektorja in število testiranih klonov najpomembnejša parametra pri uspešnosti izražanja tarčnih genov iz okolja v metagenomskih knjižnicah. Vsi preučeni pristopi pridobivanja in izražanja okoljske mikrobne DNK imajo nizek nivo uspešnosti odkrivanja novih tarč glede na vloženo delo. Spektrofotometrično smo določali oksigenazno aktivnost 567 metagenomskim transformantam pripravljenim iz izolatov kunčjega fecesa. Odkrili smo 35 kandidatov pri čemer je eden razgrajeval 2 različna substrata. Vsi možni kandidati imajo precej drugačne encimske aktivnosti. V primerjavi z drugimi raziskavami določanja oksigenaz iz okolja, smo preučili mnogo manjše število metagenomskih transformant, vendar smo bili uspenejši pri odkrivanju možnih zaporedij DNK z zapisom za oksigenaze.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN	Dn
DC	UDC 579.25:575.111:577.152.1:519.237(043)=163.6
CX	metagenomics/metagenomic libraries/microbial communities/rabbits/oxygenases/oxygenase activity/spectrofotometry/ statistical analyses/multivariate analysis
AU	JANDRIĆ, Saša
AA	STRES, Blaž (supervisor)/DANEVČIČ, Tjaša (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2016
TI	OXYGENASE ACTIVITIY OF METAGENOMIC CLONES AND STATISTICAL ANALYSIS OF PARAMETERS CONCERNING EFFECTIVNESS OF METAGENOMIC LIBRARIES EXPRESSION
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 54 p., 5 tab., 24 fig., 5 ann., 142 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Oxygenases are a subgroup of oxyreductases that directly incorporate oxygen atoms in organic compounds. These enzymes play different roles in biology and represent a promising field in industry. Metagenomics is one of the approaches in new enzyme discovery. The aim of this graduation work was to evaluate the relationship between practical and theoretical aspects of metagenomic approach in discovery of new biological compounds from the environment. We used statistical tools to analyze different metagenomic parameters and to determine which parameters from the literature (covering functional metagenomics) define successful discovery of targets. We discovered that the two most important parameters for succesful expression of target genes in metagenomic libraries (from the environment) are a selection of a suitable vector and a number of screened clones. Considering how much work is done, all the studied approaches of retrieving and expressing of microbial environmental DNA have little success in discovering new targets. With a help of a spectrophotometer we scanned 567 methagenomic transformants prepared from rabbit feces for possible oxygenase acitivity. We discovered 35 potential candidates with oxygenase sequences. All of the candidates had very different enzymatic activity. Moreover, one clone metabolized two different substrates. If we compare our reasearch for oxyganse activity to other similar works, we scanned less clones, but we had more positive results.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 OKSIGENAZE .....	2
2.2 METODE ODKRIVANJA OKSIGENAZ .....	4
<b>2.2.1 Metagenomski pristop .....</b>	<b>4</b>
2.2.1.1 Vzorčenje in nadaljnja obdelava.....	5
2.2.1.2 Izolacija DNK in izdelava genskih knjižnic .....	5
2.2.1.3 Pregled transformant.....	6
2.2.1.4 Sekvenciranje.....	6
2.2.1.5 Funkcionalna metagenomika .....	6
2.2.1.6 Obdelava pridobljenih podatkov .....	7
2.3 DOLOČANJE OKSIGENAZNE AKTIVNOSTI .....	8
2.4 APLIKATIVNA VREDNOST OKSIGENAZ .....	10
2.5 METABOLNI SISTEM KUNCA .....	10
<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>13</b>
3.1 DOLOČANJE OKSIGENAZNE AKTIVNOSTI .....	13
<b>3.1.1 Priprava reagentov.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.2 Priprava raztopin ampicilina in IPTG-ja.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.3 Oživljjanje rekombinantnih klonov .....</b>	<b>15</b>

<b>3.1.4 Priprava plošč za merjenje in optično sledenje mikrobne oksigenazne aktivnosti .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.5 Priprava negativne in pozitivne kontrole.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.6 Merjenje oksigenazne aktivnosti pozitivne in negativne kontrole .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.7 Analiza izmerjenih vrednosti.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.8 Gojišča in ostala kemična sredstva .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.9 Metagnomska knjižnica klonov v eksperimentu .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. PRIPRAVA METAGENOMSKE TABELE IN NADALJNA OBDELAVA PODATKOV .....</b>	<b>20</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 PARAMETRI METAGENOMSKIH KNJIŽNIC .....</b>	<b>23</b>
<b>    4.1.1 Vektorji.....</b>	<b>23</b>
<b>    4.1.2 Analiza sestave tarčnih genov v funkcionalnih metagenomskeh knjižnicah.....</b>	<b>27</b>
<b>    4.1.3 Multivariatna analiza funkcionalnih metagenomskeh knjižnic.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 OKSIGENAZNA AKTIVNOST .....</b>	<b>32</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>39</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>42</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>44</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oznake izvornih plošč.	16
Preglednica 2: Termini meritev z oznakami intervalov za plošče z rekombinantnimi sevi.	18
Preglednica 3: Termini meritev z oznakami intervalov za plošče s pozitivnimi in negativnimi kontrolami.	19
Preglednica 4: Kemična sredstva in raztopine	20
Preglednica 5: Prikaz odkritih hipotetičnih rekombinantnih sevov z oksigenazno aktivnostjo	38

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Katalitična enota naftalen dioksigenaze, kjer so z rdečo označene 3 α podenote, z modro 3 β podenote ter vidni žveplovi atomi v [2Fe-2S] centrih (rumena barva) in železovi atomi (črna barva) (Ramaswamy, 2004) .....	3
Slika 2: Cikel oksigenacije naftalena s pomočjo naftalen dioksigenaze (Di Gennaro in sod., 2011).....	4
Slika 3: Osnovni koraki metagenomskega pristopa (Handelsman, 2004).....	5
Slika 4: Kolorimetrični test za dokazovanje delovanja bifenil dioksigenaze (Johannes in sod., 2006).....	9
Slika 5: Poenostavljen prikaz metode dokazovanja oksigenazne aktivnosti s pomočjo hrenove peroksidaze (HP) in vodikovega peroksida (Johannes in sod., 2006).....	9
Slika 6: Indolni test za zaznavanje oksigenazne aktivnosti (Johannes in sod., 2006).....	10
Slika 8: Primer mikrotitrskih plošč z dodanimi rekombinantnimi sevi in ustreznimi barvili. ....	17
Slika 9: Spektrofotometer (BioTek, ZDA) s pripadajočo računalniško opremo. ....	17
Slika 10: Povprečna dolžina inserta pridobljena iz strokovne literature za posamezo vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo ± en standardni odklon. ....	24
Slika 13: Povprečno število pozitivnih klonov pridobljenih iz strokovne literature za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo ± en standardni odklon. ....	25
Slika 14: Povprečna vrednost razmerja: št. testiranih rekombinant/ št.pozitivnih rekombinant za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo ± en standardni odklon. ....	26
Slika 16: Grafično-numerični prikaz zastopanosti posameznih vrst biomolekul odkritih s pomočjo funkcionalne metagenomike. ....	27
Slika 17: Grafično-numerični prikaz zastopanosti posameznih vrst biomolekul v podskupini Ostale biomolekule odkritih s pomočjo funkcionalne metagenomike. ....	28
Slika 18: Grafični prikaz deleža posameznih vektorjev uporabljenih (za pripravo genskih knjižnic) pri odkrivanju 9 najpogostejših tarč.....	29

Slika 19: Ordinacijska analiza eksperimentalnih parametrov, ki razložijo raztros uspešnosti odkrivanja novih tarčnih zaporedij. Podatki so bili pripravljeni iz metapodatkov v posameznih študijah. Napetost=0.14. Skupine so obarvane glede na tip vektorja: BAC (črna), fagemid (rdeča), fozmid (modra), kozmid (roza), plazmid (zelena).....	31
Slika 20: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila brilliant blue s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole. .....	33
Slika 21: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila karmin s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole. .....	34
Slika 22: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila kongo rdeče s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole negativne kontrole. .....	35
Slika 23: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila kristal vijolično s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole. ....	36
Slika 24: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila ksilen cianol s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole. ....	37

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Kemijska zgradba ksilen cianola (Sigma-Aldrich, 2016).

Priloga B: Kemijska zgradba karmina (Chemical Book, 2016).

Priloga C: Kemijska zgradba kongo rdeče (MP Biomedicals, 2016b).

Priloga D: Kemijska zgradba brilliant blue (MP Biomedicals, 2016a).

Priloga E: Kemijska zgradba kristal vijoličnega (MP Biomedicals, 2016c).

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>BAC</b>	bakterijski umetni kromosom (ang. Bacterial Artificial Chromosome)
<b>BphB</b>	dihidrodiol dehidrogenaza
<b>BphC</b>	2,3-dihidroksibifenil-1,2-dioksigenaza
<b>DNK</b>	deoksiribonukelinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
<b>EC</b>	encimska številka (ang. Enzyme Commission number)
<b>Eh</b>	redoks potencial
<b>HP</b>	hrenova peroksidaza
<b> IPTG</b>	izopropil $\beta$ -D-1-tiogalaktoperanozid
<b>kb</b>	kilobaza
<b>LB FB</b>	Luria Bertani Fraser broth
<b>lib.size</b>	velikost knjižnice
<b>Medline</b>	ameriška bibliografska baza podatkov s področja ved o življenju in biomedicine
<b>n</b>	število metagenomskih knjižnic
<b>NADH</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>NM-MDS</b>	nemetrično večrazsežnostno lestvičenje (ang. Non-Metric Multidimensional Scaling)
<b>NP-MANOVA</b>	neparametrična večvariantna analiza variance (ang. non-parametric multivariate analysis of variance)
<b>N.t.rkb</b>	število testiranih rekombinant
<b>OD</b>	optična gostota (ang. optical density)
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
<b>pH</b>	merilo za koncentracijo vodikovih protonov v vodni raztopini
<b>rRNK</b>	ribosomska RNK (ang. ribosomal RNA)
<b>t.i.</b>	tako imenovani
<b>tip.avtor</b>	avtorstvo
<b>tip.gen</b>	tip tarčnega gena
<b>tip.okolje</b>	tip okolja
<b>tip.vektor</b>	tip vektorja
<b>UV</b>	ultravijoličen
<b>vzorecN</b>	zaporedna oznaka vzorca
<b>2D</b>	dvodimenzionalen

## 1 UVOD

Ena izmed pomembnejših skupin encimov v metabolizmu kisika so oksigenaze. Najdemo jih tako pri prokariotih (predvsem razgradnja različnih organskih molekul) kot tudi evkariotih (anabolne in katabolne reakcije). Tovrstne encime lahko razdelimo v dve skupini (monoooksigenaze in dioksigenaze) (Fetzner, 2002). Njihov biotehnološki potencial je potrjen (van Beilen in sod., 2003), vendar ne povsem razvit (Dror in Fishman, 2012).

Da bi iztržili čim več iz teh biokatalizatorjev, je ena od možnosti metagenomski pristop, kjer lahko z od gojenja neodvisnimi metodami odkrivamo nove encime in tako nadomestimo neprimerne postopke v industriji in še kje (Aehle in Eck, 2012).

S pomočjo funkcionalne metagenomike smo iskali oksigenaze iz že pripravljenih klonov iz kunčjih iztrebkov.

Metagenomika je zelo kompleksna veda in je zato potrebno natančno vedeti kateri dejavniki imajo v takšnem pristopu (določanja novih tarč iz naravnega okolja) največji vpliv na končni rezultat protokola oz. raziskave. Z *in silico* preučevanjem (rezultatov) že objavljenih eksperimentov, lahko dobimo vpogled v nekatere ključne parametre v metagenomskih analizah okoljskih vzorcev in predlagamo izboljšave bodočih študij ter s tem večjo učinkovitost pri pridobivanju želenih tarč, višjo kvaliteto iskanih biomolekul in boljšo okaraterizacijo mikrobne metabolne dinamike izbranega okolja.

### 1.1 CILJI RAZISKOVANJA

V diplomskem delu želimo:

- pregledati obstoječo literaturo na temo ekspresije metagenomskih knjižnic (Medline, Google Scholar);
- izbrati primerno število metagenomskih knjižnic za njihovo obdelavo ( $n > 100$ );
- parametrizirati pristope glede na uporabljene vektorje za kloniranje, velikostne razrede insertov, velikosti knjižnic, število pregledanih klonov;
- s statistično analizo ugotoviti, kateri eksperimentalni parametri v že objavljenih študijah so najpomembnejši za odkrivanje tarčnih genov;
- predlagati orodja/rešitve, ki zmanjšajo variabilnost oziroma delež napak pri iskanju tarčnih genov;
- v laboratorijskih pogojih izraziti približno 500 klonov neselektivnih oksigenaz iz okolja kunčjih prebavil
- določiti oksigenazno aktivnost klonov z uporabo 5 aromatskih barvil, negativnih in pozitivnih kontrol

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Vsi parametri priprave metagenomskih knjižnic so enako pomembni za uspešnost odkrivanja tarčnih genov.
- Uspešnost izražanja tarčnih genov iz okolja v metagenomskih knjižnicah je najbolj povezana z izbiro ustreznih vektorjev, števila testiranih klonov ter izvora vzorca.
- Klonirana zaporedja oksigenaz imajo po ekspresiji podobno encimsko aktivnost.
- Preko tehnik iskanja osamelcev v velikem številu izmerjenih klonov lahko enostavno ugotovimo klone z visoko aktivnostjo.

## 2 PREGLED OBJAV

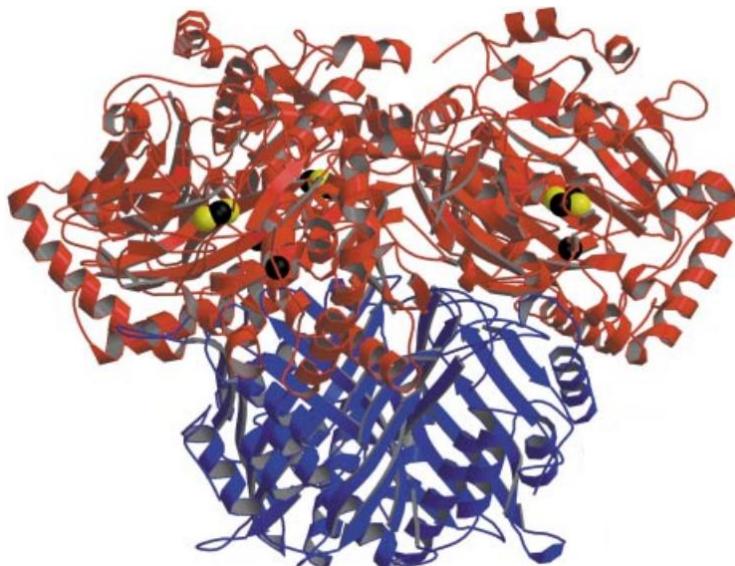
### 2.1 OKSIGENAZE

Oksigenaze so podskupina oksidoreduktaz (EC 1.14.), ki katalizirajo neposredno vgradnjo molekularnega kisika v organske substrate (Pazmino in sod., 2010). Za te encime je značilna visoka regio- in stereospecifičnost ter delovanje na številne substrate (Nolan in O'Connor, 2008). Oksigenaze igrajo pomembno vlogo v aerobni bakterijski razgradnji ksenobiotikov (predvsem alkanov in aromatskih spojin) in naravnih spojin. Pri višjih organizmih so oksigenaze vpletene v različne anabolne in katabolne procese (Fetzner, 2002). Na osnovi števila kisikovih atomov, ki jih encim vgradi v substrat, razdelimo oksigenaze na monooksigenaze in dioksigenaze (Fetzner, 2002).

Pri vgradnji kisikovega atoma v substrat, monooksigenaze s pomočjo reduksijske moči aktivirajo  $O_2$ . Nastane reaktiven kisikov intermediat in sledi oksigencija organske spojine. Glede na vir reduksijske moči, ki ga uporablja, lahko monooksigenaze razdelimo v dve skupini. V prvi najdemo tiste, ki kot vir reduksijske moči uporablja kofaktor (od hema odvisne monooksigenaze, od flavina odvisne monooksigenaze, od bakra odvisne monooksigenaze, od pterina odvisne monooksigenaze in od železa odvisne monooksigenaze, ki ne vsebujejo hema), v drugi pa tiste, ki uporablja organski substrat (Pazmino in sod., 2010). Večina dioksigenaz uporablja za aktivacijo kisika kovinski ion. Preostali del se ne poslužuje kofaktorjev (Bugg, 2003). Di Gennaro in sod. (2011) so ugotovili, da je najbolj preučena dioksigenaza naftalen dioksigenaza predstavnikov iz rodu *Pseudomonas*. Naftalen dioksigenaze katalizirajo vgradnjo dveh kisikovih atomov v naftalen in substituirane naftalene. Pri tem nastanejo *cis*-dioli (Di Gennaro in sod., 2005).

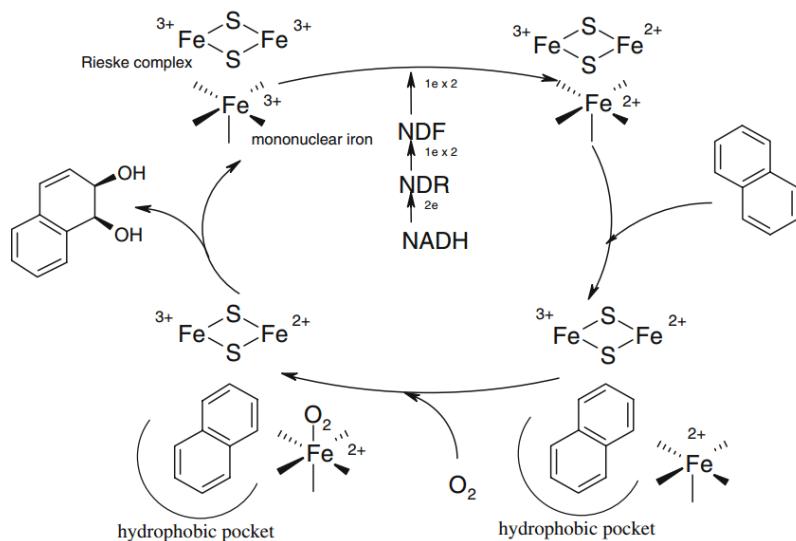
Gre za encimski sistem (Di Gennaro in sod., 2005) iz 3 enot (flavoproteinska reduktaza, feredoksin in oksigenaza) (Di Gennaro in sod., 2011). Oksigenaza predstavlja katalitsko enoto kompleksa in je sestavljena iz 3  $\alpha$  in 3  $\beta$  podenot. Na vsaki  $\alpha$  podenoti najdemo dva

redoks centra: en [2Fe-2S] center in mononuklearno železo. Slednje se nahaja v aktivnem mestu (Leak in sod., 2012).



Slika 1: Katalitična enota naftalen dioksigenaze, kjer so z rdečo označene 3  $\alpha$  podenote, z modro 3  $\beta$  podenote ter vidni žveplovi atomi v [2Fe-2S] centrih (rumena barva) in železovi atomi (črna barva) (Ramaswamy, 2004).

Vse 3 enote encimskega sistema so vodotopni proteini, ki se skupaj povežejo v elektronsko prenašalno verigo. Elektroni se iz NADH preko reduktaze in feredoksina prenesejo na oksigenazo. Elektronska veriga prenese 2 elektrona na vsak porabljen  $O_2$ . En elektron, ki prispe do oksigenaze, se veže na železov atom [2Fe-2S] centra, drugi na železov atom v aktivnem mestu. Substrat se veže v lipofilni žep encima, medtem ko se  $O_2$  poveže z železovim atomom v aktivnem mestu. Sledi prenos obeh kisikovih atomov in obeh elektronov na substrat. Pri tem se encim povrne v začetno oksidacijsko stanje (Di Gennaro in sod., 2011).



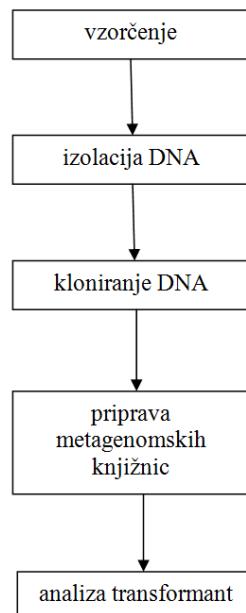
Slika 2: Cikel oksigenacije naftalena s pomočjo naftalen dioksigenaze (Di Gennaro in sod., 2011).

## 2.2 METODE ODKRIVANJA OKSIGENAZ

Nove encime pridobivamo iz naravnih ali umetnih okolij (npr. mikrobne zbirke in genske knjižnice) (Carballeira in sod., 2009). Zaradi fiziološke raznolikosti, so mikrobi odličen vir novih encimov (Leak in sod., 2012), vendar lahko s klasičnimi gojitvenimi tehnikami dobimo vpogled v zelo nizek delež te (genomske) pestrosti (Amann in sod., 1995). S pomočjo modernih metod molekularne biologije je večinoma možna premostitev te ovire in sicer preko sekvenciranja ali s pregledom t.i. metagenoma določenega okolja (Aehle in Eck, 2012). Metagenom je, tako Aehle in Eck (2012), celokupna genomska informacija vseh mikrobov danega okolja ob določenem času (vzorčenja).

### 2.2.1 Metagenomski pristop

Metagenomska analiza v grobem obsega naslednje korake: izolacija DNK iz okoljskega vzorca, kloniranje DNK v ustreznem vektorju, priprava metagenomskih knjižnic in analiza transformant (Handelsman, 2004).



Slika 3: Osnovni koraki metagenomskega pristopa (Handelsman, 2004).

### 2.2.1.1 Vzorčenje in nadaljnja obdelava

Navkljub nekaterim izboljšavam na področju pomnoževanja zelo majhnih količin DNK, vrsto vzorca, primernega za metagenomsko analizo, določa količina in kvaliteta DNK, ki jo lahko izoliramo iz danega vzorca. Zaradi kompleksnosti in spremenljive sestave, je manipuliranje z vzorci sedimentov in tal težavno. Največjo oviro predstavlja ločevanje mikrobnih celic od talnih matric (Williamson in Yooseph, 2012).

### 2.2.1.2 Izolacija DNA in izdelava genskih knjižnic

DNK se izolira iz vzorca takoj ali po predhodnem shranjevanju pri nizkih temperaturah. Sledi liza celic, čiščenje in končno precipitacija DNK. V primeru dela z vzorci sedimentov ali tal se uporablja bolj agresivna liza celic in posebne kemikalije (npr. heksadecil-tri-metil amonijev bromid) (Williamson in Yooseph, 2012).

Williamson in Yooseph (2012) sta opazila, da pristop izdelave metagenomskih knjižnic narekujejo predvsem raziskovalne hipoteze in cilji v povezavi z metodo za sekvenciranje. Fragmentacijo genomske DNK se opravi z biokemijskimi ali fizikalnimi tehnikami. Pri knjižnicah z manjšimi inserti se v vektorje (tj. plazmide) vstavlja koščki genoma z največ 10 kb dolžine. Vektorji, ki se uporabljajo pri knjižnicah z velikimi inserti (tj. 100 kb ali daljši), so ponavadi fozmidi, kozmidi in bakterijski umetni kromosomi (BAC). Da se

minimizira uničenje insertov, se med procesom kloniranja ohranja nizko število tovrstnih prenašalcev informacij (Williamson in Yooseph, 2012).

#### 2.2.1.3 Pregled transformant

Po izdelavi knjižnic sledi njihov pregled. V poštev pridejo naslednje možnosti:

- iskanje filogenetskih markerjev (npr. 16S rRNK) s pomočjo molekularnih tehnik (hibridizacija ali PCR),
- iskanje specifične biokemijske lastnosti,
- sekvenciranje naključno izbranih klonov (Handelsman, 2004).

#### 2.2.1.4 Sekvenciranje

Trenutno so v rabi naslednje tehnologije sekvenciranja: dideoksi sekvenciranje (Sanger), pirosekvenciranje (454 – Roche), SOLiD™ (Applied Biosystems) in Illumina®. Vsaka od opcij ima svoje prednosti in slabosti. Sekvenciranje po Sangerjevi metodi je vse manj v rabi zaradi cene, količine podatkov in naraščanja dolžine sekvence, ki jo lahko odčitajo ostali trije pristopi (Williamson in Yooseph, 2012).

#### 2.2.1.5 Funkcionalna metagenomika

Funkcionalna analiza temelji na določanju metabolnih aktivnosti klonov (Mocali in Benedetti, 2010).

Z ustreznim (eksperimentalnim) postopkom dosežemo izražanje tarčnih genov v metagenomskih knjižnicah. Tako zaznamo in potrdimo funkcijo izbranih zaporedij (Ekkers in sod., 2012) brez predhodnega sekvenciranja DNK.

Tovrsten pristop obeta odkritja novih razredov genov z znanimi ali novimi vlogami (Simon in Daniel, 2011).

Trije najpogostejši pristopi določanja funkcije odseka dednega materiala so (Ekkers in sod., 2012):

- Direktno zaznavanje fenotipskih lastnosti posameznih klonov:

Gre za najbolj uporabljen način funkcionalne analize metagenomskih knjižnic. Ključnega pomena je, da se iskani gen izraža v visokih vrednostih. S tem se zmanjša verjetnost napake pri pregledu velikega števila klonov. Znotraj tega pristopa so od samih začetkov metagenomike v grobem razvili naslednji 2 rešitvi:

- neposredna zaznava: Metoda temelji na vizualni zaznavi določene lastnosti (barva kolonij, morfologija kolonij ali cone zbistritve okrog kolonij v poltrdem agarju) pozitivnih klonov.

Metoda je po eni strani tehnološko enostavna, po drugi zahteva veliko intenzivnega dela v samem laboratoriju. Slednje se skrajša z avtomatizacijo (mikroplošče, roboti za nanos kolonij in bralci mikroplošč). Sočasno moderne aparature povečajo zanesljivost in primerljivost pregledov različnih klonov (Ekkers in sod., 2012).

Slaba stran tovrstne direktne zaznave metagenomskih knjižnic je nizka občutljivost in omejenost na pleiotropne lastnosti v metagenomu (Ekkers in sod., 2012).

- uporaba indikatorskega medija:

Za razliko od prejšnje metode je v tem primeru mogoče zaznati naslednje lastnosti izbranega klena: majhne molekule, kemijske reakcije, katabolne, metabolne in protimikrobne zmožnosti. Poleg tega je sam princip precej bolj občutljiv. Zaradi dobrih rezultatov pri analizi velikega števila klonov, znanstvena srenja polaga velike upe v uporabo indikatorskih medijev (Ekkers in sod., 2012).

Nekatere težave, ki se porajajo pri metodologiji so: neprepustnost membrane gostiteljske celice za substrat iz medija, razgradnja encima in kopiranje produkta znotraj celice. Takšnim oviram se je mogoče izogniti z razbitjem gostiteljskih celic (Ekkers in sod., 2012).

Med vsemi tehnikami lize celic največ obeta uporaba avtolitičnega vektorja, kjer sprostitev celične vsebine omogoči UV svetloba (Ekkers in sod., 2012).

- Indukcija izražanja gena s pomočjo substrata: Metoda je primerna predvsem v odkrivanju genov katabolizma (Ekkers in sod., 2012).
- Uravnana zaznava: Tehnika temelji na vnaprej izdelanem ekspresijskem sistemu (poročevalski gen ali heterologna komplementacija) in omogoča posredno zaznavo genske funkcije (Ekkers in sod., 2012).

#### 2.2.1.6 Obdelava pridobljenih podatkov

Značilnosti podatkov, tj. nukleotidnih zaporedij, narekuje okolje, kjer je potekalo vzorčenje. Pomemben vpliv tako na obdelavo kot tudi na interpretacijo eksperimentalnih podatkov ima izbira tehnologije sekvenciranja. Postopek analize ponavadi vključuje sestavo genoma, iskanje gena, anotacijo in taksonomsko uvrstitev. Dodatne manipulacije

podatkov obsegajo: t.i. novačenje fragmentov (ang. fragment recruitment), primerjava vzorcev, statistična obdelava metapodatkov (ang. metadata) in simulacije. Enega izmed nosilnih stebrov pri *in silico* metodologijah v metagenomiki predstavljajo podatkovne baze (Williamson in Yooseph, 2012).

### 2.3 DOLOČANJE OKSIGENAZNE AKTIVNOSTI

Pri določanju oksigenazne aktivnosti (izboljšani encimi ali popolnoma novi encimi) velikega števila klonov je potrebno izbrati občutljivo in učinkovito pregledno metodo (Johannes in sod., 2006).

Metode za pregled velikega števila genskih knjižnic delimo v 4 skupine: analitske tehnike, tehnike pregleda mikrotitrskih plošč, sistemi trdne faze in prikazovalne tehnologije (z uporabo celic ali fagov) (Tee in Schwaneberg, 2007).

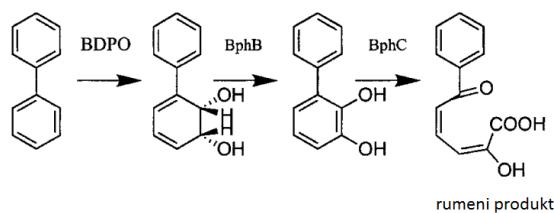
V sklop detekcijskih sistemov mikrotitrskih plošč med drugim spadajo (Johannes in sod., 2006):

- tehnike, ki temeljijo na optičnih lastnostih substratov in produktov:

Gre za najbolj priročen pristop določanja oksigenazne aktivnosti velikega števila klonov. Večina substratov oksigenaz so aromatske spojine in zato ima nastali produkt drugačen spekter absorpcije svetlobe kot izhodiščna molekula. Primer takšne metod je kolorimetrično določanje bifenil oksigenaze. Poleg slednjega encima je potrebna prisotnost še dveh oksigenaz (dihidrodiol dehidrogenaza (BphB) in 2,3-dihidroksibifenil-1,2-dioksigenaza (BphC), ki omogočita pretvorbo produkta bifenil oksigenaze v rumenoobarvano spojino (Johannes in sod., 2006).

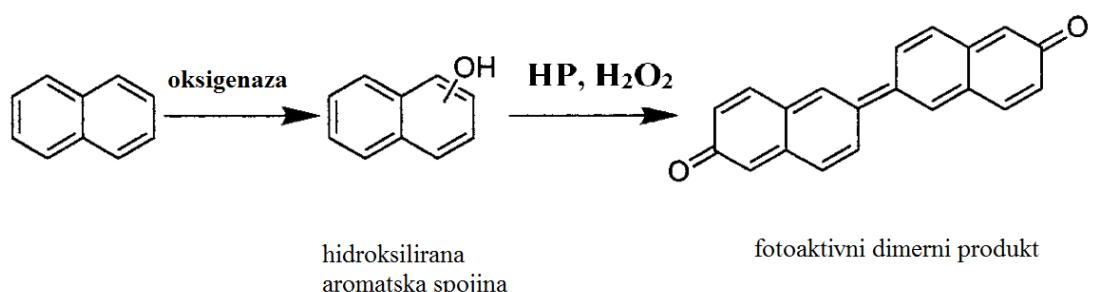
- testiranje z uporabo hrenove peroksidaze in vodikovega peroksidu

Postopek je sestavljen iz več korakov in omogoča zaznavanje le tistih oksigenaz, ki tvorijo hidroksilirane aromatske produkte. S pomočjo hrenove peroksidaze in dodatkom vodikovega peroksidu dobimo iz aromatskih spojin z eno ali dvema -OH skupinama fotoaktivno organsko spojino v obliki cikličnega dimera ali polimera (Johannes in sod., 2006).



Slika 4: Kolorimetrični test za dokazovanje delovanja bifenil dioksigenaze (Johannes in sod., 2006).

- metode pri katerih se uporablja Gibbsov reagent in 4-aminoantipirin:

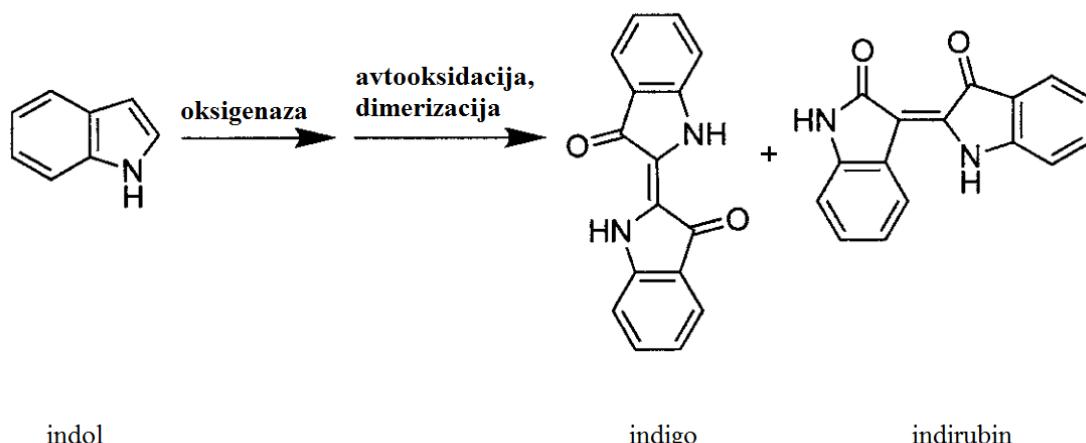


Slika 5: Poenostavljen prikaz metode dokazovanja oksigenazne aktivnosti s pomočjo hrenove peroksidaze (HP) in vodikovega peroksida (Johannes in sod., 2006).

Spojini imata zelo podobno zgradbo in posledično reagirata z istim naborom molekul. Med njimi najdemo tudi produkte oksigenaz. Pri zaznavanju aktivnosti dioksigenaz, je potrebno *cis*-dihidrodiol kemijsko (kislina) ali encimsko (*cis*- dihidrodiol dehidrogenaza) pretvoriti v fenol. Obarvan produkt nastane v nekaj minutah in ga zaznamo spektrofotometrično. Poudariti je treba, da pri takšnih dokazovanjih dioksigenaz, Gibbsov reagent in 4-aminoantipirin učinkovito delujeta pri različnih pogojih (pH in Eh) (Johannes in sod., 2006).

- indolni test

Po delovanju oksigenaz (di- ali monooksigenaz) nastanejo različni indoli, ki se po stiku z atmosfero dodatno oksidirajo in dimerizirajo v indigo in indirubin. Produkta zaznamo spektrofotometrično (Johannes in sod., 2006).



Slika 6: Indolni test za zaznavanje oksigenazne aktivnosti (Johannes in sod., 2006)

#### 2.4 APLIKATIVNA VREDNOST OKSIGENAZ

Oksigenaze imajo nekatere prednosti pred klasičnimi kemijski pristopi. Ti encimi reagirajo s številnimi organskimi molekulami, omogočajo visoko kvaliteto produktov (Dror in Fishman, 2012) in manj obremenjujejo okolje (Faber, 2011). Danes se oksigenaze med drugim uporabljajo v industriji barvil (van Beilen in sod., 2003). Navkljub temu, je njihovo koriščenje precej manjše v primerjavi z drugimi skupinami kot so izomeraze, hidrolaze in lipaze (Dror in Fishman, 2012).

Vzroki za takšne razlike so med drugim:

- nestabilnost encimov v umetnih okoljih (Dror in Fishman, 2012),
  - draga regeneracija kofaktorjev (Dror in Fishman, 2012),
  - fiziološki učinki oksigenaz na celico (van Beilen in sod., 2003),
  - zahtevni pregledni protokoli (van Beilen in sod., 2003),
  - kompleksni biopresesi (van Beilen in sod., 2003).

Nekateri polagajo velike upe v oksigenaze, vendar bo najprej potrebno premostiti številne ovire, da bo prišel do izraza ves industrijski potencial teh encimov (van Beilen in sod., 2003).

## 2.5 METABOLNI SISTEM KUNCA

Kunce uvrščamo v družino *Leporidae*, ki obsega 12 rodov (Kermauner, 1994). V to skupino spada tudi rod *Oryctolagus*. Vse sodobne pasme domačih kuncev so potomci

divjega evropskega kunca (Kermauner, 1994) *Oryctolagus cuniculus* (Surridge in sod., 1999).

Člani družine *Leoparidae* se v večini primerov prehranjujejo izključno z rastlinskim materialom (McEwan, 2014). Kljub temu, da so kunci (funkcionalno in anatomsko) prilagojeni na krmo z visoko vsebnostjo surove vlaknine, le-to slabo prebavlajo. Za razliko od prežvekovalcev, imajo kunci majhno prostorino prebavil in hitro presnova. Posledično niso zmožni na počasen način presnavljati surove vlaknine kot to počne govedo. Tako je kunčja prebava osredotočena na razgradnjo nevlakninskega dela krme (Kermauner, 1994). V začetnem koraku prebavnega sistema žival s sekalcij odtrga rastlinje. V ustni votlini nastopi drobljenje materiala (s pomočjo gibov čeljusti) in vlaženje le-tega s slino. Pri tem se oblikujejo bolusi, ki prek požiralnika potujejo v želodčno votlino. Kljub temu, da je mišičje želodca dobro razvito, je krčenje minimalno (Davies R.R. in Davies J.A., 2003). Tako je pomikanje hrane iz želodca posledica sile nove hrane na začetku prebavnega trakta na že prežvečen material v želodcu. Tanko črevo je osrednji del kunčjih prebavil (Kermauner, 1994). Tu se dospela vsebina meša (s pomočjo oženja sten) (Davies R.R. in Davies J.A., 2003), razgradi in absorbira (Kermauner, 1994). Izvodili pankreasa in žolča se nahaja v dvanajstniku (Kermauner, 1994). Trebušna slinavka sprošča številne encime (za razgradnjo proteinov, lipidov in ogljikovih hidratov) in bikarbonatne ione. Slednji dvignejo pH tankega črevesa. Žolčne kisline olajšajo absorpcijo lipidov in nekaterih vitaminov (Davies R.R. in Davies J.A., 2003). Neprebavljeni del potuje v slepo črevo (Kermauner, 1994). Sleplo črevo predstavlja do 60 % celotnega volumna prebavnega sistema kuncev. Na oddaljenem delu črevesja se nahaja privesek v obliki črva. Apendiks sprošča alkalno tekočino v lumen debelega črevesa. Izloček deluje kot pufer v tem delu prebavnega trakta (Davies R.R. in Davies J.A., 2003).

V slepem črevesu poteka mikrobna razgradnja preostalih hranilnih snovi in absorpcija vode. Debelo črevo je sestavljeno iz 4 delov: proksimalni kolon, prečni kolon, distalni kolon in rektum. *Fusus coli* se nahaja med proksimalnim in distalnim kolonom (Kermauner, 1994). Gre za mišično odebelitev, ki je značilna le za red *Lagomorpha* in sproža peristaltiko distalnega in proksimalnega kolona ter nadzoruje ločevanje nerazgradljivih snovi od fermentabilnih substratov (Davies R.R. in Davies J.A., 2003). Nerezgradljivi (vlakninasti) del potuje hitro po debelem črevesju, razgradljivi del (skupaj z vodo) potuje s pomočjo antiperistaltike iz kolona nazaj v slepo črevo. Procesu nastanka mehkega blata v slepem črevesu pravimo cekotrofija. Vsaj enkrat na dan se izloči trdo blato, ki je zrnate oblike, vsebuje več surovih vlaknin, manj mikrobov, proteinov, vitaminov in vodotopnih snovi od druge vrste iztrebka. Sledi izočanje mehkega blata, v obliki gruč kroglic obdanih s sluzjo ter po sestavi podobno vsebini slepega črevesa. Mehkega blata ne vidimo, saj ga žival poje direktno iz zadnjika. Pojavu pravimo cekofagija. Prebavna posebnost poveča delež izrabljenih hranil (Kermauner, 1994).

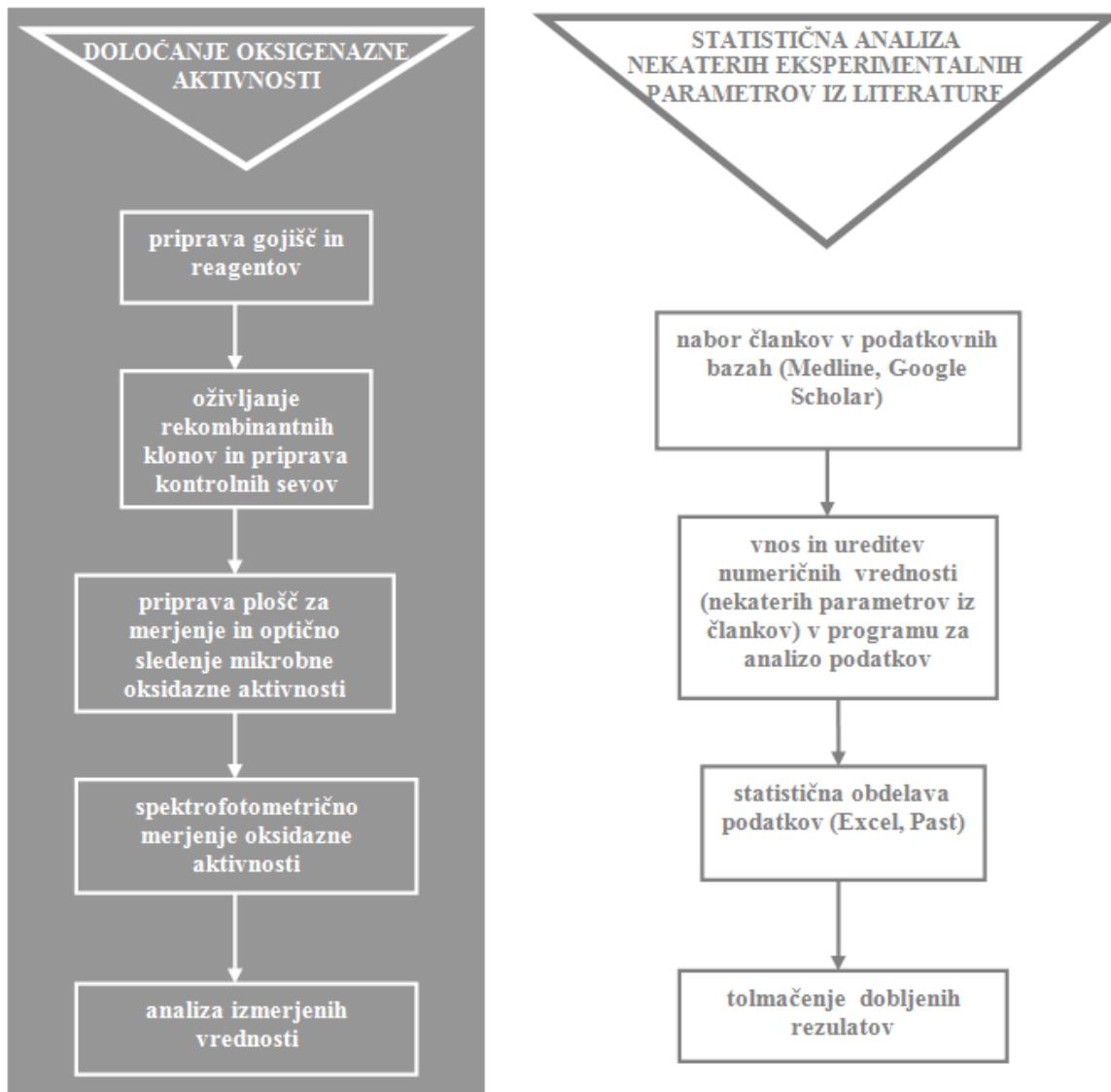
Mikrobiota je prisotna v želodcu, tankem, slepem in debelem črevesu ter mehkem in trdem blatu. Mikrofloro tvorijo predvsem še ne opisane arheje in bakterije. Od kultivabilnih članov kraljestva *Bacteria*, ki predstavljajo manjši del vseh bakterij, so v odrasli živali prisotne:

- celulolitične, ksilanolitične in pektinolitične bakterije v slepem črevesu
- ksilanolitične in pektinolitične bakterije v debelem črevesu
- celulolitične bakterije v iztrebkih (Combes in sod., 2012)

S pomočjo molekularnih tehnik so pokazali, da je večina bakterij slepega črevesa edinstvenih in spada med *Firmicutes*. Pri arhejah slepega črevesa je raznolikost na nivoju vrst precej manjša kot pri bakterijah. Prevladujejo predstavniki iz rodu *Methanobrevibacter* (Combes in sod., 2012).

Mikrobi prebavnega trakta omogočajo kuncu pridobivanje energije (prek hidrolize in fermentacije hrani), obrambo pred patogeni in razvoj imunskega sistema (Combes in sod., 2012).

### 3 MATERIAL IN METODE



Slika 7: Shematski prikaz poteka raziskovalnega dela.

#### 3.1 DOLOČANJE OKSIGENAZNE AKTIVNOSTI

##### 3.1.1 Priprava reagentov

Izbrali smo 5 reagentov.

V posamezno centrifugirko smo s pomočjo tehtnice PN-163 (Mettler – Toledo, Švica) natehtali ustrezno maso izbranega barvila (da smo v končni koncentraciji imeli 0,1 mM substrat):

- karmin: 233 mg

- kongo rdeče: 349 mg
- ksilen cianol: 269 mg
- kristal vijolično: 204 mg
- metil rdeče: 146 mg

Na koncu smo dolili do 50 ml destilirane vode.

Vse reagente smo še spektrofotometrično preverili.

Priprava plošče za merjenje absorbance barvil:

- odpipetirali smo 1 ml raztopine barvila pripravljenega v centrifugirki in 9 ml destilirane vode v označeno petrijevko
- premešali smo petrijevko
- v posamezno jamicu plošče smo odpipetirali 40 µl destilirane vode in nato še 50 µl redčenega barvila. Za vsako barvilo smo pripravili po dve paralelki.
- ploščo smo inkubirali čez noč pri temperaturi 4 °C.

S spektrofotometrom ELx808<sup>TM</sup> Absorbance Microplate Reader (BioTek, ZDA) smo določili absorbanco barvil. Pri 3 barvilih so meritve zadostile kriteriju. Kriterij je bila možnost spektrofotometrične sledljivosti (z opremo, ki je na razpolago v laboratoriju) reakcije (tj. (ne)razgradnje izbranih barvil) (ne)rekombinatnih sevov ob pregledu).

V primeru:

- metil rdečega je bila absorbanca prenizka, zato smo pripravili novo raztopino novega barvila (brilliant blue). Masa barvila, ki smo jo uporabili za pripravo 50 ml raztopine je bila 209 mg.
- kristal vijoličnega je bila raztopina pregosta oz. v nekaterih jamicah absorbance nismo uspeli zaslediti in smo posledično raztopino ponovno redčili: 100 µl raztopine barvila (predhodno redčen 1:10) in 10 ml destilirane vode.

Tako smo dobili okvirne vrednosti najvišjih valovnih dolžin za barvila:

- karmin: 415 nm (tudi 595 nm),
- kongo rdeče: 450 nm,
- ksilen cianol: 595 nm,
- kristal vijolično: 595 nm,
- brilliant blue: 595 nm.

Barvila smo razredčili v destilirani vodi:

50 ml barvila smo prelili v 450 ml destilirane vode. Pri brilliant blue barvili smo odpipetirali 5 ml barvila v 450 ml destilirane vode.

Končne koncentracije barvil za naš eksperiment so bile:

- karmin:  $0,466 \text{ g l}^{-1}$ ,
- kongo rdeče:  $0,698 \text{ g l}^{-1}$ ,
- ksilen cianol:  $0,538 \text{ g l}^{-1}$ ,
- kristal vijolično:  $0,408 \text{ g l}^{-1}$ ,
- brilliant blue:  $0,418 \text{ g l}^{-1}$ .

Pripravljene raztopine smo zatem avtoklavirali v avtoklavu A-21 CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija).

### **3.1.2 Priprava raztopin ampicilina in IPTG-ja**

Natehtali smo kemikalijo ( $m(\text{ampicilin}) = 1\text{g}$  oziroma  $m(\text{IPTG}) = 283,3 \text{ mg}$ ), vsako posebej v svojo centrifugirko in raztopili v  $10 \text{ ml}$  destilirane vode. Po filtraciji, smo vsako raztopino razdelili v  $10$  mikrocentrifugirk po  $1 \text{ ml}$  in do nadaljne rabe vse zamrznili pri temperaturi  $-20^\circ\text{C}$ .

### **3.1.3 Oživljjanje rekombinantnih klonov**

V očiščenem laminariju (Scholzen Technik, Švica) s prižganim gorilnikom in ventilacijo smo pripravili gojišče za rekombinatne seve:

V  $250 \text{ ml}$  gojišča LB FB smo odpipetirali:

- $500 \mu\text{l}$  ampicilina (založna koncentracija:  $1 \text{ g/ 10 ml}$ )
- $500 \mu\text{l}$  IPTG (založna koncentracija:  $100 \text{ mM}$ )
- $1 \text{ ml}$   $\text{CuCl}_2$  (založna koncentracija:  $2,1 \text{ mM}$ )

Gojišče LB FB smo naliili v sterilno petrijevko in z multikanalano pipeto razporedili (tj.  $150 \mu\text{l}/\text{jamica}$ ) po dveh celih novih sterilnih mikrotitrskih ploščah.

Oživljjanje klonov: Postavili smo mikrotitrsko ploščo z zamrznjenimi rekombinantnimi sevi z ustrezno oznako (preglednica 1) v laminarij. Za vsako original ploščo smo si pripravili dve novi plošči za nacepitev sevov.

Preglednica 1: Oznake izvornih plošč.

zaporedna številka plošče	oznaka plošče iz predhodnega nacepljanja
1	M17
2	M16
3	M15
4	M12
5	M11
6	M4

Seve smo precepili v dve novi sterilni mikrotitrski plošči s 96-igličnim replikatorjem (Sigma-Aldrich, ZDA).

V steklene posodo smo nalili 96 % tehnični etanol, replikator potopili, odcedili, pokrili posodo, stran od te etanolne kopeli ožgali replikator, da se je površinsko steriliziral, potem počakali, da se je ohladil in precepili celo mikrotitrsko ploščo klonov v dve novi mikrotitrski plošči. Potem smo replikator potopili v etanol in še enkrat ponovili celoten postopek površinske sterilizacije.

Pripravili smo si plastično posodo v katero smo dali brisačko, ki smo jo dobro navlažili z destilirano vodo.

Plošče smo položili v plastične škatle, zaprli posodo, inkubirali vse skupaj na stresalniku (Infors HT, Švica) pri temperaturi 37 °C, čez noč, s stresanjem pri 100 obratih/min. Zraven smo v stresalniku postavili še stekleničko z vodo. Z njeno pomočjo smo imeli približen vpogled na izhlapevanjem vode v stresalniku.

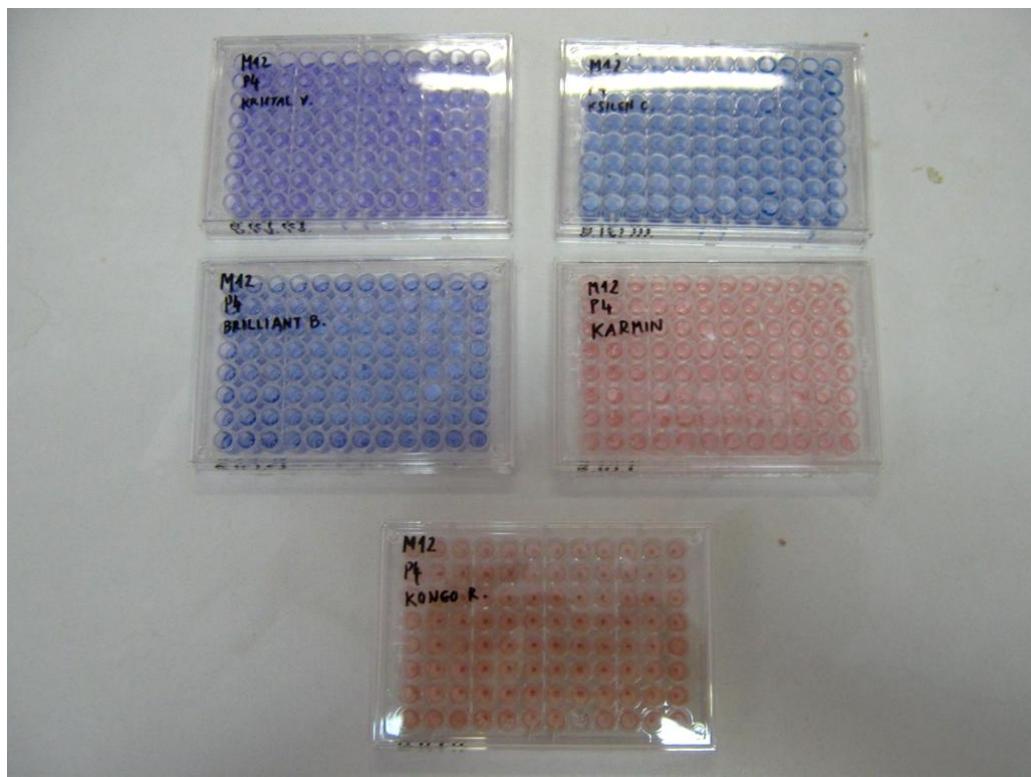
### 3.1.4 Priprava plošč za merjenje in optično sledenje mikrobne oksigenazne aktivnosti

Vizualno smo preverili, če so kolonije čez noč zrasle v nacepljenih mikrotitrskih ploščah.

Eno nacepljeno ploščo smo do nadaljnega shranili pri temperaturi -20 °C. Tako smo pripravili novo kopijo materinske plošče. Preostala nacepljena plošča nam je služila za naše delo.

Za vsako barvilo smo naredili naslednje:

Iz posamezne nacepljene mikrotitrsko ploščo smo v vsako jamico nove sterilne mikrotitrsko ploščo odpipetrali 20 µl prekonočne kulture rekombinatnih sevov in 50 µl barvila. Tako smo za vsako nacepljeno ploščo testirali 5 barvil in imeli vsega skupaj 30 plošč.



Slika 8: Primer mikrotitrskih plošč z dodanimi rekombinantnimi sevi in ustreznimi barvili.



Slika 9: Spektrofotometer (BioTek, ZDA) s pripadajočo računalniško opremo.

Vse novo pripravljene plošče z barvilm in kulturo smo s spektrofotometrom (BioTek, ZDA) pomerili pri naslednjih valovnih dolžinah: 405 nm, 415 nm, 450 nm, 595 nm, 650 nm. Tako smo izmerili optično gostoto vzorcev vseh plošč ob času  $t_0$  (Preglednica 2).

Plošče smo zložili nazaj v plastične škatle (z navlaženo brisačko na dnu) in inkubirali na stresalniku (Infors HT, Švica) pri temperaturi 37 °C, čez noč, s stresanjem pri 100 obratih/min.

Nato smo v ustreznih intervalih (Preglednica 3) pomerili plošče z barvilm in kulturo s spektrofotometrom (BioTek, ZDA) pri enakih valovnih dolžinah kot ob času  $t_0$ .

Preglednica 2: Termini meritev z oznakami intervalov za plošče z rekombinantnimi sevi.

datum, dan in čas meritve	oznaka časovnega intervala ( $t_n$ )
31. 1. 2012, torek, 16:00	$t_0$
1. 2. 2012, sreda, 8:00	$t_{16}$
2. 2. 2012, četrtek, 8:00	$t_{40}$
3. 2. 2012, petek, 8:00	$t_{64}$
6. 2. 2012, ponedeljek, 8:00	$t_{136}$

### 3.1.5 Priprava negativne in pozitivne kontrole

Priprava negativne kontrole:

V očiščenem laminariju (Scholzen Technik, Švica) s prižganim gorilnikom in ventilacijo smo nacepili negativno kontrolo. V petrijevko smo sterilno prelili 30 ml (bistrega, predhodno pripravljenega) gojišča LB, ki je vseboval ampiclin in IPTG. Z multikanalno pipeto smo sterilno razporedili gojišče (tj. 150 µl/jamica) po celotni sterilni mikrotitrski plošči z oznako K- in po celotni sterilni mikrotitrski plošči z oznako M. Odtalili smo mikrotitrsko ploščo z oznako A2 s sevi *E.coli* brez insertov. Seve smo precepili v dve novi sterilni mikrotitrski plošči s 96-igličnim replikatorjem. Pripravili smo si plastično posodico v katero smo dali brisačko, ki smo jo dobro navlažili z destilirano vodo. Plošči smo položili v škatlo, zaprli in inkubirali vse skupaj na stresalniku (Infors HT, Švica) pri temperaturi 37 °C, čez noč, s stresanjem pri 100 obratih/min.

Naslednji dan smo vizualno preverili, če so kolonije čez noč zrasle v nacepljenih mikrotitrskih ploščah. Mikrotitrskie plošče oz. vsebine jamic smo nato za 5 min premešali z mešalom (Boeco, Nemčija) pri 3.stopnji hitrosti. Za vsako barvilo smo naredili naslednje: iz nacepljene mikrotitrskie plošče smo v vsako jamico nove sterilne mikrotirske plošče odpipetirali 20 µl prekonočne kulture nerekombinatnih sevov in 50 µl barvila.

### Priprava pozitivne kontrole:

V očiščenem laminariju (Scholzen Technik, Švica) s prižganim gorilnikom in ventilacijo smo v centrifugirko dodali 15 ml gojišča LB (brez ampicilina in IPTG) in 1 ml predhodno pripravljene suspenzije svežega kunčjega fecesa. Rahlo smo premešali vsebino centrifugirke. Za vsako barvilo smo pripravili novo ploščo in sicer tako, da smo v posamezno jamico prenesli po 20 µl redčitve kunčjega fecesa in 50 µl ustreznega barvila.

### **3.1.6 Merjenje oksigenazne aktivnosti pozitivne in negativne kontrole**

Vse novo pripravljene plošče z barvilom in kulturo smo s spektrofotometrom (BioTek, ZDA) pomerili pri naslednjih valovnih dolžinah: 405 nm, 415 nm, 450 nm, 595 nm, 650 nm. Tako smo pomerili vse plošče ob času  $t_0$  (Preglednica 4).

Plošče smo zložili nazaj v plastične škatle (z navlaženo brisačko na dnu) in inkubirali na stresalniku (Infors HT, Švica) pri temperaturi 37 °C, čez noč, s stresanjem pri 100 obratih/min.

V nadaljevanju smo ob ustreznih dnevih (Preglednica 3), ob 8:00, pomerili plošče z barvilom in kulturo s spektrofotometrom (BioTek, ZDA) pri prej omenjenih valovnih dolžinah.

Preglednica 3: Termini meritev z oznakami intervalov za plošče s pozitivnimi in negativnimi kontrolami.

datum, dan in čas meritve	oznaka časovnega intervala ( $t_n$ )
14. 2. 2012, torek, 16:00	$t_0$
15. 2. 2012, sreda, 8:00	$t_{16}$
16. 2. 2012, četrtek, 8:00	$t_{40}$
17. 2. 2012, petek, 8:00	$t_{64}$
20. 2. 2012, ponedeljek, 8:00	$t_{136}$

### **3.1.7 Analiza izmerjenih vrednosti**

Izmerjene vrednosti smo s pomočjo programa Excel preuredili v matrike in nato pripravili grafe.

### **3.1.8 Gojišča in ostala kemična sredstva**

Tekoče gojišče Luria-Bertani (LB) za zamrzovanje

Za pripravo 0,5 l tekočega gojišča Luria-Bertani za zamrzovanje v ustrezeno steklovino dodali: 5 g triptona, 2,5 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl, 3,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 22 ml 100 % glicerola, in do 500 ml destilirane vode

Sestavine smo s pomočjo magnetnega mešala Yellow line MSH Basic (IKA, Nemčija) postopoma raztopili v 0,5 l gojišča LB. S pH metrom Orion 520A (Thermo Scientific, ZDA) smo gojišču zagotovili vrednost pH 7,5. Gojišče smo nato razdelili v dve erlenmajerici in sterilizirali v avtoklavu A-21 CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija).

Preglednica 4: Kemična sredstva in raztopine.

kemikalija	proizvajalec	država porekla
ampicilin	Sigma-Aldrich	ZDA
brilliant blue	Sigma-Aldrich	ZDA
CuCl <sub>2</sub>	MerckKgA	Nemčija
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Kemika	Hrvaška
etanol	Kemika	Hrvaška
glicerol (≥ 99%)	Sigma-Aldrich	ZDA
IPTG	Appligene	Francija
karmin	Sigma-Aldrich	ZDA
kongo rdeče	Sigma-Aldrich	ZDA
kristal vijolično	Sigma-Aldrich	ZDA
ksilen cianol	Serva	ZDA
kvasni ekstrakt	Biolife	ZDA
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MerckKgA	Nemčija
MgSO <sub>4</sub>	MerckKgA	Nemčija
NaCl	MerckKgA	Nemčija
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MerckKgA	Nemčija
tripton	Biolife	ZDA

### 3.1.9 Metagnomska knjižnica klonov v eksperimentu

Knjižnice so bile pripravljene po protokolih v predhodnih eksperimentih (Blažič, 2011). V osnovi smo kolonije, ki so nosile plazmide z inserti, oživili in testirali na dodatne aktivnosti z uporabo aromatskih barvil.

## 3.2. PRIPRAVA METAGENOMSKE TABELE IN NADALJNA OBDELAVA PODATKOV

S pomočjo podatkovnih baz (Medline, Google Scholar) smo nabrali članke določenega obdobja s področja metagenomike. Nato smo se v pridobljenih znanstvenih virih

osredotočili na tisti del eksperimentalnih parametrov (okolje vzorčenja, iskana tarča, uporabljeni vektor, povprečna dolžina inserta, število testiranih rekombinant, število pozitivnih klonov), ki so se nam zdeli ključni pri odkrivanju novih tarč s pomočjo metagenomskega pristopa. V programu Excel smo izdelali tabelo, v kateri smo pripravili kategorije prej omenjenih eksperimentalnih parametrov. Vsakemu predstavniku kategorij okolje vzorčenja, iskani tarčni gen ali biomolekula in vektor smo dodelili ustrezno numerično vrednost ali indeks. Pri ostalih kategorijah smo vnesli vrednosti iz eksperimentalnih člankov. Iz teh vrednosti smo nato izračunali nove vrednosti za nove kategorije (velikost knjižnice, koeficient število pregledanih klonov/število najdenih tarč, koeficient število megabaznih parov pregledanih insertov/število najdenih tarč, koeficient število pozitivnih rekombinant/velikost knjižnice).

V nekaterih člankih ni bilo objavljenih vrednosti v eni izmed kategorij (povprečna dolžina inserta, število testiranih rekombinant, število pozitivnih klonov), zato smo s pomočjo preostalih podatkov, ki so v takšnih primerih bili na voljo v članku (npr. velikost knjižnice) izračunali manjkajoče številke ali pustili prazno celico.

Kot pozitivne rekombinate smo vzeli tiste, ki so jih raziskovalci dokazali s pomočjo funkcionalne metagenomike. Lahko je šlo za enkraten pregled željene fenotipske lastnosti (t.i. funkcionalni pregled) ali tudi dvakraten. V primeru dvojnega testiranja (istih) fenotipskih lastnosti, smo upoštevali pozitivne rezultate slednjega testiranja.

Ko smo vnesli podatke in uredili celotno tabelo smo preverili še, če je prišlo do podvojevanja člankov oz. podatkov. Poslužili smo se naslednjega postopka:

- S funkcijo iskanja v programu Excel smo preverili ponavljanje imena in priimka vsakega posameznega avtorja v vsakem članku.
- Pri člankih, kjer so se pojavljale osebe z istim imenom in priimkom, smo preverili kraj vzorčenja.
- Če se je poleg imena in priimka ujemal še kraj vzorčenja, smo v tabeli pustili samo en članek in ostale zavrgli.

Zadnji korak priprave podatkov je obsegal tri dele. Prvi je bil izračun povprečnih vrednosti nekaterih parametrov (povprečna dolžina inserta, število testiranih rekombinant, število pozitivnih rekombinant, velikost knjižnice, koeficient število pregledanih klonov / število najdenih tarč, koeficient število megabaznih parov pregledanih insertov/število najdenih tarč, koeficient število pozitivnih rekombinant/velikost knjižnice, ter pripadajočih standardnih deviacij) za posamezni vektor. V drugem smo določili deleže posameznih tarč z ozirom na vrsto vektorja. V zadnji tretjini smo iz vrednosti indeksiranih kategorij pripravili posebne izvozne matrike za program PAST (Hammer in sod., 2001) s katerim smo nato izrisali ordinacijske grafe (Zavec, 2015). S pomočjo nemetričnega večrazsežnognega lestvičenja (NM-MDS) smo iz vrednosti posameznih parametrov

izračunali oddaljenosti posameznih parametrov iz literature (oz. že prej pripravljene tabele) v obliki matrike (t.i. distančna matrika). Distančno matriko smo nato prikazali v obliki dvodimenzionalnega grafa (Zavec, 2015). Neparametrična večvariantna analiza variance (NP-MANOVA) pa analizira oz. primerja dve ali več skupin (podatkov) med seboj (Hammer in sod., 2001).

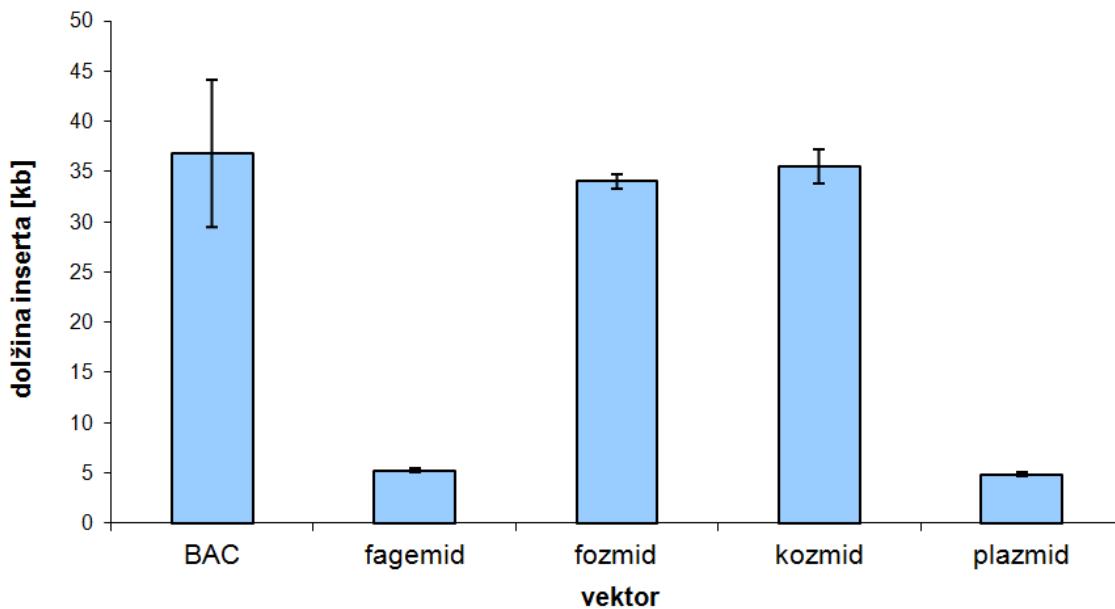
## 4 REZULTATI

### 4.1 PARAMETRI METAGENOMSKIH KNJIŽNIC

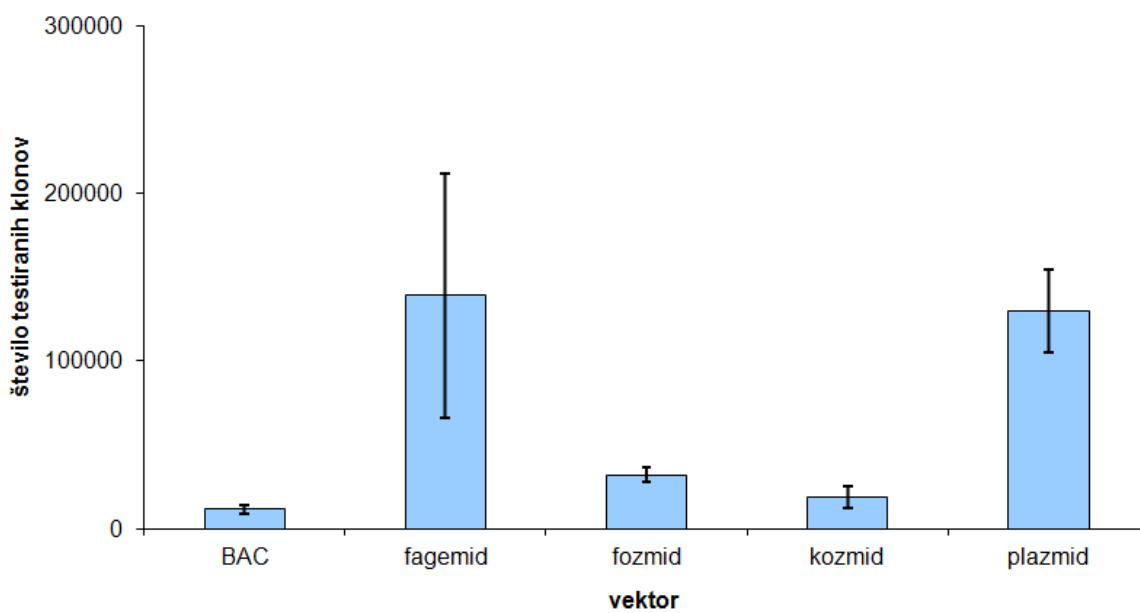
#### 4.1.1 Vektorji

Pregledali smo 107 člankov, v katerih so analizirali 182 vzorcev, torej metagenomskih knjižnic. V povprečju smo največje fragmente DNK zasledili pri bakterijskih umetnih kromosomih (36,86 kb), najnižje pri plazmidih (4,86 kb). Na sliki 10 je mogoče razbrati, da so pri fagemidih vrednosti insertov zelo blizu velikosti plazmidnih vključkov. Pri preostalih dveh vektorjih so dolžine vstavkov bližje BAC (34,02 kb pri fozmidih in 35,51 kb pri kozmidih). Najvišjo variacijo imamo pri BAC. Kot je razvidno iz slike 11 je v povprečju največje število testiranih klonov zgrajenih iz plazmidov in fagemidov. Pri slednjih je razpon vrednosti največji. Najmanj testiranih rekombinat imamo pri fozmidih (približno 32123), BAC (približno 11407), kozmidih (približno 18780). Najmanjše knjižnice glede na število vključenih baz DNK so pripravili s pomočjo BAC. Na sliki 12 lahko opazimo, da so v povprečju s pomočjo fozmidov izdelali največje knjižnice. Pri vseh vektorjih, ki smo jih preučevali, smo opazili veliko razpršenost vrednosti (velikosti knjižnic), največja je bila pri fagemidih, najmanjša pri plazmidih in BAC. Uspešnost odkrivanja tarčnih genov je bila prvi vseh tehnikah precej podobna (Slika 13). S pomočjo fozmidnih vektorjev so raziskovalci dobili največ pozitivnih klonov (približno 22). Pri ostalih vektorjih so te vrednosti precej nižje: BAC (približno 8), plazmid (približno 5), fagomid (približno 4), kozmid (približno 3).

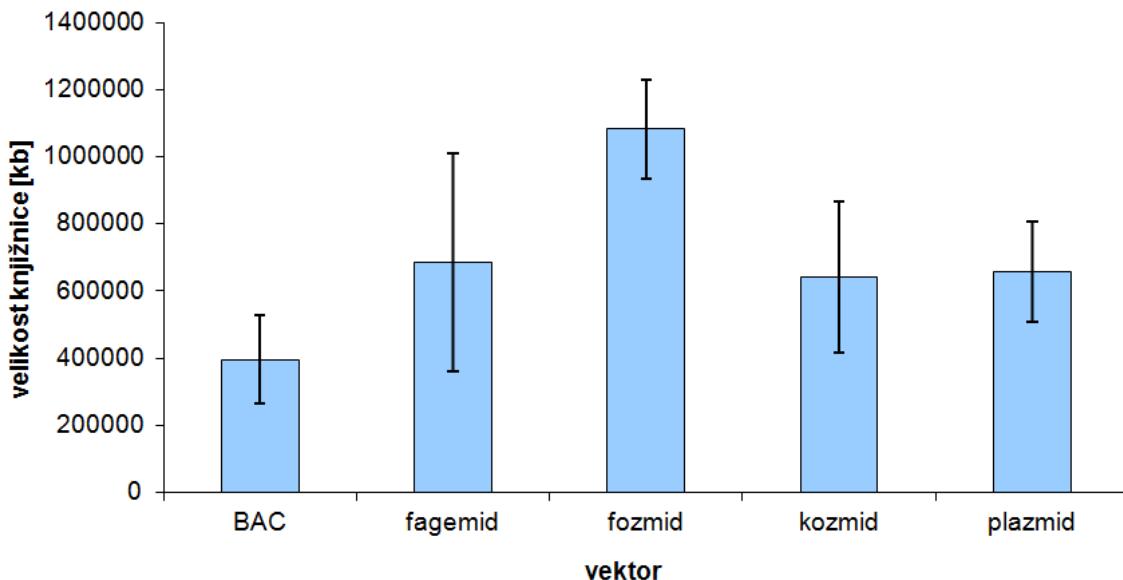
Na sliki 14 opazimo, da je najmanjše število pozitivnih rekombinant glede na število pregledanih celic, značilno za fagemide in plazmide. Največji uspeh so raziskovalci dosegali z uporabo BAC (približno en pozitiven klon na 3768 pregledanih), kozmidov (približno en pozitiven klon na 7219 pregledanih) in fozmidov (približno en pozitiven klon na 12647 pregledanih). Pri fagemidih je razpršenost vrednosti uspešnosti iskanja tarč najvišja. Pri fagemidih, fozmidih in plazmidih se povprečne velikosti knjižnic na odkrit pozitiven klon zelo malo razlikujejo (slika 15). Najnižjo vrednost (približno 123626 kb na pozitivno rekombinanto) smo zasledili pri bakterijskih umetnih kromosomih. Z izjemo bakterijskih umetnih kromosomov, imamo podoben razpon vrednosti razmerja.



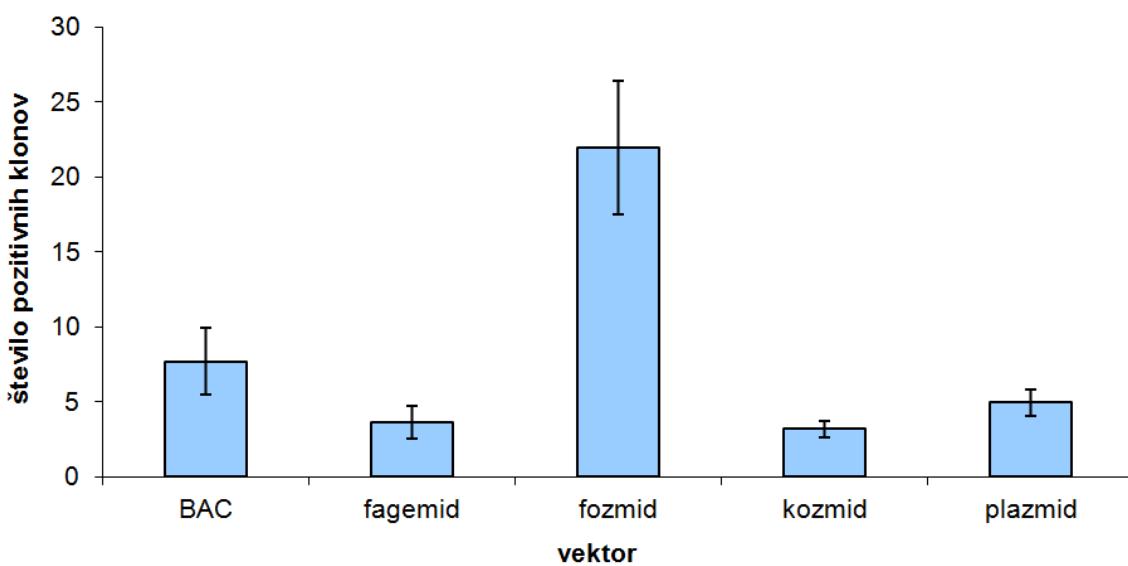
Slika 10: Povprečna dolžina inserta pridobljena iz strokovne literature za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo  $\pm$  en standardni odklon.



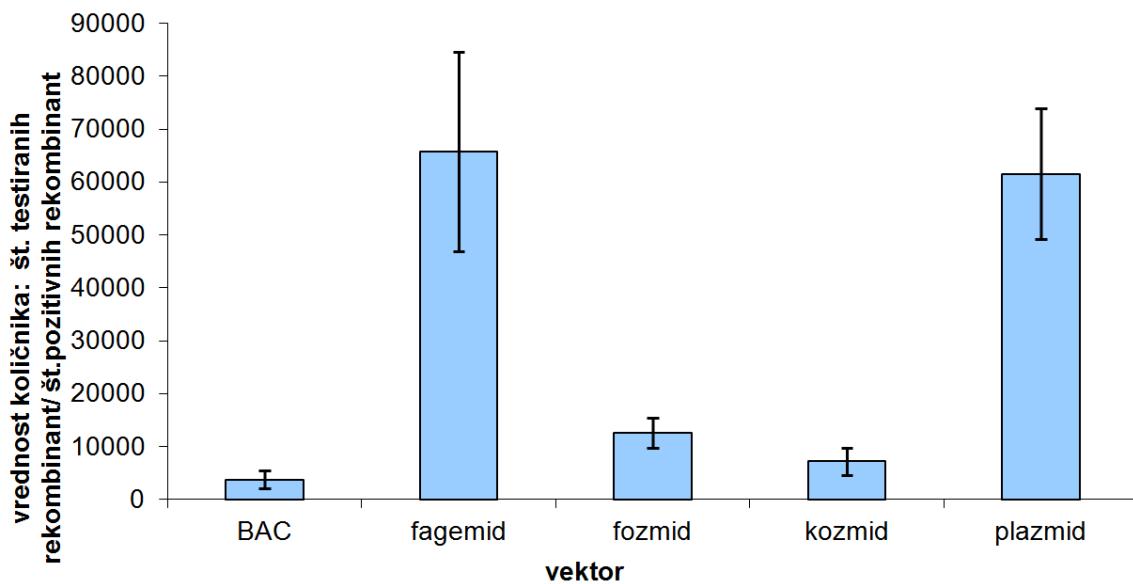
Slika 11: Povprečno število testiranih rekombinant pridobljene iz strokovne literature za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo  $\pm$  en standardni odklon.



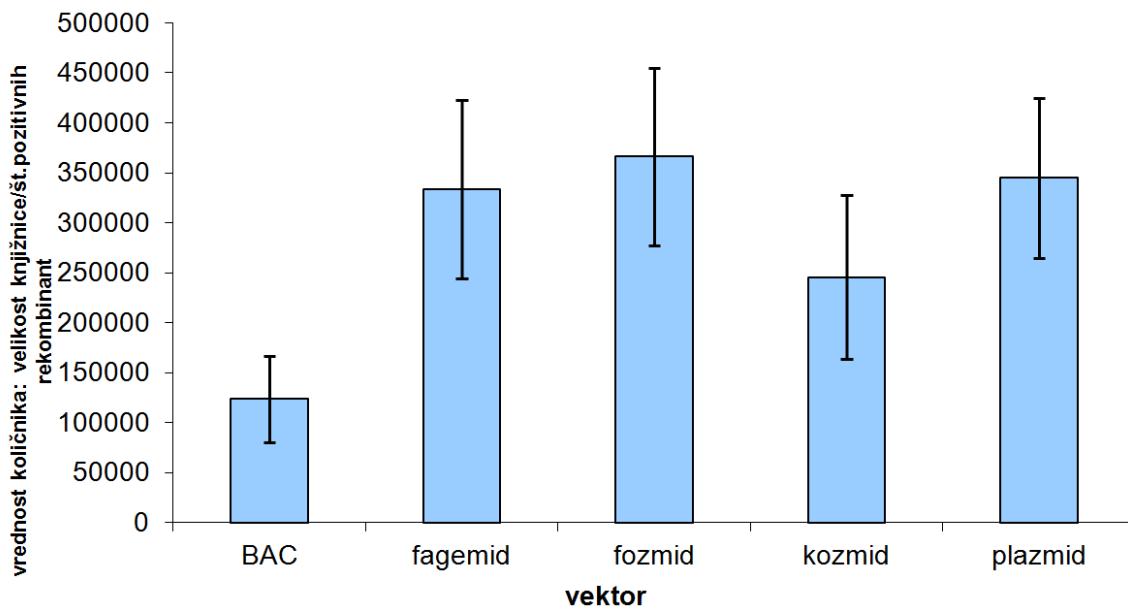
Slika 12: Povprečna število velikosti knjižnic pridobljenih iz strokovne literature za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo  $\pm$  en standardni odklon.



Slika 13: Povprečno število pozitivnih klonov pridobljenih iz strokovne literature za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo  $\pm$  en standardni odklon.



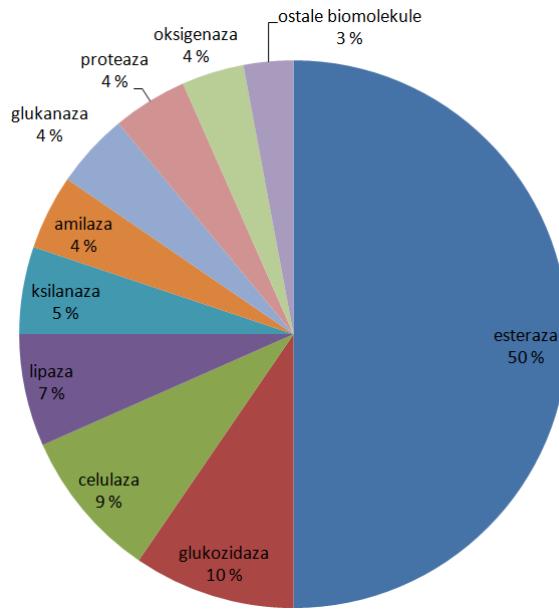
Slika 14: Povprečna vrednost razmerja: št. testiranih rekombinant/ št. pozitivnih rekombinant za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo  $\pm$  en standardni odklon.



Slika 15: Povprečna vrednost razmerja med velikostjo knjižnice in številom pozitivnih rekombinant za posamezno vrsto vektorja. Ocene napake prikazujejo  $\pm$  en standardni odklon.

#### 4.1.2 Analiza sestave tarčnih genov v funkcionalnih metagenomskih knjižnicah

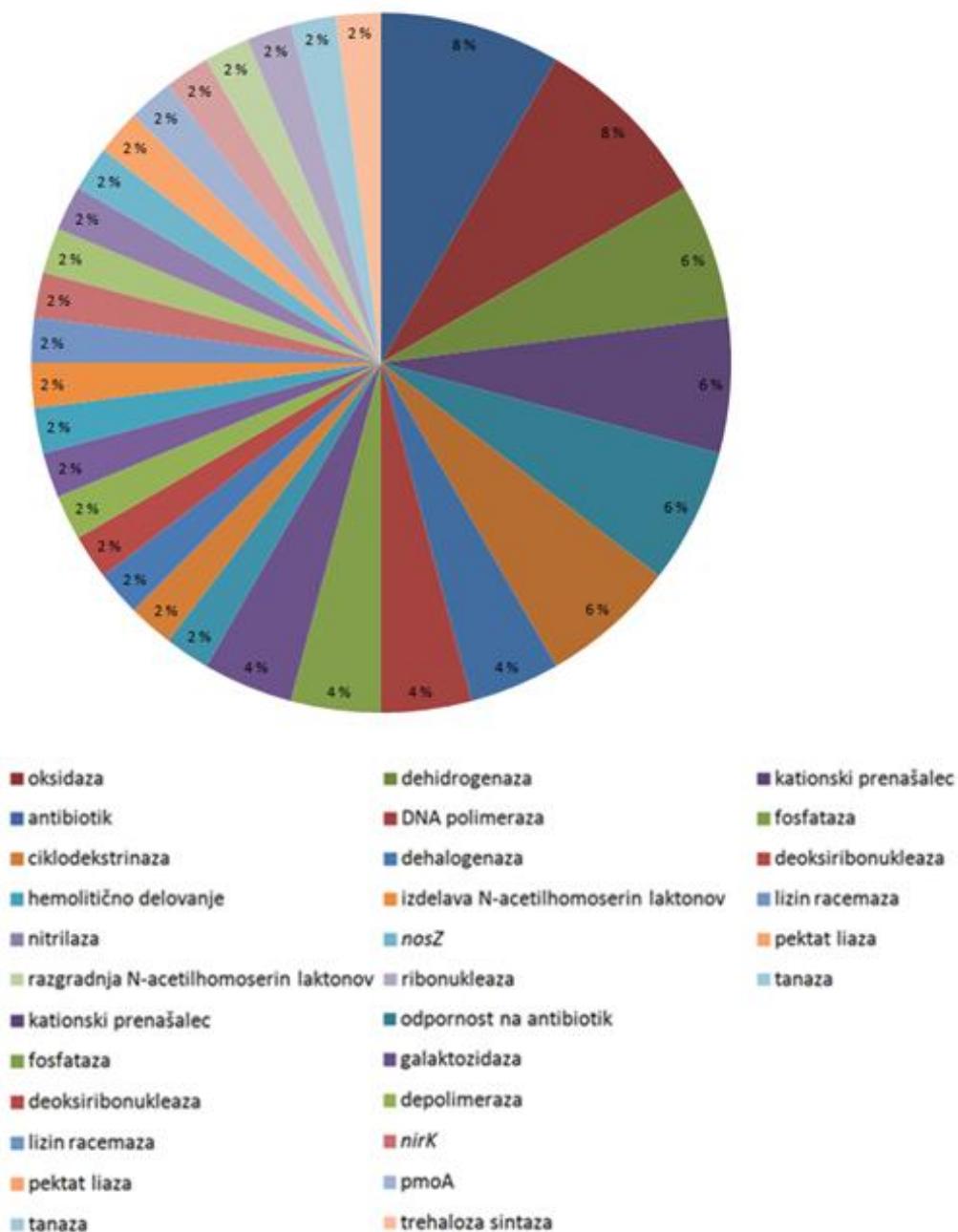
Kot lahko razberemo iz spodnje slike (Slika 16) polovico odkritih tarč predstavlja esteraze. Sledijo glukozidaze (10 %), celulaze (9 %), lipaze (7 %) in ksilanaze (5 %). Manjši delež (tj. 4 %) od ksilanaz dosegajo amilaze, glukanaze, proteaze in oksigenaze.



Slika 16: Grafično-numerični prikaz zastopanosti posameznih vrst biomolekul odkritih s pomočjo funkcionalne metagenomike.

Od preostanka (3 %) lahko vse tarče razdelimo na (Slika 17):

- večinski del (tj. približno 58 % kategorije ‘ostale biomolekule’) predstavljajo: odpornost na nikelj, oksidaza, dehidrogenaza, kationski prenašalec, odpornost na antibiotik, protibakterijsko delovanje, antibiotik, DNK polimeraza, fosfataza, galaktozidaza.
- manjšinski del: Tu je precej različnih tarč kot v večinskem delu in vsaka tarča predstavlja približno 2 % kategorije ‘ostale biomolekule’.



Slika 17: Grafično-numerični prikaz zastopanosti posameznih vrst biomolekul v podskupini Ostale biomolekule odkritih s pomočjo funkcionalne metagenomike.

Tri vrste vektorjev so raziskovalci uporabili pri iskanju (Slika 18):

- oksigenaz: Uporabljeni vektorji so fozmid, kozmid in plazmid pri čemer s po približno 40 % prevladujeta plazmid in kozmid.
  - proteaz: približno 70% vektorjev predstavlja plazmid.

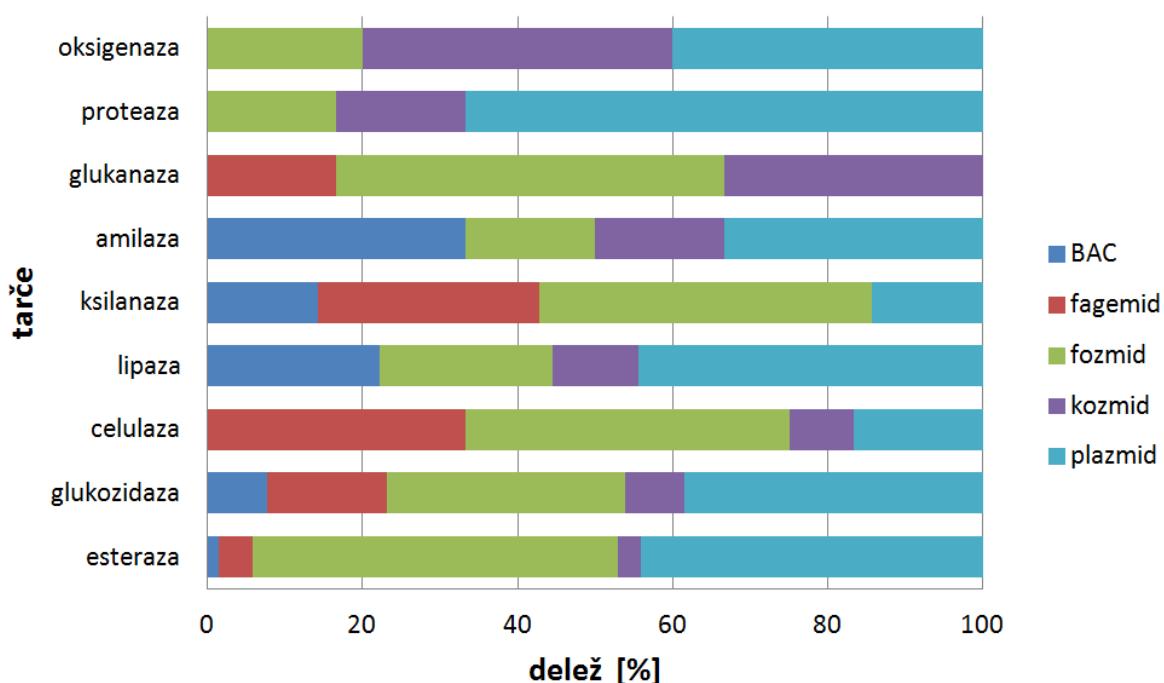
- glukanaz: V tem primeru so se poleg fozmidov in kozmidov (približno 82 % vseh vektorjev) poslužili še fagemidov.

Pri dokazovanju naslednjih encimov so bili uporabljeni 4 vektorji:

- amilaze: BAC (33 %), fozmid (17 %), kozmid (17 %) in plazmid (33 %)
- ksilanaze: BAC (14 %), fagemid (29 %), fozmid (43 %) in plazmid (14 %)
- lipaze: BAC (22 %), fozmid (22 %), kozmid (11 %), plazmid (44 %)
- celulaze: fagemid (33 %), fozmid (42 %), kozmid (8 %), plazmid (17 %).

V primeru glukozidaz in esteraz so se znanstveniki poslužili 5 različnih vektorjev (BAC, fagemid, fozmid, kozmid in plazmid). V obeh primerih prevladujejo plazmidi (39 % pri glukozidazah in 44 % pri esterazah) in fozmidi (31 % pri glukozidazah in 47 % pri esterazah).

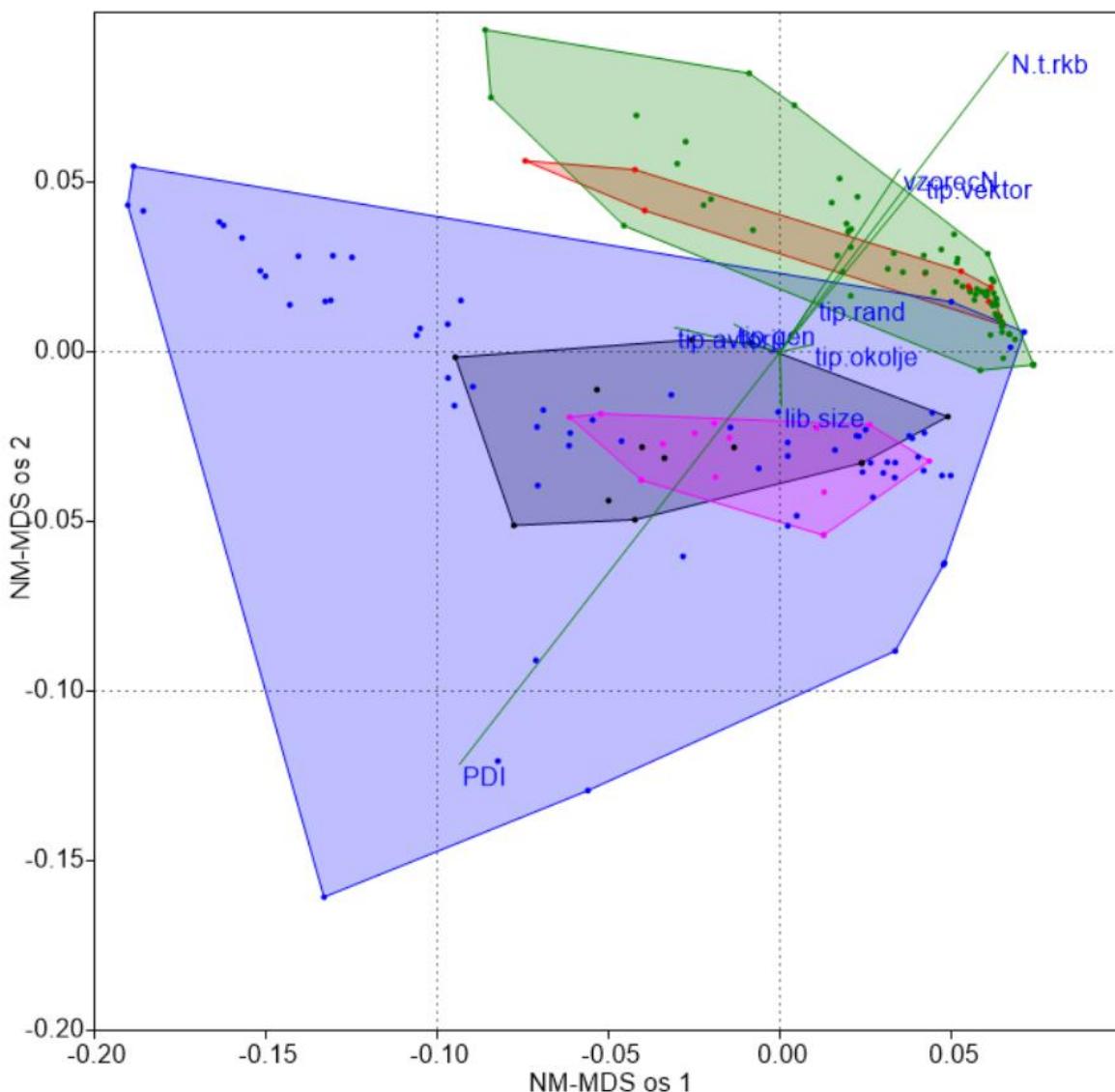
Izmed 9 najbolj pogostih tarčah iz pregledane literature, so raziskovalci uporabili plazmide v manj kot 20% v naslednjih primerih: glukanaze, ksilanaze in celulaze.



Slika 18: Grafični prikaz deleža posameznih vektorjev uporabljenih (za pripravo genskih knjižnic) pri odkrivanju 9 najpogostejših tarč.

#### 4.1.3 Multivariatna analiza funkcionalnih metagenomskih knjižnic

Z namenom, da bi ugotovili parametre, ki so povezani z uspešnostjo odkrivanja tarčnih zaporedij v funkcionalnih metagenomskih knjižnicah, smo izvedli analizo parametrov, ki so jih avtorji navedli v svojih člankih. Iz pripravljene matrike metapodatkov o izdelavi 182 metagenomskih knjižnic smo z NM-MDS poiskali parametre, ki so najbolj povezani z variabilnostjo v ugotovljenih parametrih uspešnosti odkrivanja tarčnih zaporedij v teh knjižnicah. Glede na relativno majhen obseg napetosti v ordinaciji (Slika 19) lahko sklepamo, da so odnosi med originalnimi podatki ter temi predstavljenimi v 2D ordinaciji dovolj ohranjeni. Enako informacijo nam potrjuje tudi Shepardov graf. Število testiranih recombinant (N.t.rkb), zaporedna oznaka vzorca (vzorecN) in tip vektorja (tip.vektor) so bili vsi med seboj v tesni korelaciji. Največji vpliv na uspešnost odkrivanja je v tej preliminarni analizi pokazal parameter povprečna dolžina inserta, ki je izkazal negativno korelacijo z drugim najpomembnejšim parametrom, številom testiranih rekombinant v objavljenih studijah. Proti pričakovanju so imeli majhno povezanost z razpršenostjo podatkov parametri okolje, tip tarčnega gena, avtorstvo in velikost knjižnice (tip.okolje, tip.gen, tip.avtor, lib.size). Glede na usmerjenost vektorjev sklepamo, da k razpršenosti po x osi najbolj prispevajo prav ti širje parametri, oziroma interakcije med njimi. Zanimivo se nam zdi to, da velikost inserta ter velikost knjižnice ne sovpadata. Za bolj podrobne analize bi morali v nadaljevanju opraviti še druge poglobljene teste. V nadaljevanju smo opravili tudi test, ali se naše skupine knjižnic, ločene glede na tip vektorja, signifikantno ločijo. Neparametrična večvariantna analiza variance je pokazala, da so si lastnosti pripravljenih funkcionalnih metagenomskih knjižnic glede na iz študij dostopne podatke med seboj signifikantno različne ( $p<0.05$ ).



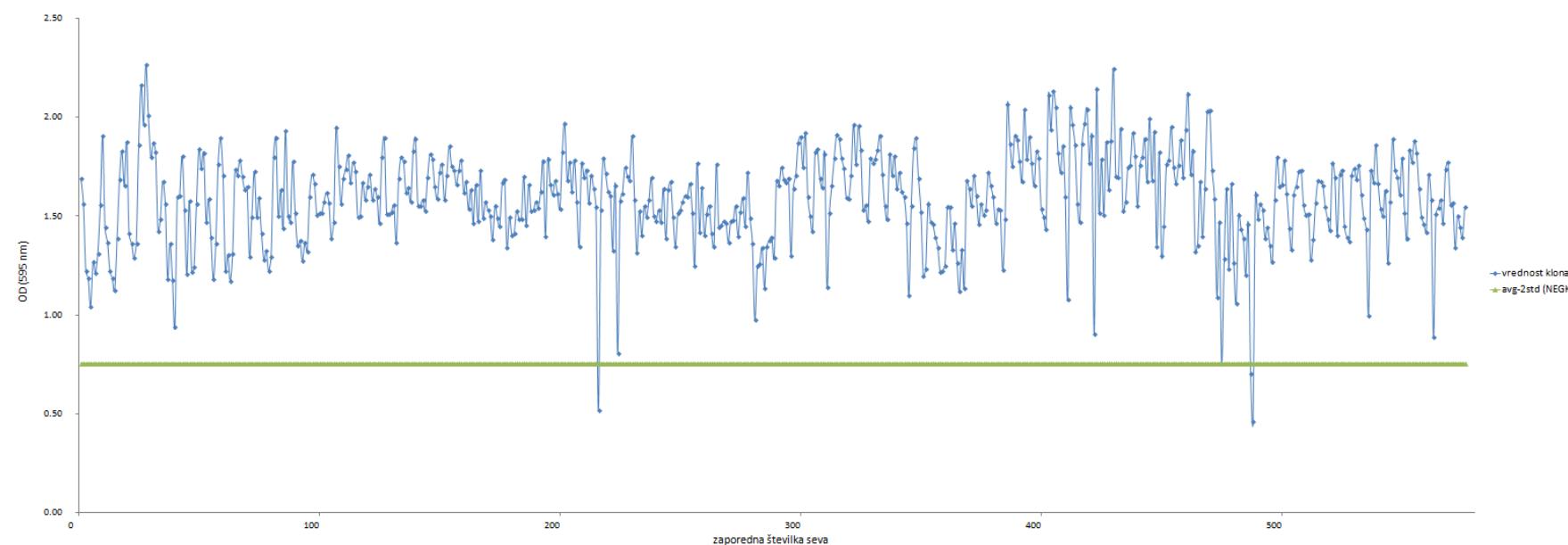
Slika 19: Ordinacijska analiza eksperimentalnih parametrov, ki razložijo raztres uspešnosti odkrivanja novih tarčnih zaporedij. Podatki so bili pripravljeni iz metapodatkov v posameznih študijah. Napetost=0.14. Skupine so obarvane glede na tip vektorja: BAC (črna), fagemid (rdeča), fosmid (modra), kozmid (roza), plazmid (zelena). Ostale oznake: število testiranih rekombinant (N.t.rkb), zaporedna oznaka vzorca (vzorecN), tip vektorja (tip.vektor), tip okolja (tip.okolje), tip tarčnega gena (tip.gen), avtorstvo (tip.avtor), velikost knjižnice (lib.size).

#### 4.2 OKSIGENAZNA AKTIVNOST

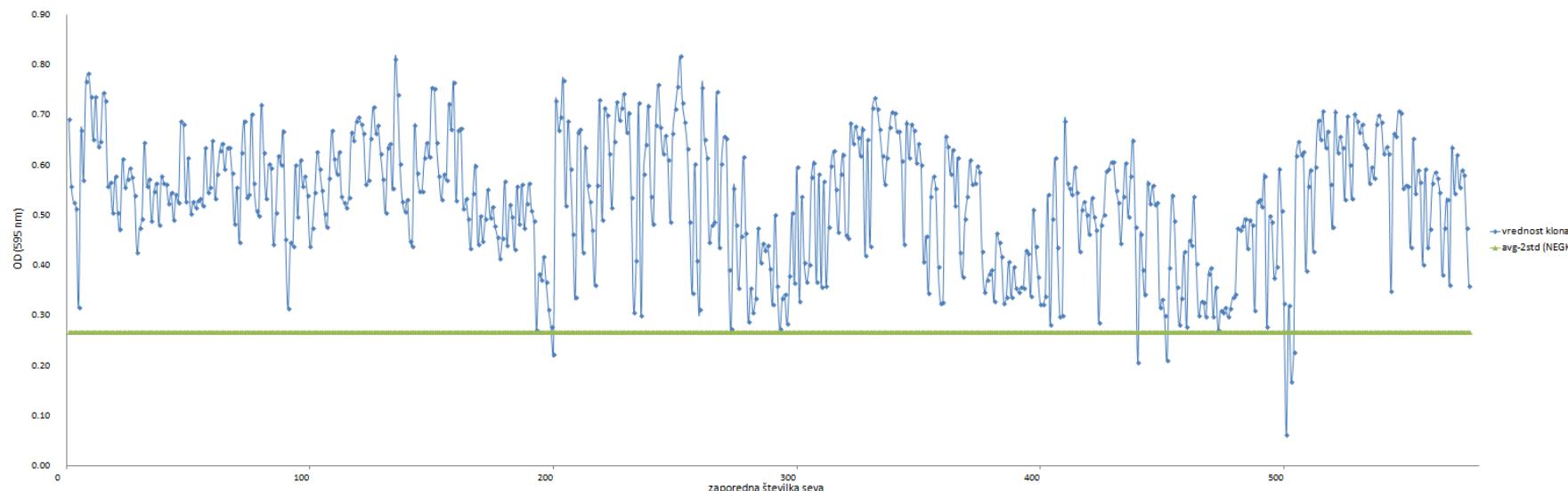
Pri določanju oksigenazne aktivnosti smo po 64 urah odčitali razgradnjo 5 različnih barvil s strani rekombinantnih sevov pri različnih valovnih dolžinah, ter spremembe pri negativnih kontrolah zaradi inkubacije. Negativno kontrolo, ki smo ji odšteli dve standardni deviaciji, smo uporabili kot spodnji interval, kjer se lahko nahaja šum naših meritov. Tekom rasti, bi vsi tisti kloni, ki vsebujejo gene za oksigenaze in druge gene za razgradnjo barvil, s svojo aktivnostjo zniževali vsebnost barvila v jamicah. Zato pridejo za pozitivne klone oz. kandidate za prisotnost oksigenaznih genov v poštev tisti sevi, ki imajo nižje vrednosti kot negativne kontrole (tj. pod vrednostjo, ki jo tvori seštevek povprečne vrednosti negativne kontrole in dvakratna vrednost standardne deviacije).

Po strukturi lahko barvila uporabljena v eksperimentu razvrstimo v 2 skupini (Priloga A - Priloga E). V prvi skupine spojine (ksilen cianol, kristal vijolično in brilliant modro), kjer je osnovno ogrodje sestavljeno iz 3 med seboj povezanih aromatskih obročev. Na vsak aromatski obroč so pripete funkcionalne skupine ali še dodaten obroč. V drugi skupini imamo spojini, ki vsebujujo kondenzirane aromatske obroče (karmin in kongo rdeče).

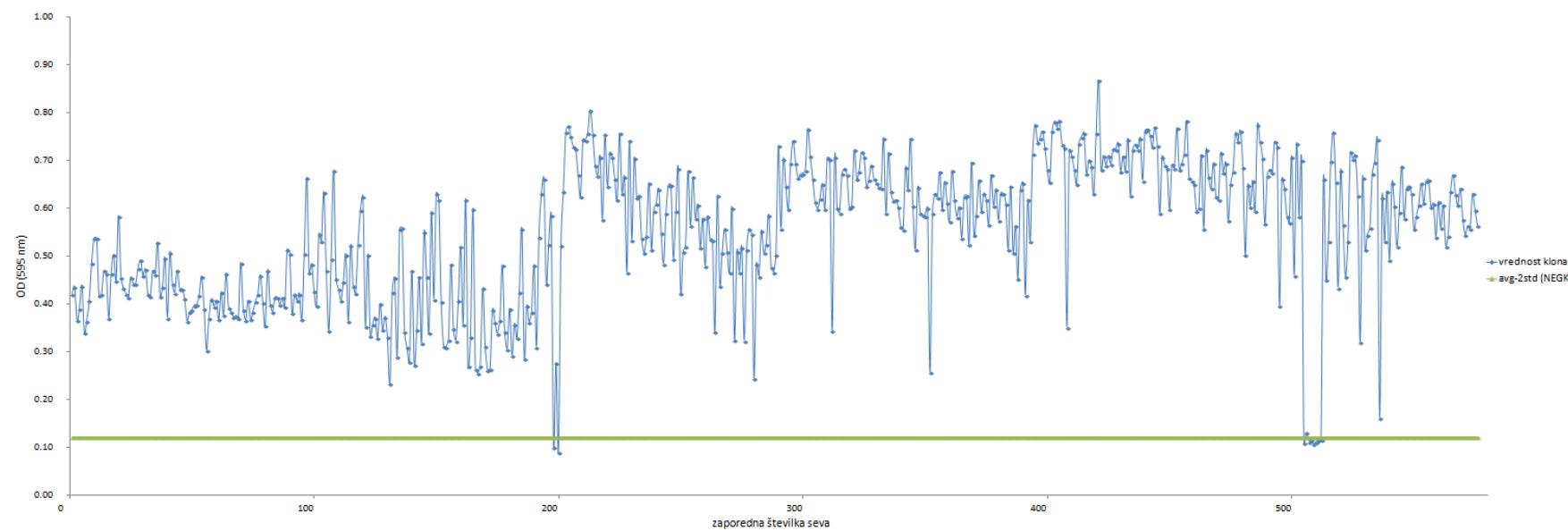
Največ klonov razgrajuje ksilen cianol (18). Sledijo kongo rdeče (9 sevov), karmin (6 sevov), in brilliant blue (3 sevi). Čeprav je barvilo kristal vijolično najbolj enostavno zgrajeno, nismo odkrili sevov, ki bi lahko razgradili to spojino. Po drugi strani smo dokazali 3 možne kandidate za razgradnjo brilliant blue, enega izmed najkompleksnejših barvil (slika 20). Med kloni smo odkrili takšen sev, ki lahko razgrajuje tako karmin kot kongo rdeče. Ker pri obeh barvilih najdemo kondenzirane aromatske obroče, lahko sklepamo, da hipotetični encim ali encimski sistem med razgradnjo deluje v obeh primerih na ta del molekule.



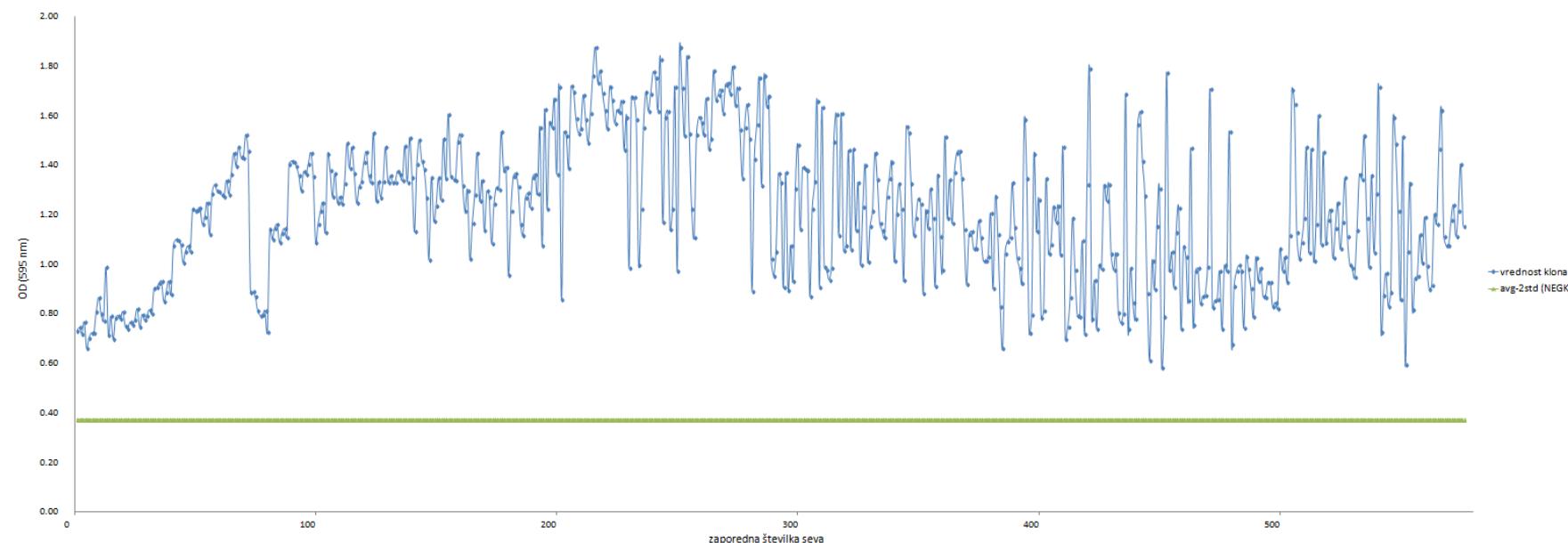
Slika 20: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila brilliant blue s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole.



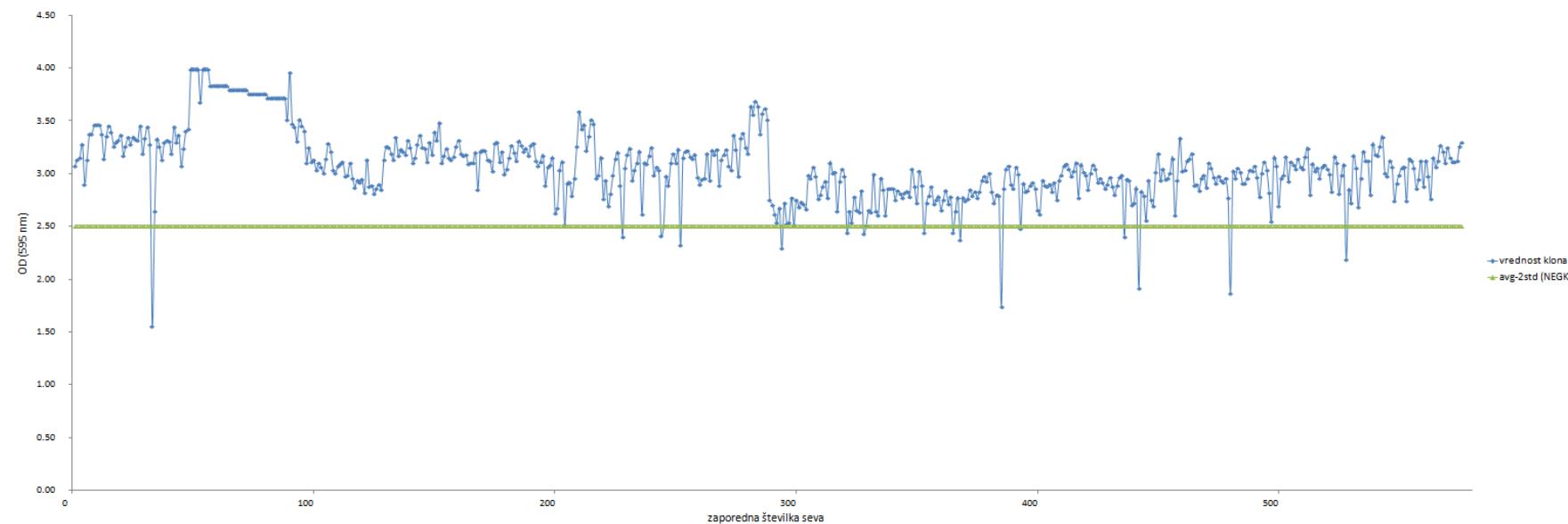
Slika 21: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila karmin s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole.



Slika 22: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila kongo rdeče s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole.



Slika 23: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila kristal vijolično s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole.



Slika 24: Prikaz zazanavanja razgradnje barvila ksilen cianol s pomočjo merjenja optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Zelena črta predstavlja povprečno vrednost negativne kontrole z odštetno dvakratno vrednostjo standardne deviacije negativne kontrole.

Iz priloženih slik (Slike 20-24) je razvidno, da imamo naslednje število kandidatov pri posameznem barvilu:

Preglednica 5: Prikaz odkritih hipotetičnih rekombinantnih sevov z oksigenazno aktivnostjo.

<b>barvilo</b>	<b>zaporedna številka seva</b>	<b>plošča, koordinate jamice</b>
brilliant blue	216	plošča 3, C8
	487	plošča 6, A7
	488	plošča 6, A8
karmin	200	plošča 3, A8
	440	plošča 5, G8
	452	plošča 5, I4
	501	plošča 6, C5
	503	plošča 6, C7
	504	plošča 6, C8
kongo rdeče	198	plošča 3, A6
	200	plošča 3, A8
	505	plošča 6, D1
	507	plošča 6, D3
	508	plošča 6, D4
	509	plošča 6, D5
	510	plošča 6, D6
	511	plošča 6, D7
	512	plošča 6, D8
kristal vijolično	/	/
ksilen cianol	33	plošča 1, E1
	228	plošča 3, E4
	244	plošča 3, G4
	245	plošča 3, G5
	252	plošča 3, H4
	294	plošča 4, A6
	321	plošča 4, E1
	328	plošča 4, E8
	329	plošča 4, F1
	353	plošča 4, I1
	365	plošča 4, J5
	368	plošča 4, J8
	385	plošča 5, A1
	393	plošča 5, B1
	436	plošča 5, G4
	442	plošča 5, H2
	480	plošča 5, L8

Od 576 pripravljenih rekombinantnih sevov smo spektrofotometrično odkrili 35 sevov, ki bi lahko izražali oksigenaze.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Za pridobivanje novih učinkovin iz okolja se lahko poslužujemo metagenomskega pristopa (Aehle in Eck, 2012). Protokol iskanja novih (genskih) tarč iz naravnega okolja je v splošnem sestavljen iz: osamitve DNK iz vzorca, vključevanja DNK v vektorje različnega tipa, izdelavi metagenomskih knjižnic in pregleda pridobljenih klonov (Handelsman, 2004) s funkcionalnim izražanjem in/ali sekvenciranjem. V naši raziskavi smo proučili povezanost med praktičnimi in teoretičnimi vidiki metagenomskega načina pridobivanja oz. iskanja aktivnih učinkovin iz okolja. V ta namen smo izvedli analizo objavljenih študij s področja funkcionalne metagenomike ter izvedli eksperiment z izražanjem metagenomskih transformant.

Iz analize literature lahko razberemo, da večina danes uporabljenih protimikrobnih sredstev za zdravljenje bolezenskih stanj pri ljudeh in živali izvira iz tal (Nesme in Simonet, 2014). Delež odkritih protimikrobnih snovi s pomočjo metagenomskega pristopa iz pregledanih člankov je precej nizek (12,6 % skupine tarč imenovane Ostale biomolekule oz. 0,378 % vseh odkritih biomolekul), kar je glede na potencial, ki ga študije omenjajo v literaturi, presenetljivo malo, glede na celokupen svetovni pogon, vložena sredstva, razvoj novih tehnologij, število člankov.

Največji vpliv na uspešnost odkrivanja je v tej preliminarni analizi pokazal parameter povprečna dolžina inserta, ki je izkazal negativno korelacijo z drugim najpomembnejšim parametrom, številom testiranih rekombinantnih sevov v objavljenih študijah. Torej je uspešnost odkrivanja tarč odvisna hkrati od dolžine inserta kot števila testiranih rekombinantnih sevov. Dolžina inserta pogojuje število vključenih genov, kar je v večji meri bolj termodinamsko-kemijski proces priprave knjižnic. Nasprotno je število pregledanih rekombinantnih sevov čisto v domeni raziskovalca, ki ponavadi preneha s pregledovanjem klonov kmalu potem, ko je nekaj tarčnih genov že našel. Ravno tako ostaja odprt vprašanje, koliko negativnih študij je bilo narejenih, ki z uporabo tovrstnih orodij niso našle nobenega tarčnega gena, in posledično niso bile objavljene. Za določitev obsega takih študij ne obstaja nobeno orodje.

Proti pričakovanju so imeli majhno povezanost z razpršenostjo podatkov parametri okolje, tip tarčnega gena, avtorstvo, velikost knjižnice (tip.okolje, tip.gen, tip.avtor, lib.size). Glede na usmerjenost vektorjev sklepamo, da k razpršenosti zgolj po x osi najbolj prispevajo prav ti širje parametri, oziroma tudi interakcije med njimi. Zanimivo se nam zdi to, da velikost inserta ter velikost knjižnice ne sovpadata, kar kaže na to, da so najverjetneje prisotni še drugi parametri odločanja, ki vplivajo na uspešnost odkrivanja tarčnih genov. Za bolj podrobne analize bi morali v nadaljevanju opraviti še druge poglobljene analize in teste. V nadaljevanju smo opravili tudi test, ali se naše skupine

knjižnic, ločene glede na tip vektorja, signifikantno ločijo. NM-MANOVA je pokazala, da so si lastnosti pripravljenih funkcionalnih metagenomskih knjižnic glede na iz študij dostopne podatke med seboj signifikantno različne ( $p<0.05$ ). Zato je prav presenetljivo, da imajo nominalno gledano, vsi ti različni pristopi k zajemanju genetskega materiala iz DNK iz okolja tako podobno uspešnost odkrivanja tarčnih genov (5-20 na študijo).

Glede na opravljene analize podatkov zbranih iz objavljene literature sklepamo, da je tak način iskanja novih učinkovin precej neučinkovit, oziroma da je razmerje med vloženim delom, številom dobljenih tarč, ter njihovo dejansko industrijsko uporabnostjo, precej omejeno. Obstaja namreč velika verjetnost, da pridobljeni encimi iz narave s funkcionalno metagenomiko ali sekvenciranjem, po lastnostih niso funkcionalno nič bolj uporabni v industrijske namene od danes že poznanih zaporedij iz narave.

Če primerjamo našo raziskavo s podobnimi študijami odkrivanja oksigenaz (Suenaga in sod., 2007; van Hellemond in sod., 2007; Lämmle in sod., 2007), ugotovimo, da smo pregledali precej manjše število rekombinantnih sevov, vendar smo bili precej bolj uspešni pri odkrivanju možne DNK z zapisom za oksigenaze izražene iz vsebine kunčega prebavnega trakta. Ali je to posledica izbire okolja ali sistemov testiranja, ne moremo z gotovostjo trditi. V nadaljevanju bi bilo smiselno kandidatne klone dodatno analizirati in jim v ožjem izboru natančneje določiti njihovo aktivnost pri razgradnji aromatskih spojin, določiti kinetiko ter optimum razgradnje glede na fizikalno kemijske parametre ter preko sekvenciranja nukleotidnih zaporedij določiti njihova aminokislinska zaporedja in s tem določiti podobnost z drugimi že znanimi encimi.

Na podlagi opravljenih analiz in eksperimentov lahko sprejmemo naslednje sklepe:

- Vsi parametri priprave metagenomskih knjižnic niso enako pomembni za uspešnost odkrivanja tarčnih genov. S tem smo zavrnili našo prvo hipotezo.
- Uspešnost izražanja tarčnih genov iz okolja v metagenomskih knjižnicah je najbolj povezana z izbiro ustreznih vektorjev in od števila testiranih klonov. S tem smo potrdili drugo hipotezo, če izvzamemo ugotovitev, da uspešnost odkrivanja tarčnih genov ni zelo povezana z izbiro vzorca, niti s tipom ciljanega gena.
- Klonirana zaporedja oksigenaz po ekspresiji nimajo podobnih encimskih aktivnosti. S tem smo zavrnili našo tretjo hipotezo.
- Preko tehnik iskanja osamelcev v velikem številu izmerjenih aktivnosti klonov, lahko enostavno ugotovimo klone z visoko aktivnostjo.

- Vseh pet različnih pristopov k zajemanju in ekspresiji genetskega materiala iz DNK iz okolja ima nominalno gledano podobno uspešnost odkrivanja tarčnih genov (5-20 na študijo), kar je relativno malo, glede na vložen obseg dela, ter neznano uporabno vrednost dobljenih zaporedij.

## 6      POVZETEK

Oksigenaze so vrsta oksidoreduktaz, ki direktno vgrajujejo kisikov atom v organske spojine. Na osnovi števila vgrajenih kisikovih atomov v substrat ločimo mono- in dioksigenaze. Okisigenaze delujejo v številnih bioloških sistemih oz. metabolnih poteh ter so zanimive tudi z biotehnološkega vidika. Eden od načinov pridobivanja encimov je tudi s pomočjo metagenomike. Gre za mlado interdisciplinarno vedo, ki omogoča analizo celotne mikrobne genomske DNK določenga okolja. Z metagenomskim pristopom izolirano DNK iz okolja očistimo, kloniramo v izbranem vektorju, pripravimo genomske knjižnice in le-te analiziramo.

V pričujočem diplomskem delu smo izvedli raziskavo iz dveh delov na temo metagenomike. Zanimala nas je povezanost med praktičnimi in teoretičnimi vidiki metagenomskega iskanja bioloških učinkovin iz okolja.

V prvem delu smo s pomočjo statističnih orodij analizirali različne metagenomske parametre in določali kateri parametri iz izbrane literature s področja funkcionalne metagenomike določajo uspešnost odkrivanja tarčnih zaporedij. Pregledali smo 107 člankov, ki so vsebovali analize 182 vzorcev. Največje fragmente DNK so vsebovali BAC, najmanjše plazmidi. Pri vseh preučenih vektorjih je značilna velika razpršenost vrednosti velikosti knjižnic. Ne glede na izbor tehnike, so raziskovalci dosegli zelo podobno uspeh pri odkrivanju tarčnih zaporedij. Najmanjše število pozitivnih rekombinantnih sevov glede na število pregledanih celic je značilno za fagemide in plazmide. Največji uspeh so raziskovalci dosegali z uporabo BAC. Iz člankov smo razbrali, da približno polovico vseh odkritih tarčnih molekul predstavljajo esteraze. Pri 3 izmed 9 najbolj pogosto odkritih tarč je razvidno, da so raziskovalci uporabili plazmide v manj kot 20%. S pomočjo multivariatne analize funkcionalnih metagenomskih knjižnic smo ugotovili, da so odnosi med originalnimi podatki ter temi predstavljenimi v 2D ordinaciji dovolj ohranjeni. Iz naših *in silico* analiz je razvidno, da imata število testiranih rekombinantnih sevov in dolžina inserta največji vpliv pri odkrivanju novih genov iz okoljske mikrobiote. Preučene metagenomske knjižnice iz literature se precej ločijo med sabo, vendar imajo (po dostopnih podatkih) vsi preučeni pristopi pridobivanja okoljske DNK nizek nivo uspešnosti odkrivanja novih tarč glede na vloženo delo.

V drugem delu smo spektrofotometrično določali oksigenazno aktivnost rekombinantnih sevov pripravljenih iz mikrobnih izolatov kunčjega feca. Pripravili smo plošče z ustreznim gojiščem, barvili in že predhodno pripravljenimi rekombinantnimi sevi. S pomočjo spektrofotometra smo v določenem časovnem intervalu sledili in beležili vse spremembe v ploščah. Na ta način smo pregledali 567 metagenomskih transformant in pri tem odkrili 35 sevov, ki bi lahko izražali oksigenaze. Pri tem nismo odkrili niti enega seva, ki bi razgrajeval barvilo kristal vijolično. Izmed 35 potencialnih kandidatov za oksigenaze,

je en sev razgrajeval tako karmin kot kongo rdeče. Možna zaporedja oksigenaz v sevih, ki smo jih pripravili iz kunčjih iztrebkov, imajo precej drugačne encimske aktivnosti. V primerjavi z drugimi študijami odkrivanja oksigenaz, smo preučili mnogo manjše število metagenomskih transformant, vendar smo bili uspešnejši pri odkrivanju potencialnih DNK zaporedij z zapisom za oksigenaze.

## 7 VIRI

- Aehle W., Eck J. 2012. Discovery of enzymes. 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim, Wiley-VCH: 67 - 88
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1: 143-169.
- Bergmann J.C., Costa O.Y., Gladden J.M., Singer S., Heins R., D'haeseleer P., Simmons B.A., Quirino B.F. 2014. Discovery of two novel β-glucosidases from an Amazon soil metagenomic library. *FEMS Microbiology Letters*, 351, 2: 147-155
- Biver S., Vandenbol M. 2013. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 2: 191-200
- Blažič B. 2011. Razvoj genetskih orodij za pripravo metagenomskih knjižnic industrijsko pomembnih encimov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 66 str.
- Brennan Y., Callen W.N., Christoffersen L., Dupree P., Goubet F., Healey S., Hernández M., Keller M., Li K., Palackal N., Sittenfeld A., Tamayo G., Wells S., Hazlewood G.P., Mathur E.J., Short J.M., Robertson D.E., Steer B.A. 2004. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6: 3609-3617
- Bugg T.D.H. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59, 36: 7075–7101
- Bunterngsook B., Kanokratana P., Thongaram T., Tanapongpipat S., Uengwetwanit T., Rachdawong S., Vichitsoonthonkul T., Eurwilaichitr L. 2010. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 9: 1848-1854
- Carballeira J.D., Quezada M.A., Hoyos P., Simeó Y., Hernaiz M.J., Alcantara A.R., Sinisterra J.V. 2009. Microbial cells as catalysts for stereoselective redox reactions. *Biotechnology Advances*, 27, 6: 686-714
- Chang L., Ding M., Bao L., Chen Y., Zhou J., Lu H. 2011. Characterization of a bifunctional xylanase/endoglucanase from yak rumen microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 6: 1933-1942
- Chemical Book. 2016. Carmine. Beijing, Chemical Book: 1str.  
<http://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1260-17-9.gif> (september 2016)
- Chen I.C., Lin W.D., Hsu S.K., Thiruvengadam V., Hsu W.H. 2009. Isolation and characterization of a novel lysine racemase from a soil metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 15: 5161-5166

- Cheng F., Sheng J., Cai T., Jin J., Liu W., Lin Y., Du Y., Zhang M., Shen L. 2012. A protease-insensitive feruloyl esterase from China Holstein cow rumen metagenomic library: expression, characterization, and utilization in ferulic acid release from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10: 2546-2553
- Cheng X., Wang X., Qiu T., Yuan M., Sun J., Gao J. 2014. Molecular cloning and characterization of a novel cold-adapted family VIII esterase from a biogas slurry metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 11: 1484-1489
- Chung E.J., Lim H.K., Kim J.C., Choi G.J., Park E.J., Lee M.H., Chung Y.R., Lee S.W. 2008. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3: 723-730
- Chu X., He H., Guo C., Sun B. 2008. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 4: 615-625
- Combes S., Fortun L. L., Cauquil L., Gidenne T. 2012. Controlling the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. V: *Proceedings 10<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, Sharm-el-Sheikh, September 3-6, 2012. World Rabbit Science Association, Castanet-Tolosan: 475-494
- Courtois S., Cappellano C.M., Ball M., Francou F.X., Normand P., Helynck G., Martinez A., Kolvek S.J., Hopke J., Osburne M.S., August P.R., Nalin R., Guérineau M., Jeannin P., Simonet P., Pernodet J.L. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 49-55
- Davies R.R., Davies J.A. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology, *Veterinary clinics Exotic Animal Practice*, 6, 1: 139-153
- Demanèche S., Philippot L., David M.M., Navarro E., Vogel T.M., Simonet P. 2009. Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2: 534-537
- De Santi C., Altermark B., Pierechod M.M., Ambrosino L., de Pascale D., Willassen N.P. 2016. Characterization of a cold-active and salt tolerant esterase identified by functional screening of Arctic metagenomic libraries. *BMC Biochemistry*, 17, 1: 1
- Di Gennaro P., Bargna A., Sello G. 2011. Microbial enzymes for aromatic compound hydroxylation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 6: 1817-1827
- Di Gennaro P., Conforti P., Lasagni M., Bestetti G., Bernasconi S., Orsini F., Sello G. 2005. Dioxygenation of naphthalene by *Pseudomonas fluorescens* N3 dioxygenase: optimization of the process parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 3: 511-518
- Dror A., Fishman A. 2012. Engineering non-heme mono- and dioxygenases for biocatalysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, 3: 1-12
- Dumont M.G., Radajewski S.M., Miguez C.B., McDonald I.R., Murrell J.C. 2006. Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environmental Microbiology*, 8, 7: 1240-1250

- Ekkers D.M., Cretoiu M.S., Kielak A.M., Elsaas J.D. 2012. The great screen anomaly-a newfrontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 3: 1005-1020
- Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J.D., Steele H.L., Reymond J.L., Jaeger K.E., Streit W.R. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5, 3637-3645
- Faber K. 2011. *Biotransformations in organic chemistry*. 6<sup>th</sup> ed. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 423 str.
- Fan X., Liu X., Wang K., Wang S., Huang R., Liu Y. 2011. Highly soluble expression and molecular characterization of an organic solvent-stable and thermotolerant lipase originating from the metagenome. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, 3-4: 319-326
- Fang Z., Fang W., Liu J., Hong Y., Peng H., Zhang X., Sun B., Xiao Y. 2010. Cloning and characterization of a beta-glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 9: 1351-1358
- Faoro H., Glogauer A., Souza E.M., Rigo L.U., Cruz L.M., Monteiro R.A., Pedrosa F.O. 2011. Identification of a new lipase family in the brazilian atlantic forest soil metagenome. *Environmental Microbiology Reports*, 3, 6: 750-755
- Feng Y., Duan C.J., Pang H., Mo X.C., Wu C.F., Yu Y., Hu Y.L., Wei J., Tang J.L., Feng J.X. 2007. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 2: 319-328
- Ferrer M., Golyshina O.V., Chernikova T.N., Khachane A.N., Reyes-Duarte D., Santos V.A., Strompl C., Elborough K., Jarvis G., Neef A., Yakimov M.M., Timmis K.N., Golyshin, P.N. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology*, 7, 12: 1996-2010
- Fetzner S. 2002. Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 3: 243-257
- Fu L., He Y., Xu F., Ma Q., Wang F., Xu J. 2015. Characterization of a novel thermostable patatin-like protein from a Guaymas basin metagenomic library. *Extremophiles*, 19, 4: 829-840
- Gao M., Tao L., Chen S. 2013. Metagenomic cloning and characterization of Na<sup>+</sup> transporters from Huamachi Salt Lake in China. *Microbiological Research*, 168, 2: 119-124
- Geng A., Zou G., Yan X., Wang Q., Zhang J., Liu F., Zhu B., Zhou Z. 2012. Expression and characterization of a novel metagenome-derived cellulase Exo2b and its application to improve cellulase activity in *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 4: 951-962
- Gonçalves A.C., dos Santos A.C., dos Santos T.F., Pessoa T.B., Dias J.C., Rezende R.P. 2015. High yield of functional metagenomic library from mangroves constructed in fosmid vector. *Genetics and Molecular Research*, 14, 4: 1841-11847
- Guan C., Ju J., Borlee B.R., Williamson L.L., Shen B., Raffa K.F., Handelsman J. 2007. Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 11: 3669-3676

Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 1: 15-32

Hammer Ø., Harper T.A. D., Ryan P. D., 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1, art. 4: 9 str. biomedical  
[http://www.palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](http://www.palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf) (september, 2016)

Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 4: 669-685

Henne A., Daniel R., Schmitz R.A., Gottschalk G. 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 9: 3901- 3907

Henne A., Schmitz R.A., Bömeke M., Gottschalk G., Daniel R. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 3113-3116

Hong K.S., Lim H.K., Chung E.J., Park E.J., Lee M.H., Kim J.C., Choi G.J., Cho K.Y., Lee S.W. 2007. Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 10: 1655-1660

Hu Y., Zhang G., Li A., Chen J., Ma L. 2008. Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 5: 823-830

Jeon J.H., Kim J.T., Kim Y.J., Kim H.K., Lee H.S., Kang S.G., Kim S.J., Lee J.H. 2009. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 5: 865-874

Jiang C., Ma G., Li S., Hu T., Che Z., Shen P., Yan B., Wu B. 2009. Characterization of a novel beta-glucosidase-like activity from a soil metagenome. *Journal of Microbiology*, 47, 5: 542-548

Jiang L., Lin M., Zhang Y., Li Y., Xu X., Li S., Huang H. 2013. Identification and characterization of a novel trehalose synthase gene derived from saline-alkali soil metagenomes, *PLoS ONE*, 8, 10: e77437, doi: 10.1371/journal.pone.0077437: 11 str.

Jiménez D.J., Montaña J.S., Alvarez D., Baena S. 2012. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28, 1: 361-370

Johannes T.W., Woodyer R.D., Zhao H. 2006. High-throughput Screening Methods Developed for Oxidoreductases. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA: 77-95

Kanaya E., Sakabe T., Nguyen N.T., Koikeda S., Koga Y., Takano K., Kanaya S. 2010. Cloning of the RNase H genes from a metagenomic DNA library: identification of a new type 1 RNase H without a typical active-site motif. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 3: 974-983

Kanokratana P., Eurwilaichitr L., Pootanakit K., Champreda V. 2015. Identification of glycosyl hydrolases from a metagenomic library of microflora in sugarcane bagasse collection site and their cooperative action on cellulose degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, 4: 384-391

Kazimierczak K.A., Scott K.P., Kelly D., Aminov R.I. 2009. Tetracycline resistome of the organic pig gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6: 1717-1722

Kermauner A. 1994. Fiziologija prebave kuncev. *Sodobno kmetijstvo*, 27, 9: 358-366

Kim E.Y., Oh K.H., Lee M.H., Kang C.H., Oh T.K., Yoon J.H. 2009. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1: 257-260

Kim H.J., Jeong Y.S., Jung W.K., Kim S.K., Lee H.W., Kahng H.Y., Kim J., Kim H. 2015. Characterization of novel family IV esterase and family I.3 lipase from an oil-polluted mud flat metagenome. *Molecular Biotechnology*, 57, 9: 781-792

Kim J.N., Seo M.J., Cho E.A., Lee S.J., Kim S.B., Cheigh C.I., Pyun Y.R. 2005. Screening and characterisation of an esterase from a metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 5: 1067–1072

Kim J.S., Lim H.K., Lee M.H., Park J.H., Hwang E.C., Moon B.J., Lee S.W. 2009. Production of porphyrin intermediates in *Escherichia coli* carrying soil metagenomic genes. *FEMS Microbiology Letters*, 295, 1: 42-49

Kim S.Y., Oh D.B., Kwon O. 2014. Characterization of a lichenase isolated from soil metagenome. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 12: 1699-1706

Kim Y.J., Choi G.S., Kim S.B., Yoon G.S., Kim Y.S., Ryu Y.W. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification*, 45, 2: 315-323

Knietsch A., Waschkowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R. 2003. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from shortchain polyols on *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5, 1: 46-56

Ko K.C., Rim S.O., Han Y., Shin B.S., Kim G.J., Choi J.H., Song J.J. 2012. Identification and characterization of a novel cold-adapted esterase from a metagenomic library of mountain soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 5: 681-689

Lämmle K., Zipper H., Breuer M., Hauer B., Buta C., Brunner H., Rupp S. 2007. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *Journal of Biotechnology*, 127, 4: 575-592

Leak D. J., Yin Y., Zhang J. J., Zhou N. Y. 2012. Aromatic oxidations. 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim, Wiley-VCH Verlag: 1487-1534

Lee C.M., Yeo Y.S., Lee J.H., Kim S.J., Kim J.B., Han N.S., Koo B.S., Yoon S.H. 2008. Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 2: 322-326

Lee D.H., Choi S.L., Rha E., Kim S.J., Yeom S.J., Moon J.H., Lee S.G. 2015. A novel psychrophilic alkaline phosphatase from the metagenome of tidal flat sediments. *BMC Biotechnology*, 15, 1: doi: 10.1186/s12896-015-0115-2: 13 str.

- Lee S.W., Won K., Lim H.K., Kim J.C., Choi G.J., Cho K.Y. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 6: 720-726
- Leis B., Angelov A., Mientus M., Li H., Pham V.T., Lauinger B., Bongen P., Pietruszka J., Gonçalves L.G., Santos H., Liebl W. 2015. Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Molecular Frontiers in Microbiology*, 8, 6: 275, doi: 10.3389/fmicb.2015.00275: 12 str.
- Liaw R.B., Cheng M.P., Wu M.C., Lee C.Y. 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresource Technology*, 101, 21: 8323-8329
- Li G., Jiang Y., Fan X.J., Liu Y.H. 2012. Molecular cloning and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library. *Bioresource Technology*, 123: 15-22
- Li G., Wang K., Liu Y.H. 2008. Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome. *Microbial Cell Factories*, 30, 7: 38: 1-10
- Lim H.K., Chung E.J., Kim J.C., Choi G.J., Jang K.S., Chung Y.R., Cho K.Y., Lee S.W. 2005. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7768-7777
- Liu N., Yan X., Zhang M., Xie L., Wang Q., Huang Y., Zhou X., Wang S., Zhou Z. 2011. Microbiome of fungus-growing termites: a new reservoir for lignocellulase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1: 48-56
- Li Y., Liu N., Yang H., Zhao F., Yu Y., Tian Y., Lu X. 2014. Cloning and characterization of a new  $\beta$ -glucosidase from a metagenomic library of rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. *BMC Biotechnology*, 14, 85: doi: 10.1186/1472-6750-14-85: 9 str.
- MacNeil I.A., Tiong C.L., Minor C., August P.R., Grossman T.H., Loiacono K.A., Lynch B.A., Phillips T., Narula S., Sundaramoorthi R., Tyler A., Aldredge T., Long H., Gilman M., Holt D., Osburne M.S. 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3, 2: 301-308
- Mai Z., Su H., Yang J., Huang S., Zhang S. 2014. Cloning and characterization of a novel GH44 family endoglucanase from mangrove soil metagenomic library. *Biotechnology Letters*, 36, 8: 1701-1709
- Majerník A., Gottschalk G., Daniel R. 2001. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na<sup>(+)</sup>(Li<sup>(+)</sup>)/H<sup>(+)</sup> antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *Journal of Bacteriology*, 183, 22: 6645-6653
- Martin M., Biver S., Steels S., Barbeyron T., Jam M., Portetelle D., Michel G., Vandenbol M. 2014. Identification and characterization of a halotolerant, cold-active marine endo- $\beta$ -1,4-glucanase by using functional metagenomics of seaweed-associated microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 16: 4958-4967
- Mayumi D., Akutsu-Shigeno Y., Uchiyama H., Nomura N., Nakajima-Kambe T. 2008. Identification and characterization of novel poly(DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 5: 743-750

- McEwan N.R. 2014. Metagenomic Analyses in the digestive tract of the *Leporidae*. V: Encyclopedia of metagenomics: genes, genomes and metagenomes. Nelson K.E. (ed.). New York, Springer: 1-7
- Mewis K., Armstrong Z., Song Y.C., Baldwin S.A., Withers S.G., Hallam S.J. 2013. Biomining active cellulases from a mining bioremediation system. *Journal of Biotechnology*, 167, 4: 462-471
- Mirete S., de Figueras C.G., González-Pastor J.E. 2007. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 19: 6001-6011
- Mocali S., Benedetti A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161, 6: 497-505
- Mohamed Y.M., Ghazy M.A., Sayed A., Ouf A., El-Dorry H., Siam R. 2013. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant, thermophilic esterase from a Red Sea brine pool. *Scientific Reports*, 3, 3358: doi:10.1038/srep03358: 8 str.
- Mori T., Mizuta S., Suenaga H., Miyazaki K. 2008. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 21: 6803-6805
- MP Biomedicals. 2016a. Brilliant blue. Santa Ana, MP Biomedicals, LLC.: 1 str.  
<http://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/02190682.png> (september, 2016)
- MP Biomedicals. 2016b. Congo red. Santa Ana, MP Biomedicals, LLC.: 1 str.  
<http://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/02150711.png> (september, 2016)
- MP Biomedicals. 2016c. Crystal violet. Santa Ana, MP Biomedicals, LLC.: 1 str.  
<https://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/05207550.png> (september, 2016)
- Nacke H., Will C., Herzog S., Nowka B., Engelhaupt M., Daniel R. 2011. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *FEMS Microbiology Ecology*, 78, 1: 188-201
- Neveu J., Regeard C., DuBow M.S. 2011. Isolation and characterization of two serine proteases from metagenomic libraries of the Gobi and Death Valley deserts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 3: 635-644
- Nesme J., Simonet P. 2015. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, 17, 4: 913-930
- Nolan L.C., O'Connor K.E. 2008. Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnology Letters*, 30, 11: 1879-1891
- Okamura Y., Kimura T., Yokouchi H., Meneses-Osorio M., Katoh M., Matsunaga T., Takeyama H. 2010. Isolation and characterization of a GDSL esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria. *Marine Biotechnology*, 12, 4: 395-402
- Ono A., Miyazaki R., Sota M., Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M. 2007. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 2: 501-510

Palackal N., Lyon C.S., Zaidi S., Luginbühl P., Dupree P., Goubet F., Macomber J.L., Short J.M., Hazlewood G.P., Robertson D.E., Steer B.A. 2007. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1: 113-124

Pang H., Zhang P., Duan C.J., Mo X.C., Tang J.L., Feng J.X. 2009. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. *Current Microbiology*, 58, 4: 404-408

Pazmino D.E.T., Winkler M., Glieder A., Fraaije M.W. 2010. Monooxygenases as biocatalysts: classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 146, 1-2: 9-24

Peng Q., Zhang X., Shang M., Wang X., Wang G., Li B., Guan G., Li Y., Wang Y. 2011. A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. *Microbial Cell Factories*, 10: 95, 1-11

Pereira M.R., Mercaldi G.F., Maester T.C., Balan A., Lemos E.G. 2015. Est16, a new esterase isolated from a metagenomic library of a microbial consortium specializing in diesel oil degradation. *PLoS ONE*, 10, 7: e0133723, doi: 10.1371/journal.pone.0133723: 16 str.

Petrovskaya L.E., Novototskaya-Vlasova K.A., Spirina E.V., Durdenko E.V., Lomakina G.Y., Zavialova M.G., Nikolaev E.N., Rivkina E.M. 2016. Expression and characterization of a new esterase with GCSAG motif from a permafrost metagenomic library. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 5: fiw046, doi: 10.1093/femsec/fiw046: 28 str.

Pindi P.K., Srintah R. R., Pavankumar T.L. 2014. Isolation and characterization of novel lipase gene LipHim1 from the DNA isolated from soil samples. *Journal of Microbiology*, 52, 5: 384-388

Placido A., Hai T., Ferrer M., Chernikova T.N., Distaso M., Armstrong D., Yakunin A.F., Toshchakov S.V., Yakimov M.M., Kublanov I.V., Golyshina O.V., Pesole G., Ceci L.R., Golyshin P.N. 2015. Diversity of hydrolases from hydrothermal vent sediments of the Levante Bay, Vulcano Island (Aeolian archipelago) identified by activity-based metagenomics and biochemical characterization of new esterases and an arabinopyranosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 23: 10031-10046

Preeti A., Hemalatha D., Rajendran J., Mullany P., Gunasekaran P. 2014. Cloning, expression and characterization of a lipase encoding gene from human oral metagenome. *Indian Journal of Microbiology*, 54, 3: 284-292

Pushpam P.L., Rajesh T., Gunasekaran P. 2011. Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome. *AMB Express*, 1, 1: 3: 1-10

Ramaswamy S. 2004. Naphtalene dioxygenase. V: *Handbook of metalloproteins*. Vol. 3. Messerschmidt A., Bode W., Cygler M. (eds.) Hoboken, John Wiley and Sons: 1-9

Ranjan R., Grover A., Kapardar R.K., Sharma R. 2005. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335, 1: 57-65

Rashamuse K., Magomani V., Ronneburg T., Brady D. 2009. A novel family VIII carboxylesterase derived from a leachate metagenome library exhibits promiscuous beta-lactamase activity on nitrocefin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 3: 491-500

Rashamuse K., Ronneburg T., Sanyika W., Mathiba K., Mmutlane E., Brady D. 2014. Metagenomic mining of feruloyl esterases from termite enteric flora. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2: 727-737

Rees H.C., Grant S., Jones B., Grant W.D., Heaphy S. 2003. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles*, 7, 5: 415-421

Riaz K., Elmerich C., Moreira D., Raffoux A., Dessaux Y., Faure D. 2008. A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environmental Microbiology*, 10, 3: 560-570

Rodríguez M.C., Loaces I., Amarelle V., Senatore D., Iriarte A., Fabiano E., Noya F. 2015. Est10: A novel alkaline esterase isolated from bovine rumen belonging to the new family XV of lipolytic enzymes. *PLoS One*, 10, 5: e0126651, doi: 10.1371/journal.pone.0126651: 16 str.

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6: 2541-2547

Shao H., Xu L., Yan Y. 2013. Isolation and characterization of a thermostable esterase from a metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 11: 1211-1222

Sharma S., Khan F.G., Qazi G.N. 2010. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 6: 1821-1828

Sigma-Aldrich. 2016. Xylene cyanol. Saint Louis, Sigma-Aldrich, Inc.: 1str.  
[http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure8/195/mfcd00040657.eps/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00040657-medium.png](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure8/195/mfcd00040657.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00040657-medium.png)  
(september, 2016)

Simon C., Daniel R. 2011. Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4: 1153-1161

Simon C., Herath J., Rockstroh S., Daniel R. 2009. Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 9: 2964-2968

Stroobants A., Portetelle D., Vandebol M. 2014. New carbohydrate-active enzymes identified by screening two metagenomic libraries derived from the soil of a winter wheat field. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 4: 1045-1055

Suenaga H., Ohnuki T., Miyazaki K. 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environmental Microbiology*, 9, 9: 2289-2297

Su J., Zhang F., Sun W., Karuppiah V., Zhang G., Li Z., Jiang Q. 2015. A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 7: 1093-1102

Stres B. 2011. Metagenomske knjižnice (neobjavljeni gradivo). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 4 str.

Surridge A.K., Bell D.J., Ibrahim K.M., Hewitt G.M. 1999. Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia. *Heredity*, 82, 5: 479-487

Tan H., Mooij M.J., Barret M., Hegarty P.M., Harington C., Dobson A.D., O'Gara F. 2014. Identification of novel phytase genes from an agricultural soil-derived metagenome. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1: 113-118

Tee K.L., Schwaneberg U. 2007. Directed evolution of oxygenases: screening systems, success stories and challenges. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 10, 3: 197-217

van Beilen J.B., Duetz W.A., Schmid A., Witholt B. 2003. Practical issues in the application of oxygenases. *Trends in Biotechnology*, 21, 4: 170-177

van Hellemont E.W., Janssen D.B., Fraaije M.W. 2007. Discovery of a novel styrene monooxygenase originating from the metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 18: 5832-5839

Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K.E., Streit W.R. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 10: 6235-6242

Zavec D. 2015. Fizikalno-kemijski parametri in struktura mikrobnih združb ob zagonu industrijskih bioplinskih anaerobnih reaktorjev. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 72 str.

Zhang X., Li H., Li C.J., Ma T., Li G., Liu Y.H. 2013. Metagenomic approach for the isolation of a thermostable  $\beta$ -galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of Turpan Basin. *BMC Microbiology*, 13, 237: doi: 10.1186/1471-2180-13-237: 10 str.

Zhang Y., Zhao J., Zeng R. 2011. Expression and characterization of a novel mesophilic protease from metagenomic library derived from Antarctic coastal sediment. *Extremophiles*, 15, 1: 23-29

Zhao S., Wang J., Bu D., Liu K., Zhu Y., Dong Z., Yu Z. 2010. Novel glycoside hydrolases identified by screening a Chinese Holstein dairy cow rumen-derived metagenome library. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 19: 6701-6705

Zheng J., Liu C., Liu L., Jin Q. 2013. Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 3: 197-204

Wang F., Li F., Chen G., Liu W. 2009. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiological Research*, 164, 6: 650-657

Wang M., Lai G.L., Nie Y., Geng S., Liu L., Zhu B., Shi Z., Wu X.L. 2015. Synergistic function of four novel thermostable glycoside hydrolases from a long-term enriched thermophilic methanogenic digester. *Frontiers in Microbiology*, 22, 6: 509, doi: 10.3389/fmicb.2015.00509: 10 str.

Waschkowitz T., Rockstroh S., Daniel R. 2009. Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 8: 2506-2516

Williamson S.J., Yooseph S. 2012. From bacterial to microbial ecosystems (metagenomics). *Methods in Molecular Biology*, 804: 35-55

Xiang W., Zhang J., Li L., Liang H., Luo H., Zhao J., Yang Z., Sun Q. 2010. Screening a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from a metagenomic library of halophiles colonizing in the Dagong Ancient Brine Well in China. *FEMS Microbiology Letters*, 306, 1: 22-29

Yao J., Fan X.J., Lu Y., Liu Y.H. 2011. Isolation and characterization of a novel tannase from a metagenomic library. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8: 3812-3818

Yasir M., Khan H., Azam S.S., Telke A., Kim S.W., Chung Y.R. 2013. Cloning and functional characterization of endo-β-1,4-glucanase gene from metagenomic library of vermicompost. *Journal of Microbiology*, 51, 3: 329-335

Ye M., Li G., Liang W.Q., Liu Y.H. 2010. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 3: 1023-1031

Yu E.Y., Kwon M.A., Lee M., Oh J.Y., Choi J.E., Lee J.Y., Song B.K., Hahm D.H., Song J.K. 2011. Isolation and characterization of cold-active family VIII esterases from an arctic soil metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 2: 573-581

Yun J., Kang S., Park S., Yoon H., Kim M.J., Heu S., Ryu S. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12: 7229-7235

## ZAHVALA

Med opravljanjem praktičnega dela diplomske naloge sem spoznal veliko prijaznih oseb na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko na Rodici. Hvala vsem zaposlenim za odlično vzdušje.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Tjaši Danevčič za hitro in temeljito popravilo diplomske naloge.

Hvala tudi vsem zaposlenim v administraciji Oddelka za živilstvo za usklajeno in odlično usmerjanje pri urejanje papirologije.

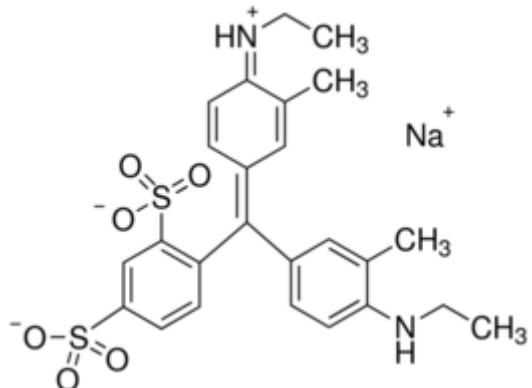
Del naloge obsega tudi bibliografijo. Tu je levji delež, ogromno dobre volje in vztrajnosti prispevala gospa Barbara Slemenik iz knjižnice na Oddelku za živilstvo.

Vsakič, ko je pisanje naloge obtičalo v slepi ulici, je tu bil prof. dr. Blaž Stres, ki je vedno našel pravi odgovor in pravo smer.

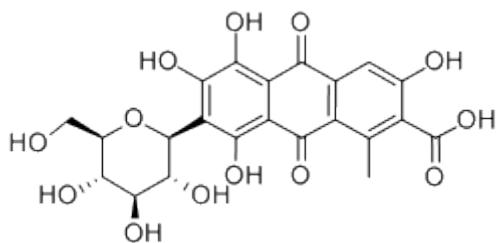
Vse te vrstice ne bi bile možne brez mojih bližnjih, ki so bili vedno tu, ko je bilo najbolj potrebno. Hvala.

## PRILOGE

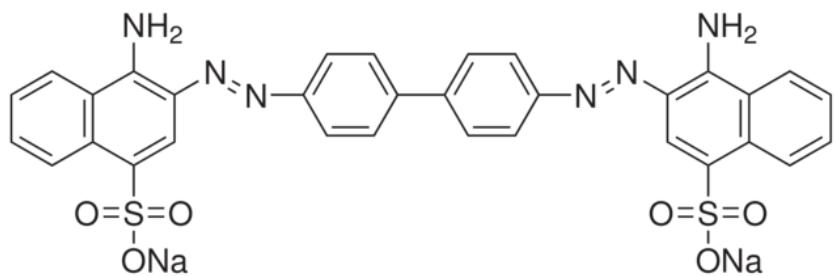
Priloga A: Kemijska zgradba ksilen cianola (Sigma-Aldrich, 2016).



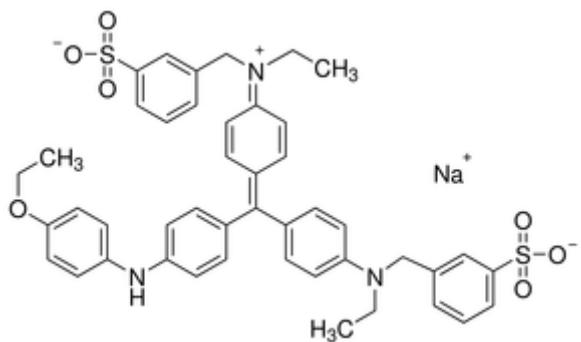
Priloga B: Kemijska zgradba karmina (Chemical Book, 2016).



Priloga C: Kemijska zgradba kongo rdeče (MP Biomedicals, 2016b).



Priloga D: Kemijska zgradba brilliant blue (MP Biomedicals, 2016a).



Priloga E: Kemijska zgradba kristal vijoličnega (MP Biomedicals, 2016c).

