

# Utjecaj natrijeva klorida na proizvodnju lipida i karotenoida u kvascu *Rhodotorula* sp. MG2

---

**Tomić, Sara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:157272>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Sara Tomić

**UTJECAJ NATRIJEVA KLORIDA  
NA PROIZVODNJU LIPIDA I  
KAROTENOIDA U KVASCU  
*Rhodotorula sp. MG2***

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek.

Diplomski rad izrađen je u okviru znanstveno istraživačkog projekta „BioProspecting Jadranskog mora“ financiranog od strane Strukturnih i investicijskih fondova EU u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.“ (Poziv: Vrhunska istraživanje Znanstvenih centara izvrsnosti KK.01.1.1.01).

*Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek, na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada, stručnim savjetima, uloženom vremenu i neizmjerljivoj strpljivosti.*

*Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na savjetima i pomoći prilikom rada u laboratoriju.*

*Također se zahvaljujem tehničarima Igoru Livadi, Ljiljani Blažević i Marini Vnućec na njihovoj susretljivosti, pomoći pri radu i korisnim savjetima.*

*Za kraj, posebne zahvale mojoj obitelji, prijateljima i dečku za strpljivost i motivaciju tokom studiranja i pisanja diplomskog rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

### UTJECAJ NATRIJEVA KLOORIDA NA PROIZVODNJU LIPIDA I KAROTENOIDA U KVASCU *Rhodotorula sp. MG2*

Sara Tomić, univ. bacc. ing. biotechn.

0058211543

**Sažetak:** Negativni učinci na okoliš i nestašica fosilnih goriva dovode do sve veće potražnje za alternativnim izvorima goriva i energije. Oleaginozni kvasci imaju sposobnost nakupljanja lipida koji se mogu primijeniti u proizvodnji biodizela kao alternativa naftnom dizelu. Cilj ovog rada bio je istražiti učinak osmotskog stresa na stanicu kvasca *Rhodotorula sp. MG2* izazvanog dodatkom natrijeva klorida u koncentraciji od 25 do 75 g/L. Učinak stresa na stanicu praćen je određivanjem rasta i sastava stanice te udjela karotenoida i lipida. Povećanjem koncentracije natrijevog klorida u hranjivoj podlozi raste udjel lipida, proteina, karotenoida te anorganskih tvari u stanici. Najveća koncentracija karotenoida u ekstraktu od 50,40 mg/L proizvedena je dodatkom najveće koncentracije natrijeva klorida od 75 g/L. Također, najveći udio lipida u stanici od 41,3 % izmjeren je kod najveće koncentracije natrijeva klorida. Metanolski ekstrakt stanične biomase te egzopolisaharidi kvasca *Rhodotorula sp. MG2* nisu pokazali antibakterijski i antimikotski učinak. Kvasac također ne proizvodi soforolipide.

**Ključne riječi:** *Rhodotorula, stres, karotenoidi, lipidi, soforolipidi, proteini*

**Rad sadrži:** 51 strana, 19 slika, 8 tablica, 55 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Novak (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

**Datum obrane:** 19.12.2023.





## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

INFLUENCE OF SODIUM CHLORIDE ON THE PRODUCTION OF LIPIDS AND  
CAROTENOIDS IN *Rhodotorula sp. MG2* YEAST

Sara Tomić, univ. bacc. ing. biotechn.

0058211543

**Abstract:** The negative effects on the environment and the shortage of fossil fuels lead to an increasing demand for alternative sources of fuel and energy. Oleaginous yeasts produce lipids that can be used in the production of biodiesel as an alternative to petroleum diesel. The aim of this work was to investigate the effect of osmotic stress on the yeast cell *Rhodotorula sp. MG2* induced by the addition of sodium chloride in concentration in the range from 25 to 75 g/L. The effect of stress on the cell was monitored by determining cell growth and composition, as well as the proportion of lipids, proteins, carotenoids and inorganic substances in the cell. The highest concentration of carotenoids in the extract of 50,40 mg/L was produced by the addition of the highest concentration of sodium chloride of 75 g/L. Also, the highest content of lipids in the cell of 41,3 % was determined at the highest concentration of sodium chloride. Methanolic extract of cellular biomass and exopolysaccharides of the yeast *Rhodotorula sp. MG2* did not show antibacterial and antifungal effects. Yeast also does not produce sophorolipids.

**Keywords:** *Rhodotorula, stress, carotenoids, lipids, sophorolipids, proteins*

**Thesis contains:** 51 pages, 19 figures, 8 tables, 55 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Mirela Ivančić Šantek, PhD, Full professor

**Reviewers:**

1. Ksenija Markov, PhD, Full professor (president)
2. Mirela Ivančić Šantek, PhD, Full professor (mentor)
3. Jasna Novak, PhD, Full professor (member)
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 19<sup>th</sup>, 2023



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. OLEAGINOZNI KVASCI.....	2
2.1.1. Biokemija nakupljanja lipida kod oleaginoznih kvasaca.....	2
2.2. KVASCI RODA <i>Rhodotorula</i> .....	3
2.3. INDUSTRIJSKI POTENCIJAL.....	4
2.3.1. Industrijski potencijal karotenoida .....	5
2.4. PROIZVODNJA KAROTENOIDA .....	5
2.5. BIOSINTETSKI PUT PROIZVODNJE KAROTENOIDA .....	7
2.6. ZDRAVSTVENE KORISTI I NUTRITIVNE VRIJEDNOSTI KAROTENOIDA .....	9
2.6.1. Antioksidacijska aktivnost karotenoida.....	9
2.7. MEHANIZAM PROIZVODNJE LIPIDA .....	12
2.8. UTJECAJ RAZLIČITIH FAKTORA NA KULTIVACIJU KVASCA <i>Rhodotorula</i> .....	12
2.8.1. Faktori koji utječu na sintezu intracelularnih lipida .....	12
2.9. UTJECAJ STRESA NA PROIZVODNJU I PRINOS KAROTENOIDA I LIPIDA.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. MATERIJALI .....	16
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	16
3.1.2. Kemikalije .....	16
3.1.3. Ostale kemikalije .....	17
3.1.4. Hranjive podloge .....	18
3.1.4.1. Tekuća hranjiva podloga za uzgoj inokuluma.....	18
3.1.4.2. Tekuća hranjiva podloga za glavni uzgoj.....	18
3.1.5. Aparatura i pribor .....	19
3.1.5.1. UV – Vis spektrofotometar .....	19
3.1.5.2. Centrifuga.....	19
3.1.5.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (engl. Ultra performance liquid chromatography, UPLC).....	19
3.1.5.4. Ostala oprema .....	19
3.2. METODE .....	20
3.2.1. Priprema inokuluma i hranjivih podloga za uzgoj kvasca <i>Rhodotorula sp.</i> .....	20
3.2.2. Glavni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi .....	20
3.3. ANALITIČKE METODE .....	20

3.3.1. Mjerenje optičke gustoće uzorka.....	20
3.3.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari.....	21
3.3.3. Određivanje udjela $\beta$ – karotena u biomasi kvasca .....	21
3.3.3.1. Jednostavna ekstrakcija $\beta$ – karotena (postupak 1) .....	21
3.3.3.2 Ekstrakcija $\beta$ – karotena smjesom acetona i petrol etera pri povišenoj temperaturi (postupak 2).....	22
3.3.3.3 Određivanje udjela ukupnih karotenoida u biomasi kvasca.....	23
3.3.4. Određivanje udjela lipida u biomasi.....	24
3.3.5.Određivanje sposobnosti sinteze soforolipida .....	24
3.3.6. Određivanje koncentracije glukoze tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC).....	25
3.3.7. Izdvajanje i određivanje sastava egzopolisaharida.....	25
3.3.8. Određivanje udjela proteina u biomasi.....	27
3.3.9. Određivanje udjela pepela u biomasi kvasca.....	28
3.3.10. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja metodom disk difuzije .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1. ŠARŽNI UZGOJ KVASCA U TIKVICAMA.....	31
4.1.1. Utjecaj koncentracije natrijeva klorida na rast kvasca .....	31
4.2. PROIZVODNJA KAROTENOIDA .....	33
4.2.1. Ekstrakcija karotenoida iz biomase kvasca .....	33
4.3. SASTAV STANICE KVASCA .....	37
4.3.1. Lipidi u biomasi kvasca.....	37
4.3.2. Sastav egzopolisaharida.....	38
4.3.3. Proteini u biomasi kvasca.....	39
4.3.4. Pepeo u biomasi kvasca.....	40
4.4. PROIZVODNJA SOFOROLIPIDA.....	41
4.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST .....	42
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>46</b>

# 1. UVOD

Oleaginozni kvasci, zbog svoje jedinstvene fiziologije, najprikladniji su mikroorganizmi za proizvodnju lipida, oleokemikalija i goriva. Zbog njihove sposobnosti rasta na različitim izvorima ugljika (uključujući i lignocelulozne sirovine) te jednostavnog uzgoja u velikom mjerilu sve češće su zastupljeni u biotehnološkim procesima (Adrio, 2017). Udio lipida u oleaginoznim kvascima iznosi čak do 70 % suhe tvari biomase, a ovisi o raznim čimbenicima poput temperature, pH vrijednosti i koncentracije ugljika i dušika (Meng i sur., 2008).

Lipidi dobiveni pomoću mikroorganizama alternativa su lipidima biljnog i životinjskog podrijetla u proizvodnji biodizela (Poontawee i sur., 2017). Korištenjem lipida dobivenih mikrobnom proizvodnjom smanjuju se zahtjevi za energijom te nisu potrebne velike poljoprivredne površine za uzgoj. Prednosti biodizela u usporedbi s naftnim dizelom su njegove biorazgradive i netoksične karakteristike (Zheng i sur., 2012).

Kvasac *Rhodotorula* pripada skupini oleaginoznih kvasaca koji mogu akumulirati lipide i karotenoide. Najzastupljeniji među karotenoidima je  $\beta$ -karoten koji služi kao prekursor vitamina A te pokazuje antioksidativno i antikancerogeno djelovanje (Saenge i sur., 2011).

Optimizacijom uvjeta biotehnološkog procesa povećava se prinos željenog proizvoda te smanjuju troškovi proizvodnje. Dodatak stresora omogućava veći prinos u proizvodnji željenih metabolita pomoću mikroorganizama (Marova i sur., 2010). Osmotski stres nastaje dodatkom natrijeva klorida u hranjivu podlogu, a utječe na povećanu proizvodnju lipida i karotenoida kod oleaginoznih kvasaca.

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj natrijeva klorida na brzinu rasta, proizvodnju lipida i karotenoida u kvascu *Rhodotorula sp.* MG2. Također je istražen utjecaj povećanog saliniteta na udjel proteina i anorganskih tvari, sposobnost sinteze soforolipida i tvari s antibakterijskim i antifungalnim djelovanjem.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OLEAGINOZNI KVASCI

Oleaginozni kvasci koriste različite izvore ugljika za proizvodnju lipida i karotenoida koji se koriste za proizvodnju oleokemikalija, biogoriva, lijekova i kozmetike. Glavne masne kiseline koje proizvode ovi kvasci su: palmitinska kiselina (C16 : 0), palmitoleinska kiselina (C16 : 1), stearinska kiselina (C18 : 0) i oleinska kiselina (C18 : 1), koje se koriste za proizvodnju biodizela (Elfeky i sur., 2020). Za uzgoj ovih kvasaca mogu se koristiti jeftini izvori ugljika poput lignoceluloznih sirovina i industrijske otpadne vode čime se postiže ekonomičnost procesa (Liu i sur., 2020). Karotenoidi koje proizvode, uključujući  $\beta$ - i  $\gamma$ -karoten te torulen štite stanice kvasca sprječavajući fotooksidativna oštećenja uzrokovana svjetlom i zrakom tokom faze rasta (Cardoso i sur., 2017). Kemijska sinteza brži je i jeftiniji postupak dobivanja karotenoida te je i prinos karotenoida veći. Međutim, prirodni karotenoidi su traženiji na tržištu jer pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost te bolju učinkovitost u sprječavanju bolesti i upala. Prirodni  $\beta$ -karoten je mješavina svih *trans*- i devet *cis*-izomera, dok se umjetni  $\beta$ -karoten sastoji samo od *trans* izomera (Novoveská, 2019). Zabrinutost zbog uporabe toksičnih reagensa i loši učinci sintetičkih proizvoda razlozi su zbog kojih potrošači daju prednost prirodnim karotenoidima. Iako se pokušava smanjiti broj koraka u procesima izdvajanja, lipidi dobiveni pomoću mikroorganizama još uvijek nisu ekonomski konkurentni biljnim uljima i životinjskim mastima za proizvodnju biodizela (Louhasakul i sur., 2018). Minimalan trošak za proizvodnju biodizela pomoću oleaginoznih kvasaca iznosi šest do osam dolara po galonu dok je trošak biodizela dobivenog iz povrća dva do tri dolara po galonu (Yellapu i sur., 2018). Razvoj učinkovitog i isplativog procesa izdvajanja za dobivanje lipida i karotenoida pomoću oleaginoznih kvasaca ključan je za smanjenje troškova proizvodnje (Liu i sur., 2020).

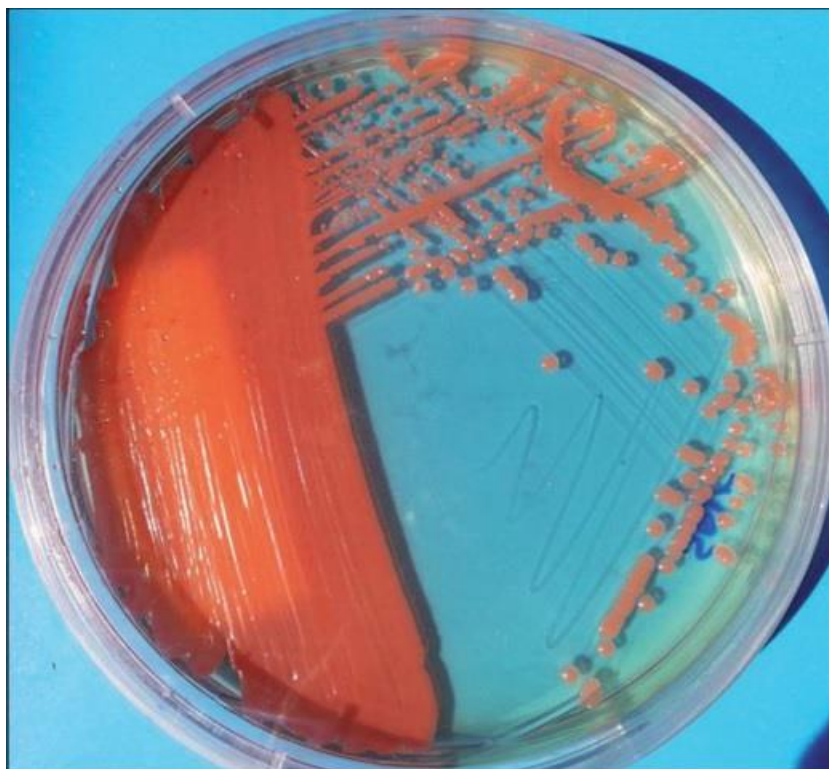
#### 2.1.1. Biokemija nakupljanja lipida kod oleaginoznih kvasaca

Oleaginozni kvasci mogu proizvesti i akumulirati lipide koji čine više od 20 % suhe tvari stanice. Neki od kvasaca koji imaju tu mogućnost su: *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon fermentans* i *Cryptococcus curvatus*. Kvasci pokazuju prednosti u proizvodnji lipida u odnosu na druge oleaginozne organizme poput filamentoznih gljiva ili mikroalgi. Prednosti kvasaca pri proizvodnji lipida su: jednostanični rast, kratko generacijsko vrijeme, sposobnost rasta na velikom broju sirovina (lignocelulozne sirovine, ugljikohidrati i lipidi) i jednostavan uzgoj u velikim bioreaktorima (Adrio, 2017). U prisustvu prekomjerne količine ugljika i nakon iscrpljenja esencijalnog

nutrijenta u hranjivoj podlozi (uobičajeno dušik), oleaginozni kvasci preusmjeravaju potrošnju ugljika s proizvodnje energije na sintezu lipida. Potrošnja dušika smanjuje koncentraciju intracelularnog adenozin monofosfata (AMP) što rezultira inhibicijom izocitrat dehidrogenaze te dovodi do nakupljanja citrata u mitohondrijima. Citrat se prenosi u citoplazmu gdje ga cijepa ATP-citrat liaza, ključni enzim za lipogenezu prisutan u svim oleaginoznim mikroorganizmima. Zatim se acil-CoA usmjerava na *de novo* sintezu masnih kiselina u kompleksu sintaze masnih kiselina (Thelivets i sur., 2007). Produkti kompleksa FAS, palmitoil-CoA i stearoil-CoA, prelaze u endoplazmatski retikulum gdje se koriste za proizvodnju lipida. Prije nego se usmjere na sintezu lipida dolazi do elongacije njihovih lanaca s dva ugljikova atoma. Sinteza lipida slijedi Kennedyjev put da bi se dobila lizofosfatidna kiselina, fosfatidna kiselina i diacilglicerol te triacilgliceridi. Slobodne masne kiseline mogu se osloboditi iz triacilglicerida djelovanjem intracelularnih lipaza i dalje aktivirati acil-CoA sintetazama da bi se dobio acil-CoA. Iscrpljivanjem izvora ugljika acil-CoA i slobodne masne kiseline mogu ući u peroksisom gdje se razgrađuju putem beta oksidacije. NADPH potreban za sintezu lipida u oleaginoznim mikroorganizmima može se osigurati iz različitih izvora poput NADPH-ovisne izocitrat dehidrogenaze, oksidativnim pentoza fosfatnim putem ili malat dehidrogenazom koja je glavni izvor NADPH za oleaginozne kvasce (Adrio, 2017).

## 2.2. KVASCI RODA *Rhodotorula*

Kvasci roda *Rhodotorula* (slika 1) striktni su aerobi te imaju sposobnost proizvodnje glikogena tijekom eksponencijalne faze rasta i velikih količina lipida i karotenoida tijekom stacionarne faze rasta. Optimalna temperatura rasta im je 30 °C, a boja im je koraljno ružičasta. Promjer njihovih stanica je tri do pet mikrometara, rastu kao elipsoidi, multipolarni su pupajući kvasci koji proizvode pseudohife te se spolno razmnožavaju (Hernández-Almanza i sur., 2014). U prirodi se nalazi u zraku, tlu i na površinama lista, a može ih se naći u mlijeku i proizvodima od sira (Dworecka-Kaszak i Kizerwetter-Swida, 2011). Ovi kvasci mogu koristiti mnoge spojeve kao izvore ugljika. Oni uključuju: glukozu, galaktozu, saharozu, maltozu, trehalozu, etanol, glicerol i heksadekan. Proizvode ureazu pa ne mogu asimilirati inozitol i fermentirati šećere. Mogu rasti prvi višim koncentracijama natrijeva klorida, ali ne podnose koncentraciju glukoze veću od 50 %. Antimikotici poput amfotericina B, itrakonazola i flukonazola sprječavaju njihov rast *in vitro* (Hernández-Almanza i sur., 2014).



**Slika 1.** *Rhodotorula* sp. (Verdugo i sur., 2016)

### 2.3. INDUSTRIJSKI POTENCIJAL

Kvasci roda *Rhodotorula* imaju važne značajke kao što su: proizvodnja velikih količina karotenoida, proteina iz etanola, octene kiseline, lipida i acetaldehida. Koriste se zbog svog potencijala u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. U usporedbi s biljnim uljima i životinjskim mastima, prednosti proizvodnje mikrobnih ulja su kratko generacijsko vrijeme mikroorganizma, proizvodnja neovisna o godišnjem dobu i klimi te za proizvodnju nije potrebna obradiva površina. Lipidi proizvedeni pomoću mikroorganizama alternativa su sirovoj nafti jer se koriste kao sirovina za proizvodnju biodizela (Hernández-Almanza i sur., 2014). Pri proizvodnji biodizela provodi se kemijska reakcija transesterifikacije čiji su produkti metil ili etil esteri masnih kiselina, a glicerol je nusproizvod. Dobiveni glicerol može poslužiti kao jeftini izvor ugljika za rast kvasaca *Rhodotorula* jer je prekursor za sintezu lipida u oleaginoznim kvascima i ubrzava njihovu sintezu te je izvor acila u sintezi lanaca masnih kiselina (Li i sur., 2010). Osim toga, kvasci roda *Rhodotorula* imaju potencijal za pročišćavanje otpadnih voda. Konvencionalni načini pročišćavanja otpadnih voda, kao što su kemijska precipitacija ili ionska izmjena, često su neučinkoviti ili neekonomični. Biosorpcija je alternativan način uklanjanja onečišćenja iz industrijskih otpadnih voda. Prednosti procesa biosorpcije u odnosu na konvencionalne metode su: niski troškovi, visoka učinkovitost detoksikacije i minimalna



količina jednokratnog mulja. Različite vrste biomase kao što su biomasa bakterija, gljiva, algi i kvasaca proučavane su s ciljem identifikacije visoko učinkovitih biosorbenata za uklanjanje metala. Proučavan je učinak kadmija na uzgoj kvasca *Rhodotorula sp.* Primijećene su različite promjene u sastavu stanice kvasca (karotenoidi, proteini, šećeri i sadržaj fosfata). Uzgajani kvasci roda *Rhodotorula* apsorbirali su kadmij u dvofaznom procesu, koji uključuje energetske neovisnu biosorpciju na površini stanice, što pokazuje da ovaj kvasac može rasti u prisutnosti povišenih koncentracijama kadmija te pokazuje potencijal u *in situ* bioremedijaciji kontaminiranih industrijskih otpadnih voda. Kvasci roda *Rhodotorula* proizvode fenolne spojeve (galnu kiseline, benzojevu kiseline, katehina i ferulinske kiseline) kad su uzgajani pod kontroliranim stresom dodatkom natrijeva klorida (1-5 %) ili vodikovog peroksida (1-5 mM) na bazalnom mediju (Sala i sur., 2012).

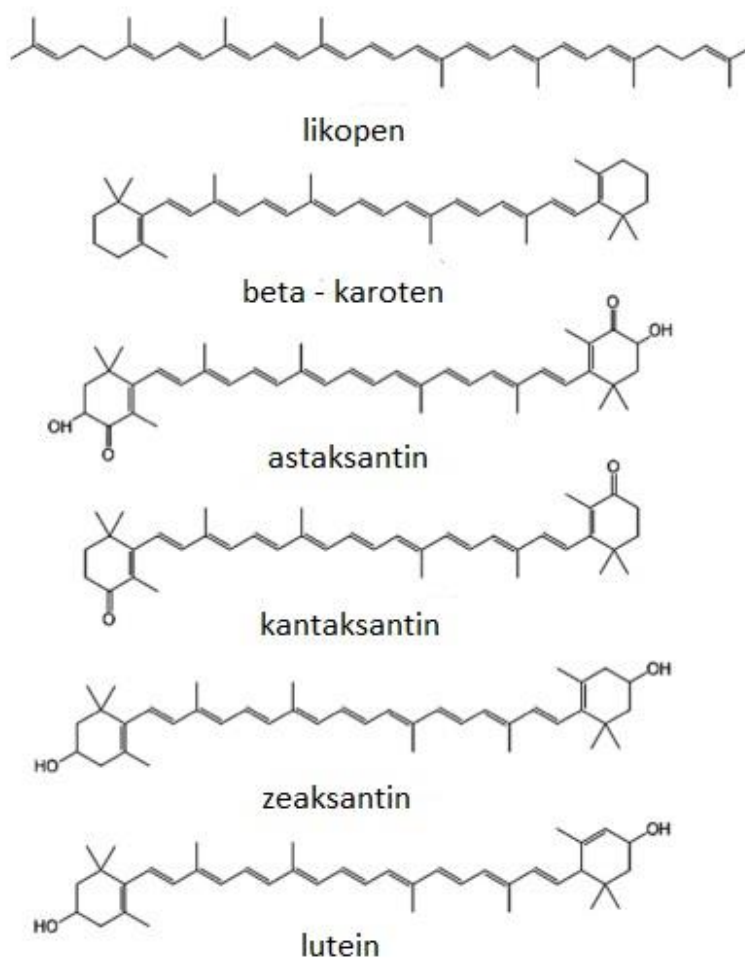
### 2.3.1. Industrijski potencijal karotenoida

$\beta$ -karoten najpoželjnija je vrsta karotenoida, a obično se koristi kao pigment u hrani i prehrambenim dodacima (Carocho i sur., 2015). Torulen pokazuje svojstva provitamina A i antioksidativni učinak. U istraživanju *in vitro* utvrđeno je da torularhordin, karboksilirani derivat torulena, ima veću sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u usporedbi s  $\beta$ -karotenom (Kot i sur., 2016). Istraživanja su pokazala mogućnost uporabe torulena i torularhordina kao komponenata kozmetike, hrane i lijekova (Zoz i sur., 2015). Studije toksičnosti provedene na štakorima dokazale su da se karotenoidi koje proizvode kvasci roda *Rhodotorula* mogu koristiti kao sigurni dodaci hrani (Kot i sur., 2016). Sposobnost kvasaca roda *Rhodotorula* da sintetiziraju karotenoide također se koristi u medicinske svrhe. Na primjer, osušena i usitnjena biomasa kvasca dodana u hranu za štakore pokazuje učinak protiv prekanceroznih lezija jetre izazvanih *N*-nitrozodimetilaminom. Također, torulen i torularhordin inhibiraju rast raka prostate, a torularhordin se zbog svog snažnog antioksidativnog djelovanja može koristiti i kao neuroprotektivno sredstvo protiv oksidativnog stresa izazvanog vodikovim peroksidom (Wu i sur., 2015).

## 2.4. PROIZVODNJA KAROTENOIDA

Karotenoidi se sastoje od izoprenskih jedinica, a njihova glavna karakteristika je prisutnost dugog lanca poliena (prisutnost dvostrukih veza u lancu može varirati od tri do petnaest) odgovornog za boju koju percipira ljudsko oko (Rodrigues i sur., 2012). Struktura karotenoida prikazana je na slici 2. Karotenoidi su prekursori vitamina A, imaju svojstva antioksidansa, inhibiraju nastanak tumora te pojačavaju imunološki odgovor koji dovodi do zaštite od

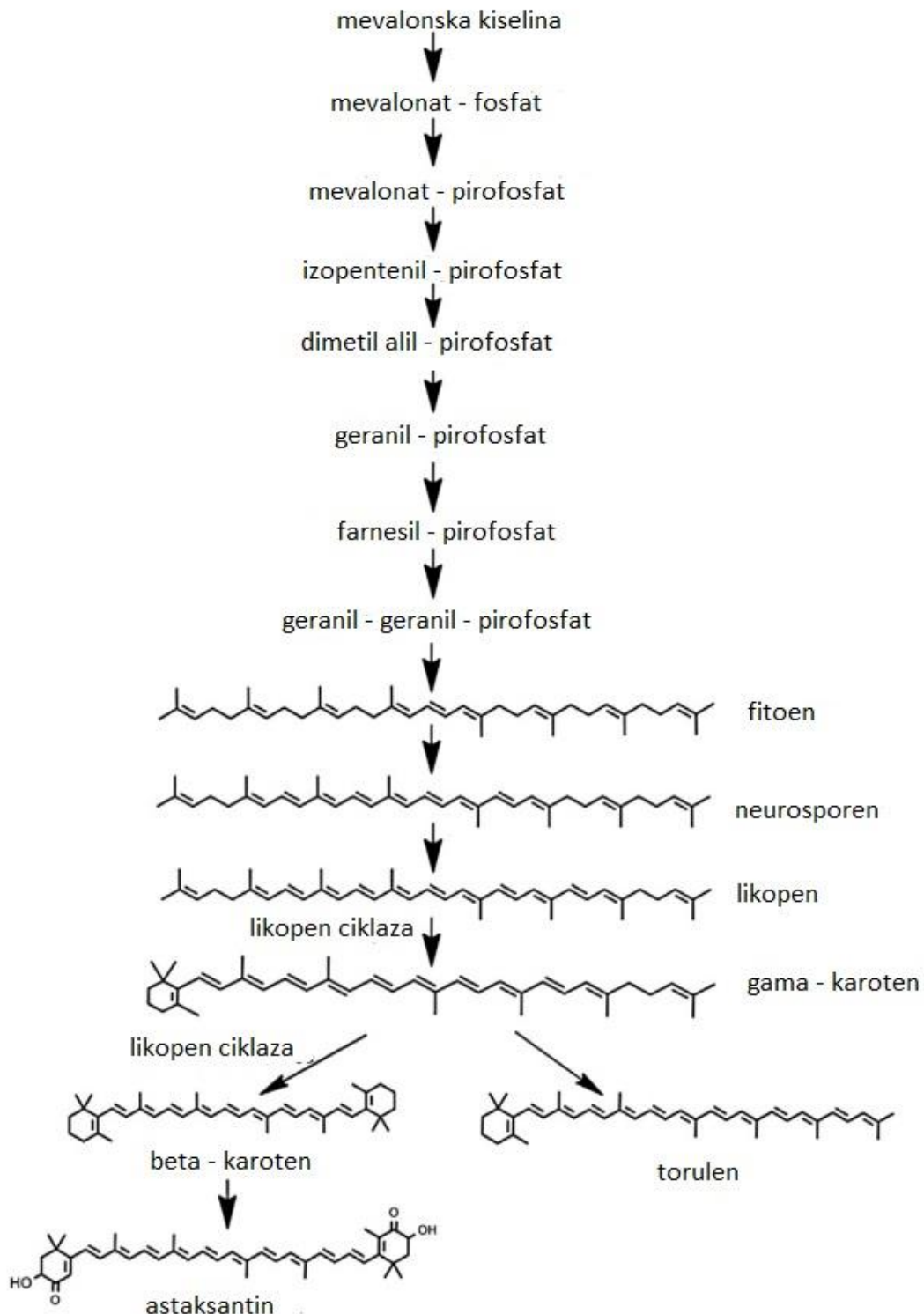
bakterijskih infekcija (Nasrabadi i Razavi, 2011). Na primjer, likopen je najjači antioksidans među karotenoidima. Koristi se za prevenciju srčanih bolesti te sprječava nastajanje nekoliko vrsta tumora jer inhibira sintezu kolesterola i pospješuje razgradnju lipoproteina niske gustoće.  $\beta$ -karoten je narančasto žuti pigment koji se uobičajeno nalazi u biljnom i životinjskom tkivu. Njegove biološke funkcije su: obojenje specifično za vrstu, fotozaštita, apsorpcija svjetlosti te se koristi kao prekursor vitamina i hormona (Hernández-Almanza i sur., 2014). U početku su kao izvori karotenoida, posebice  $\beta$ -karotena i ksantofila, češće korišteni biljni ekstrakti. Iako su biljke i dalje važan izvor prirodnih karotenoida, sve češća je njihova proizvodnja mikrobiološkim procesima. Sve je veći interes za mikrobnu proizvodnju karotenoida, u usporedbi s ekstrakcijom iz povrća ili kemijskom sintezom, uglavnom zbog sezonske i geografske varijabilnosti u proizvodnji i prodaji bojila biljnog podrijetla (Hernández-Almanza i sur., 2014).



**Slika 2.** Struktura karotenoida ( prema Hernández-Almanza i sur., 2014)

## 2.5. BIOSINTETSKI PUT PROIZVODNJE KAROTENOIDA

Biosintetski put proizvodnje karotenoida provodi se u tri koraka (slika 3). Prvi korak je pretvorba acetil-CoA u 3-hidroksi-3-metil glutaril-CoA (HMG-CoA), a reakciju katalizira HMG-CoA sintaza. HMG-CoA zatim prelazi u spoj sa šest ugljikovih atoma, mevalonsku kiselinu, koja nizom reakcija prelazi u izopentenil-pirofosfat (IPP). Navedene reakcije uključuju fosforilaciju pomoću mevalonat kinaze nakon koje slijedi dekarboksilacija. Drugi korak je izomerizacija izopentenil-pirofosfata u dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) sekvencijalnim dodavanjem tri molekule IPP-a u DMAPP. Reakcije katalizira prenil-transferaza, u cilju dobivanja spoja koji se sastoji od dvadeset ugljikovih atoma, a zove se geranil-pirofosfat (GGPP). Kondenzacija dviju molekula GGPP- a dovodi do nastanka fitoena koji prolazi kroz saturaciju do likopena. Treći korak je izomerizacija prve ili druge dvostruke veze fitoena. Likopen je prekursor cikličkih karotenoida koji prolazi niz metaboličkih reakcija (npr. ciklizacija). Bez obzira na supstrat korišten za ciklizaciju, moguće je proučavati mehanizam ciklizacije korištenjem različitih vrsta obilježenog mevalonata (Miziorko, 2011).



**Slika 3.** Biosintetski put proizvodnje karotenoida (prema Hernández-Almanza i sur., 2014)

Karotenoidi se izdvajaju iz biomase ekstrakcijom organskim otapalima. Karotenoidi se mogu ekstrahirati kombinacijom acetona, dietil etera i kloroforma, a koncentracija karotenoida se procjenjuje mjerenjem apsorbancije na 460 nanometara. Proces ekstrakcije može se

optimizirati ovisno o željenom karotenoidu, s obzirom da su neki polarni, a drugi nepolarni što uzrokuje različitu topljivost u različitim otapalima (Hernández-Almanza i sur., 2014) .

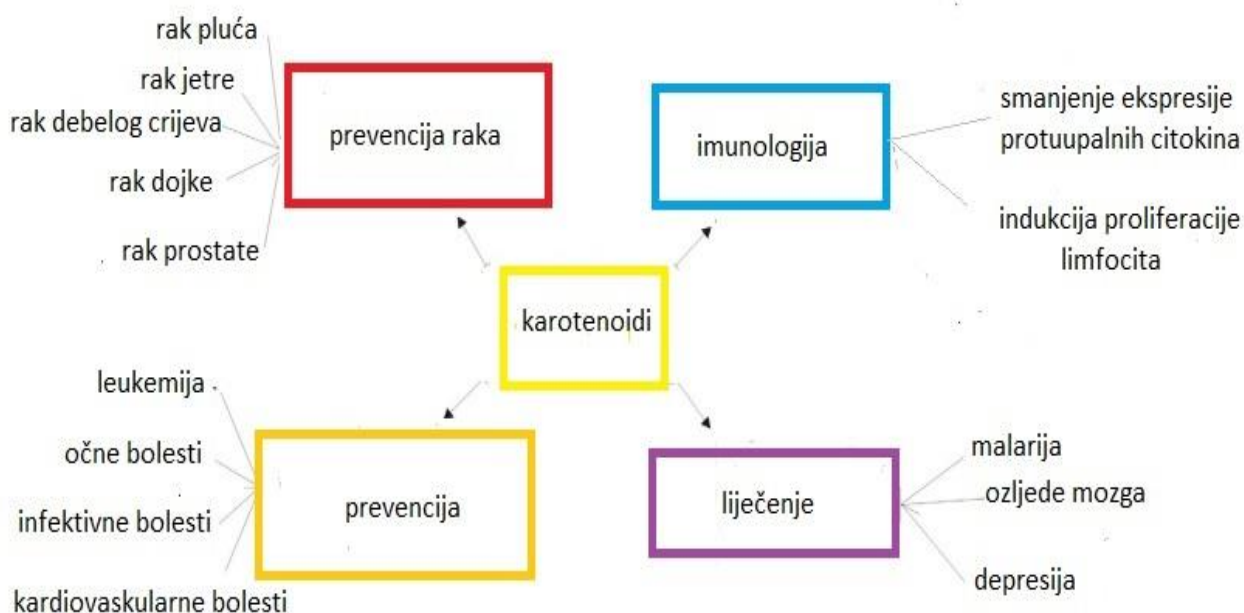
## 2.6. ZDRAVSTVENE KORISTI I NUTRITIVNE VRIJEDNOSTI KAROTENOIDA

$\alpha$ - i  $\beta$ -karoten su prekursori vitamina A. Aktivnost provitamina A je sposobnost prirodnih karotenoida da formiraju retinol (vitamin A) djelovanjem enzima dioksigenaze. Svaki pigment koji u svojoj strukturi sadrži barem jedan nepromijenjeni  $\beta$ -iononski prsten može se smatrati karotenoidom provitamina A (Nabi i sur., 2020). Karotenoidi se nalaze u obojanom voću i povrću poput mrkve, slatkog krumpira, marelice, bundeve i graha.  $\beta$ -karoten ima veću učinkovitost pretvorbe u vitamin A (retinol) od  $\beta$ -kriptoksantina i  $\alpha$ -karotena (Tang, 2014). Osim njihove farmaceutske uloge kao prekursora vitamina A, ovi pigmenti učinkovito inhibiraju niz kroničnih bolesti poput raka dojke i kože. U nekoliko studija procijenjen je potencijal  $\beta$ -karotena za smanjenje rizika od raka pluća. Druge *in vitro* studije dokazale su da je razmnožavanje stanica raka učinkovito inhibirano  $\alpha$ -karotenom. Osim toga, dokazano je da ti pigmenti aktiviraju staničnu komunikaciju i imunološki sustav (Singh i sur., 2015). Likopen je dominantni karotenoid koji se u velikoj mjeri nalazi u voću i povrću, a ključni izvor likopena je rajčica (Arain i sur., 2018). Provedene su brojne *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* studije kako bi se istražili biološki učinci likopena protiv oksidativnog stresa. Likopen smanjuje rizik od raka, uključujući rak jajnika, dojke, prostate, vrata maternice i jetre. Veće koncentracije likopena smanjuju izgled nastajanja kardiovaskularnih bolesti te sprječavaju oksidativno oštećenje kože djelovanjem UV zračenja (Nabi i sur., 2020).  $\beta$ -kriptoksantin također se smatra prekursorom provitamina A koji se u velikoj količini nalazi u agrumima, breskvama, papaji i mangu.  $\beta$ -kriptoksantin djeluje kao terapijski agens, posebno protiv bolesti povezanih s kostima. Dokazano je da unošenje  $\beta$ -kriptoksantina u organizam pojačava aktivnost alkalne fosfataze i povećava sadržaj kalcija u metafiznom tkivu i kortikalnoj kosti što dovodi do smanjenja mogućnosti osteoporoze.  $\beta$ -kriptoksantin također regulira i komunikaciju između stanica te poboljšava imunitet (Burri, 2015).

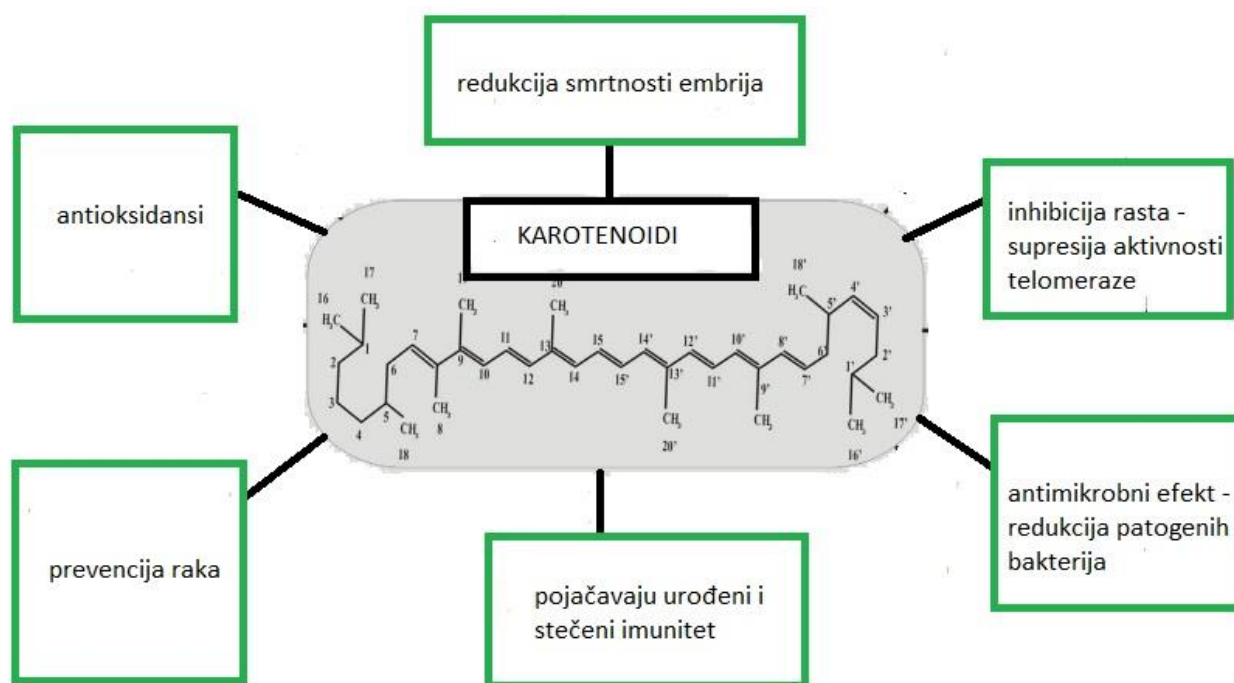
### 2.6.1. Antioksidacijska aktivnost karotenoida

Antioksidansi su biološki aktivni spojevi koji mogu inhibirati ili smanjiti oksidativni stres uzrokovan reaktivnim kisikovim vrstama i nestabilnim spojevima koje tijelo proizvodi kao odgovor na stres iz okoliša (Arain i sur., 2018). Postoje dvije glavne vrste antioksidansa koji se koriste kao dodaci prehrani, a to su sintetski i prirodni antioksidansi. Prirodni antioksidansi široko su rasprostranjeni u prirodi, a možemo ih pronaći u biljkama, voću i povrću. Astaksantin

pripada skupini ketokarotenoida te ublažava oksidativni stres putem nekoliko mehanizama: smanjenjem nuklearnog faktora aktivacije smanjuje proizvodnje upalnih citokina, inhibira aktivnosti renin-angiotenzinskog sustava, suprimira proizvodnju transformirajućeg faktora rasta b1 i pokazuje antimikrobni učinak. Smatra se da karotenoidi štite tijelo od djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta koje uzrokuju neurološke poremećaje i tumore (slike 4 i 5), (Nabi i sur., 2020). U usporedbi s ostalim karotenoidima likopen je najučinkovitiji pigment za zaštitu stanica od oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim vrstama (Arain i sur., 2018). Najvažnija uloga likopena je zaštita DNA od oksidativnog stresa uklanjanjem kisika i suzbijanjem mutacija koje mogu uzrokovati kronične bolesti. Likopen je najučinkovitiji pri suzbijanju slobodnih radikala zbog konjugiranih dvostrukih veza. Likopen poboljšava imunološki odgovor, regulira rasta stanica, transkripciju gena i modulaciju detoksikacije enzima. Osim toga, pojačava i proizvodnju antioksidativnih enzima, na primjer, superoksid dismutaze, glutation transferaze i kinon reduktaze (Sahin i sur., 2013). Likopen smanjuje toplinski stres kod peradi povećanjem proizvodnje citoprotektivnih enzima faze II. Karotenoidi također smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti. Dokazano je da dodatak  $\beta$ -karotena (50 mg na dan) u prehrani smanjuje smrtnost uzrokovanu kardiovaskularnim bolestima. Suplementacija  $\beta$ -karotena sa ili bez aspirina značajno smanjuje rizik od infarkta miokarda. Ipak, treba uzeti u obzir i druge karotenoide poput luteina,  $\beta$ -kriptoksantina i astaksantina koji potencijalno smanjuju šanse za nastajanje kardiovaskularnih bolesti (Nabi i sur., 2020).



Slika 4. Uloga karotenoida u medicini ( prema Nabi i sur., 2020)



Slika 5. Uloga karotenoida u medicini ( prema Nabi i sur., 2020)

## 2.7. MEHANIZAM PROIZVODNJE LIPIDA

U stanicama kvasca lipidi se mogu akumulirati na dva načina: *de novo* (iz molekula acetil-CoA i malonil-CoA) i *ex novo*. U *de novo* metodi za proizvodnju lipida supstrati su ugljikohidrati ili glicerol, a u *ex novo* biosintezi supstrati su hidrofobni spojevi. Kao izvori ugljika za proizvodnju lipida koriste se podloge koje sadrže glukozu, saharozu, glicerol, melasu i različite hidrolizate. U *de novo* sintezi, nakon iscrpljivanja dušikovih spojeva iz okoline dolazi do prekomjerne proizvodnje intracelularnih lipida što je povezano s aktivacijom AMP deaminaze. Ovaj enzim kontrolira razgradnju AMP na inozin monofosfat i  $\text{NH}_4^+$  ione, koji predstavljaju dodatan izvor dušika. Smanjena razina adenozin monofosfata ometa tijek Krebsovog ciklusa jer ovaj spoj aktivira izocitrat dehidrogenazu koja katalizira transformaciju izocitrata u  $\alpha$ -ketoglutarat. U takvim uvjetima mitohondrij akumulira izocitrat koji ostaje u ravnoteži s citratom zahvaljujući aktivnosti akonitaze. Nakon postizanja kritične koncentracije, limunska kiselina se transportira iz mitohondrija u citoplazmu gdje je ATP-citrat liaza cijepa na acetil-CoA i oksal-acetat. Prvi stupanj sinteze masnih kiselina je karboksilacija acetil-CoA pri čemu nastaje malonil-CoA. Zatim dolazi do niza enzimskih reakcija kataliziranih kompleksom sintaze masnih kiselina. Proizvedene masne kiseline mogu se zatim uključiti u put sinteze triacilglicerola (Kot i sur., 2016).

## 2.8. UTJECAJ RAZLIČITIH FAKTORA NA KULTIVACIJU KVASCA *Rhodotorula*

U cilju smanjenja troškova biotehnoloških procesa provedena su istraživanja za optimizaciju uvjeta uzgoja. Neki od uvjeta koje je potrebno optimizirati su: koncentracija ugljika i dušika, koncentracija minerala i vitamina, pH, zračenje, temperatura i dodatak stresora (Yen i Yang, 2012). Stres u biološkim tkivima dovodi do biokemijskog odgovora koji povećava aktivnosti enzima u organizmu te posljedično dolazi do povećane razine karotenoida tijekom uzgoja kvasca u nepovoljnim i promijenjenim uvjetima. U cilju povećanja prinosa lipida i pigmenata korišten je optimalni omjer dušika i ugljika u kombinaciji sa stresnim uvjetima kao što su osmotski stres (dodatak natrijeva klorida) te oksidativni stres (dodatak vodikovog peroksida) (Sala i sur., 2012).

### 2.8.1. Faktori koji utječu na sintezu intracelularnih lipida

Na biosintezu intracelularnih lipida kvasaca iz roda *Rhodotorula* utječu mnogi faktori. Značajnu ulogu ima molarni omjer ugljika i dušika (C/N) u hranjivoj podlozi. Istraživanja pokazuju da optimalni dodatak glicerola za proizvodnju biomase kvasca iznosi 8,5 % (C/N 60

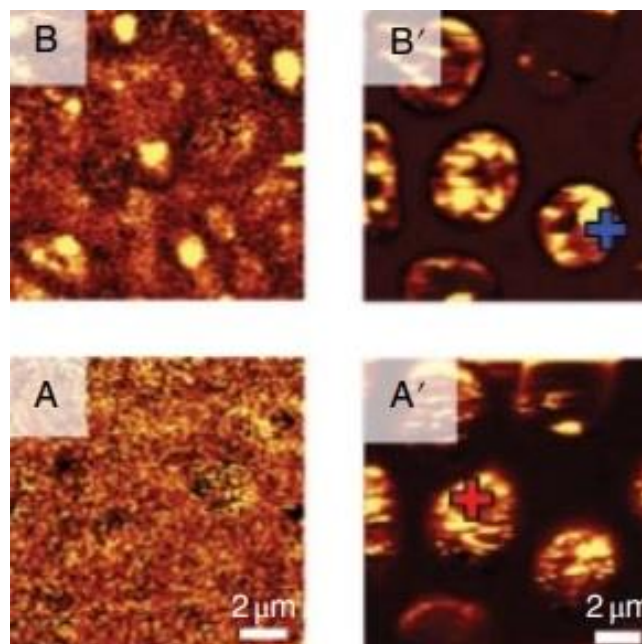


mol/mol). Kad je količina glicerola povećana na 9,5 % (C/N 85 mol/mol) uočen je najviši sadržaj lipida (približno 42 %). Najveći udjel lipida uočen je nakon 72 sata uzgoja, a uglavnom je sadržavao oleinsku (45,75 %) i linolu kiselinu (17,92 %). pH hranjivog medija također ima značajan učinak na biosintezu lipida. Najveći udio lipida od 66 % uočen je u hranjivoj podlozi čija je pH vrijednost iznosila 4, dok je pri pH vrijednostima 3, 5 i 6 udio lipida na istoj hranjivoj podlozi iznosio 44 %. Prisutnost otopljenog kisika u hranjivoj podlozi je još jedan važan čimbenik koji određuje biosintezu intracelularnih lipida. Povećanjem sadržaja otopljenog kisika u hranjivoj podlozi smanjuje se ukupna količina lipida. Uspostavljenjem saturacije kisika na 15-35 % udjel lipida u biomasi bio je 62 %, dok je povećanje postotka zasićenja kisikom na 50-70 % rezultiralo smanjenjem udjela lipida na 52 % (Kot i sur., 2016).

## 2.9. UTJECAJ STRESA NA PROIZVODNJU I PRINOS KAROTENOIDA I LIPIDA

Brojni čimbenici utječu na uspješnost proizvodnje i prinos lipida i karotenoida. Neki od njih su: temperatura, sastav hranjive podloge, pH i prisutnost kemijskih tvari. Djelovanje ovih faktora utječe na ukupni udjel lipida i karotenoida, sastav pigmenata i prisutnost izomera karotenoida (Kaczor i Pacia, 2016). Osvjetljenje bijelim svjetlom jedan je od najčešće proučavanih čimbenika koji utječu na koncentraciju karotenoida u kvascima, algama, bakterijama i gljivama. Svjetlost utječe na rast mikroorganizma i aktivaciju enzima koji sintetiziraju karotenoide. Ovisno o tipu osvjetljenja (kontinuirano ili periodično), odabranom intenzitetu svjetla i prisutnosti drugih čimbenika (temperatura, metalni ioni, kemijske tvari), sastav karotenoida i udjel izomera varira u širokom rasponu. Varijacije u temperaturi u rasponu od 10-40 °C utječu na razlike u udjelima  $\beta$ -karotena, torulena i torularhordina. Maseni omjeri  $\beta$ -karotena, torulena i torularhordina na 10 °C su 88 : 9 : 3, a na 40 °C su 65 : 28 : 7 (Bhosale i Gadre, 2002). Koncentracija torulena raste pri višim temperaturama jer je dehidrogenacija i dekarboksilacija  $\gamma$ -karotena, koja dovodi do sinteze torulena, korak ovisan o temperaturi. Do inhibicije u proizvodnji torulena i torularhordina te veće akumulacije  $\beta$ -karotena u stanicama dolazi tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula* na 5 °C. Budući da se torulen i torularhodin uglavnom koriste kao proizvodi za stočnu hranu, a ne kao dodaci prehrani i farmaceutskim proizvodima, niska temperatura koja utječe na nakupljanje  $\beta$ -karotena ključna je u uzgojima kvasca *Rhodotorula* u velikom mjerilu. Izvor ugljika ima dvostruku ulogu tijekom mikrobne fermentacije. On je glavni sastojak za izgradnju staničnog materijala i važan je izvor energije. Najveća količina  $\beta$ -karotena proizvedena je pri korištenju D-glukoze kao izvora ugljika, koja se

asimilira u metaboličkom putu biosinteze  $\beta$ -karotena. Najčešće korišten izvor ugljika nakon glukoze je fruktoza, ali i dekstrini, topljivi škrob te maltoza rezultirali su dobivanjem sličnih koncentracije  $\beta$ -karotena. Utvrđeno je kako su krumpir, saharoza, glicerol, sirutka i laktoza loši supstrati za rast stanica i proizvodnju  $\beta$ -karotena. Kod kvasaca, sposobnih za oksidativnu fosforilaciju i za fermentaciju, okoliš značajno utječe na metabolizam i na kapacitet proizvodnje pigmentata. Na stanicama kvasca *Rhodotorula* dokazano je da se karotenoidi ne sintetiziraju u anaerobnom okruženju, a dominiraju u stanicama uzgojenim u prisutnosti kisika (Pacia i sur., 2015). U kvascu uzgojenom u aerobnim uvjetima karotenoidi su kolokalizirani s lipidima, što je dokazano korištenjem Ramanove slike (slika 6) visoke razlučivosti.



**Slika 6.** Ramanova slika visoke razlučivosti s prikazom karotenoida kolokaliziranih s lipidima u anaerobnim uvjetima (A i B lijevo) i aerobnim uvjetima (A i B desno), (prema Kaczor i Pacia, 2016)

Povećanje saliniteta izazvano natrijevim kloridom je važan egzogeni faktor stresa koji potiče mikrobnostanice na pojačanu karotenogenezu. Kao odgovor na osmotski stres neki sojevi kvasaca pokazali su značajno povećanje proizvodnje karotenoida. Kvasci *Rhodotorula glutinis* i *Rhodotorula mucilaginosa* proizvode 2,5 puta više  $\beta$ -karotena nakon dodatka 10 % natrijeva klorida na početku faze rasta. Najveći prinos  $\beta$ -karotena dobiven je dodatkom osmotskih (natrijev klorid) i oksidativnih (vodikov peroksid) stresora. Glavni problem u optimizaciji industrijskih procesa proizvodnje karotenoida je činjenica da različiti stresni faktori koji utječu na karotenogenezu mogu imati sinergijsko djelovanje i djelovati različito u različitim

mikroorganizmima. Ovisnost između različitih čimbenika rezultira nemogućnošću uspostavljanja jedinstvene optimizacijske sheme za različite proizvođače karotenoida (Kaczor i Pacia, 2016).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten u ovom radu je kvasac *Rhodotorula sp. MG2*.

##### 3.1.2. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih za hranjivu podlogu, njihova čistoća i podrijetlo navedeni su u tablici 1, 2 i 3.

**Tablica 1.** Čistoća i podrijetlo kemikalije korištenih za pripremu hranjive podloge za inokulum

<b>Kemikalija</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
glukoza	≥ 99%	Sigma – Aldrich, SAD
pepton	p.a.	Fischer Scientific, UK
kvašičev ekstrakt	za mikrobiologiju	Liofilchem, Italija
natrijev klorid	techn.	Solana Nin, Hrvatska

**Tablica 2.** Čistoća i podrijetlo kemikalije korištenih za pripremu hranjive podloge.

<b>Kemikalija</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
otopina minerala u tragovima		
Željezov (II) sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
glukoza	p.a.	Sigma – Aldrich, SAD
kvašičev ekstrakt	za mikrobiologiju	Liofilchem, Italija
natrijev hidrogenfosfat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
amonijev sulfat	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 3.** Sastav otopine minerala u tragovima

<b>Minerali</b>	<b>Koncentracija [g/L]</b>
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$ (natrijev molibdat)	0,17
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (kobaltov (II) klorid heksahidrat)	0,13
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (manganov (II) sulfat monohidrat)	0,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (bakrov (II) sulfat pentahidrat)	0,13
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (cinkov sulfat heptahidrat)	0,75
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (kalcijev klorid dihidrat)	3,6

**Tablica 4.** Sastav LB hranjive podloge

<b>Sastojak</b>	<b>Količina</b>
bakto-tripton	10 g
kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
agar	20 g/L

### 3.1.3 Ostale kemikalije

Popis ostalih kemikalija korištenih za provedbu eksperimenta, njihova čistoća i podrijetlo navedeni su u tablici 5.

**Tablica 5.** Čistoća i podrijetlo ostalih kemikalija.

<b>Kemikalija</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
acetone	p.a.	Kemika, Hrvatska
klorovodična kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
metanol	p.a.	Sigma, SAD

kloroform	p.a.	Acros Organics, SAD
dimetilsulfoksid	p.a.	Sigma, SAD
petroleter	p.a.	Sigma, SAD
etanol	p.a., apsolutni	Gram – Mol, Hrvatska
sumporna kiselina	p.a.	Carlo Erba, Italija
kalcijev karbonat	p.a.	Kemika, Hrvatska
cinkov (II) sulfat heptahidrat	p.a.	Merk, Njemačka
natrijev hidroksid	p.a.	Merk, Njemačka
natrijev karbonat	p.a.	Gram – Mol, Hrvatska
heksan	p.a.	Carlo Erba, Italija
Folin – Ciocalteu reagens	-	Sigma – Aldrich, Švicarska

### 3.1.4. Hranjive podloge

#### 3.1.4.1. Tekuća hranjiva podloga za uzgoj inokuluma

Tekuća hranjiva podloga za uzgoj inokuluma sadržavala je 20 g/L glukoze, 20 g/L peptona, 10 g/L kvašćevog ekstrakta i 25 g/L natrijevog klorida.

#### 3.1.4.2. Tekuća hranjiva podloga za glavni uzgoj

Sastav hranjive podloge za glavni uzgoj naveden je u tablici 2. Podloga je raspodijeljena u 12 tikvica u koje je dodana različita koncentracija natrijevog klorida. Kontrolna tikvica sadržavala je 0 g/L natrijeva klorida, a u ostalim tikvicama koncentracije natrijevog klorida bile su: 25 g/L, 50 g/L i 75 g/L. Za svaku koncentraciju natrijeva klorida napravljene su tri paralele. Početni pH u tekućoj hranjivoj podlozi za glavni uzgoj bio je između 5,5 i 6. U tablici 6 prikazan je sastav hranjive podloge za uzgoj kvasca *Rhodotorula*.

**Tablica 6.** Koncentracije kemikalija korištenih za pripremu hranjive podloge za glavni uzgoj

Kemikalija	Koncentracija
metali u tragovima	10 mL/L
željezov (II) sulfat	6 mL/L
glukoza	57 g/L
kvašćev ekstrakt	1 g/L
natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat	1 g/L

kalijev dihidrogenfosfat	1 g/L
magnezijev sulfat heptahidrat	0,4 g/L
amonijev sulfat	1 g/L

### 3.1.5. Aparatura i pribor

#### 3.1.5.1. UV – Vis spektrofotometar

Spektrofotometar korišten za mjerenje optičke gustoće hranjive podloge je Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, SAD). Optička gustoća mjerena je pri valnoj duljini od 600 nm. Optička gustoća uzoraka izmjerena je u staklenim kivetama (Hellma Optik GmbH, Njemačka).

#### 3.1.5.2. Centrifuga

Za izdvajanje biomase kvasca korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (SAD) čiji je kapacitet 6 kiveta, a za centrifugiranje uzoraka prije tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC) korištena je centrifuga Eppendorf 5804 R (Njemačka).

#### 3.1.5.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra performance liquid chromatography, UPLC*)

Za određivanje ugljikohidrata i proteina iz biomase kvasca korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (1290 Infinity II, Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe ( G7104A 1290 Flexible Pump), automatskog injektora (G7129B 1290 Vialsampler) i termostata , analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %), Phenomenex) s pripadajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) te računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS). Volumeni injektiranih uzoraka bili su 10 µL, a kao mobilna faza korištena je H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,0025 M) čiji je protok 0,6 mL/min.

#### 3.1.5.4. Ostala oprema

U tablici 7. nalazi se popis i proizvođač ostale opreme korištene pri izvođenju eksperimenta.

**Tablica 7.** Oprema korištena u istraživanju

Oprema	Proizvođač
autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
analitička vaga	Acculab ALC210.4, Njemačka
tehnička vaga	ET-1111; Tehnica, Slovenija
boca plina s dušikom	Messer Croatia Plin, Hrvatska

laboratorijska tresilica	SHKE2000-1CE; ThermoScientific, SAD
vortex	VM-10; Witeg, Njemačka
sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
mikroskop	CH20; Olympus, Japan
hladnjak i zamrzivač	Gorenje, Slovenija
ledomat	AF-10; Scotsman, Italija
vodena kupelj	VK5ER; InkoLab, Hrvatska

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema inokuluma i hranjivih podloga za uzgoj kvasca *Rhodotorula sp.*

Za pripremu hranjive podloge za inokulum korištene su Erlenmeyerove tikvice od 500 mL koje su sadržavale 200 mL podloge. Volumen za inokulaciju hranjive podloge bio 10 % (vol/vol), to jest, 20 mL po tikvici. Uzgoj je proveden na tresilici pri temperaturi od 28 °C i rotacijom od 150 okretaja/min.

#### 3.2.2. Glavni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi

Uzgoj kvasca je proveden na hranjivoj podlozi koja služi za rast kvasca te proizvodnju lipida i pigmenta. Volumen hranjive podloge je podijeljen na 12 tikvica od 500 mL s odbijačima vrtloga. Svaka tikvica sadržavala je 200 mL podloge te je inokulirana s 10 % (vol/vol) volumena inokuluma. Tikvice su podijeljene u četiri grupe po tri tikvice sa različitim koncentracijama natrijeva klorida. Prva skupina od tri tikvice bila je kontrolna skupina te je sadržavala 0 g/L natrijeva klorida. U preostalim skupinama tikvica koncentracije natrijevog klorida bile su: 25 g/L, 50 g/L i 75 g/L. Uzgoj je proveden na tresilici pri temperaturi od 28 °C i pri 150 okretaja/min. Uzgoj je trajao 6 dana te se tokom uzgoja određivala optička gustoća.

### 3.3. ANALITIČKE METODE

#### 3.3.1. Mjerenje optičke gustoće uzorka

Optička gustoća uzorka mjerena je UV-Vis spektrofotometrom Cary 100 (Agilent Technologies, USA). Valna duljina pri kojoj je mjerena optička gustoća je 600 nm. Za mjerenje su korištene staklene kivete (Hellma Optik GmbH, Njemačka). Mjerila se optička gustoća nerazrijeđene hranjive podloge te prvog, drugog i trećeg decimalnog razrjeđenja.



### 3.3.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari

Deset mililitara kulture kvasca preneseno je u prethodno izvaganu i osušenu (105 °C) plastičnu Falcon kivetu od 15 mL. Uzorak je centrifugiran 5 minuta pri 5000 okretaja/minuti. Nakon centrifugiranja supernatant je dekantiran, a preostala biomasa isprana je s 10 mL destilirane vode te resuspendirana. Biomasa je ponovno izdvojena centrifugiranjem pri 5000 okretaja/minuti tijekom 5 minuta. Supernatant je izdvojen, a biomasa je osušena pri 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja ohlađene kivete sa osušenom biomasom su izvagane na analitičkoj vagi. Koncentracija suhe tvari biomase kvasca određena je prema sljedećoj jednadžbi.

$$X = \frac{m_{sk} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad [1]$$

gdje je:

X = koncentracija biomase kvasca [g/L]

$m_{sk}$  = masa kivete sa suhom biomasom [g]

$m_{pk}$  = masa prazne osušene kivete [g]

$V_{uz}$  = volumen izuzetog uzorka [L]

### 3.3.3. Određivanje udjela $\beta$ -karotena u biomasi kvasca

Određivanje udjela ukupnih karotenoida u biomasi kvasca provedeno je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije ekstrakta liofilizirane biomase kvasca. Dvije metode ekstrakcije korištene su ovom radu: jednostavna ekstrakcija acetonom pri sobnoj temperaturi (postupak 1) i ekstrakcija smjesom acetona i petroletera pri povišenoj temperaturi (postupak 2).

#### 3.3.3.1. Jednostavna ekstrakcija $\beta$ -karotena (postupak 1)

Kako bi se odredila koncentracija  $\beta$ -karotena 10 mL kulture kvasca je preneseno u plastičnu kivetu volumena 15 mL. Kultura je centrifugirana 5 min pri 5000 okretaja/minuti. Supernatant je izdvojen nakon centrifugiranja, biomasa je isprana s destiliranom vodom te je resuspendirana pomoću vortexa. Biomasa resuspendirana u destiliranoj vodi ponovo je centrifugirana pri 5000 okretaja/ minuti u vremenu od 5 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen, a biomasa je pohranjena na – 20 °C. U staklene kivete stavljeno je po 20 mg biomase te su kivete omotane sa aluminijskom folijom kako bi se spriječilo dopiranje svjetla do biomase i razgradnja pigmenta pod utjecajem svjetla. U svaku kivetu dodano je 2 mL acetona te je biomasa resuspendirana u acetonu pomoću vibro miksera. Nakon miješanja u svaku kivetu dodano je

po 2 g staklenih kuglica. Sadržaj u kiveti miješan je 30 sekundi, a potom ohlađen na ledu dvije do tri minute. Ovaj postupak je ponavljan četiri puta u cilju što bolje ekstrakcije pigmenata. Suspenzija liziranih stanica centrifugirana je u plastičnim kivetama omotanim aluminijskom folijom kako bi se spriječila degradacija pigmenata na dnevnoj svjetlosti.. Nakon pet minuta centrifugiranja pri 5000 okretaja u minuti supernatant je odliven u čistu, staklenu i prethodno izvaganu kivetu koja je također obavijena aluminijskom folijom. U talog nakon centrifugiranja dodano je 2 mL acetona te su kivete podvrgnute miješanju 30 sekundi na vibro mikseru, a nakon toga kivete su ohlađene na ledu kroz dvije do tri minute. Ovaj postupak je ponovljen još dva puta, nakon čega su kivete centrifugirane 5 min pri 5000 okretaja u minuti.

Supernatant je izdvojen nakon centrifugiranja, a talogu je ponovo dodano 2 mL acetona i cijeli postupak je ponavljan sve dok nije postignuto obezbojenje taloga. Supernatanti koji su se izdvajali nakon svakog centrifugiranja uparavani su strujom plinovitog dušika. Suhi izvagani ostatak nakon uparavanja otopljen je u 2 mL acetona te je mjerena apsorbancija pri 450 nm za uzorke sa različitim koncentracijama natrijeva klorida. Na temelju dobivenih apsorbancija određivana je koncentracija  $\beta$ -karotena ( $X_{\beta k}$ , mg/L) prema navedenoj jednadžbi.

$$A = 0,0115 \cdot \gamma_{\beta k} + 0,0072 \quad [2]$$

gdje je:

A = apsorbancija

$\gamma_{\beta k}$  = koncentracija  $\beta$ -karotena [mg/L]

### *3.3.3.2 Ekstrakcija $\beta$ -karotena smjesom acetona i petrol etera pri povišenoj temperaturi (postupak 2)*

Prvi korak pri određivanju koncentracije  $\beta$ -karotena u biomasi bilo je razbijanje stanica kvasca. U staklene kivete izvagano je 40 mg liofiliziranih stanica kojima je dodano 2 mL dimetilsulfoksida i 0,5 g staklenih kuglica te su stanice miješane na vibro mikseru kako bi se razbila stanična stijenka. Potom su uzorci inkubirani 30 minuta u vodenoj kupelji pri 60 °C u vremenskom periodu od 30 minuta. Nakon ekstrakcije uzorci su ponovo podvrgnuti miješanju na vibro mikseru te su potom ohlađeni na ledu. Ohlađenim uzorcima dodano je 4 mL smjese acetona i petrol etera u omjeru 1:1 (vol/vol) te 20 % -tna (w/v) otopina natrijeva klorida. Nakon intenzivnog miješanja na vorteksu izdvojena su dva sloja. Gornji sloj sadržavao je ekstrahirane karotenoide u petrol eteru, a donji sloj sadržavao je aceton. Gornji sloj izuzeo se pomoću šprice

i prebačen je u čistu, suhu i izvaganu staklenu kivetu. Uslijedilo je uparavanje uzoraka u struji plinovitog dušika. Suhi ostatak otopio se u 1 mL acetona te je izmjerena apsorbancija uzorka pri 450 nm UV-Vis spektrofotometrom. Na temelju izmjerenih apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm određena je koncentracija  $\beta$ -karotena za uzorke s različitim koncentracijama natrijeva klorida. Koncentracija  $\beta$ -karotena ( $\gamma_{\beta k}$ , mg/L) računala se prema sljedećoj jednadžbi:

$$A = 0,0115 \cdot \gamma_{\beta k} + 0,0072 \quad [3]$$

gdje je:

A = apsorbancija

$\gamma_{\beta k}$  = koncentracija  $\beta$ -karotena [mg/L]

### 3.3.3.3 Određivanje udjela ukupnih karotenoida u biomasi kvasca

Suhi ostatak dobiven uparavanjem ekstrahiranih uzoraka u struji plinovitog dušika izvagan je te otopljen u određenom volumenu acetona. Mjerenjem apsorbancije na UV-Vis spektrofotometru određene su koncentracije karotenoida u uzorcima pomoću baždarnog dijagrama. Masa i udjel karotenoida izračunati su iz poznatih koncentracija prema sljedećim jednadžbama:

$$m_{UK} = V \cdot \gamma_{\beta k} \quad [4]$$

gdje je:

$m_{UK}$  = masa ukupnih karotenoida [mg]

V = volumen otapala

$\gamma_{\beta k}$  = koncentracija  $\beta$ -karotena [mg/L]

$$w_{UK} = \frac{m_{UK}}{m_{bm}} \cdot 100 \% \quad [5]$$

gdje je:

$w_{UK}$  = udjel  $\beta$ -karotena u biomasi kvasca

$m_{UK}$  = masa ukupnih karotenoida [mg]

$m_{bm}$  = masa biomase uzeta u ekstrakciju

### 3.3.4. Određivanje udjela lipida u biomasi

Lipidi iz biomase kvasca ekstrahirani su pomoću smjese otapala kloroforma i metanola. Prvi korak bio je razbijanje stanične stijenke. U tarioniku s tučkom usitnjena je liofilizirana biomasa kvasca te je izvagano 40 mg i preneseno u staklenu kivetu. Uzorcima je dodano 2 mL 1 M klorovodične kiseline te su uzorci stavljeni u vodenu kupelj pri temperaturi od 60 °C u vremenu od dva sata. Uslijedila je ekstrakcija ukupnih lipida dodavanjem 2 mL kloroforma i 2 mL metanola. Sadržaj staklenih kiveta je vorteksiran te mu je dodan 1 mL 20 % -tne (masa/vol) otopine natrijeva klorida. Uzorci su ostavljeni stajati preko noći na 4 °C kako bi faze bile u potpunosti razdvojene. Špricom je izdvojena donja kloroformska faza koja je sadržavala lipide te je prenesena u čistu, suhu i izvaganu staklenu kivetu. Kloroform je uklonjen propuhivanjem uzorka strujom plinovitog dušika . Staklene kivete potom su sušene u sušioniku pri 100 °C kako bi se uklonili tragovi vode koji su mogli ostati u kloroformskoj fazi. Potom su staklene kivete izvagane na analitičkoj vagi. Udio lipida u biomasi kvasca izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$W_L = \frac{m_1 - m_2}{m_x} \cdot 100 (\%) \quad [6]$$

gdje je:

$m_1$  - masa osušene, prazne epruvete [g]

$m_2$  - masa epruvete nakon sušenja [g]

$m_x$  - masa biomase uzeta u analizu [g]

### 3.3.5. Određivanje sposobnosti sinteze soforolipida

Kvasci roda *Rhodotorula* sintetiziraju soforolipide glikolipinog sastava koje izlučuju van stanice. Ove amfifilne molekule imaju hidrofilni i hidrofobni dio te se nakupljaju na granici dviju faza (vodene i uljne) stabilizirajući emulziju (Sen i sur., 2017). Za određivanje sposobnosti sinteze soforolipida proveden je kvalitativni test prema Cooperu i Goldenbergu (Cooper i Goldenberg, 1987). U staklenim epruvetama je dodan supernatant kulture kvasca i suncokretovo ulje u omjeru 1 : 1 (vol/vol) tj. 3 mL biljnog ulja i 3 mL supernatanta. Uzorak u staklenoj epruveti je miješan na vibro mikseru dvije minute te je određena ukupna visina tekućine tj. emulzije. Nakon jednog sata te nakon 24 sata izmjerena je visina pojedinih faza.

### 3.3.6. Određivanje koncentracije glukoze tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

U staklenu kivetu dodani su jednaki volumeni (po 2 mL) 10 %-tne otopine cinkovog sulfata heptahidrata i supernatanta kulture te su vorteksirani 30 sekundi. Otopina cinkovog sulfata heptahidrata služi kako bi se proteini prisutni u uzorku istaložili. Uzorci su 30 minuta inkubirani na sobnoj temperaturi nakon čega su centrifugirani pri 7000 okretaja u minuti u vremenskom periodu od 10 minuta i pri temperaturi od 4 °C. Pripremljeni uzorci razrijeđeni su destiliranom vodom u omjeru 1 : 10 (vol/vol). Nakon filtriranja uzoraka kroz filter veličine pora 0,2 μm, uzorci su analizirani na UPLC – u. Koncentracija glukoze računa se prema sljedećoj jednadžbi baždarnog pravca:

$$\text{Površina pika} = 140381,12 \cdot \gamma_g - 157,58 \quad [7]$$

gdje je:

Površina = površina pika glukoze (5,249)

$\gamma_g$  = koncentracija glukoze [g/L]

### 3.3.7. Izdvajanje i određivanje sastava egzopolisaharida

U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 500 mL stavljeno je 50 mL supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzoraka te 100 mL 96 % (vol/vol) etanola, tako da je omjer sastojaka smjese iznosio 1 : 2 (vol/vol). Kako bi došlo do taloženja egzopolisaharida, smjesa je preko noći stavljena na temperaturu od – 20 °C. U izvagane plastične kivete volumena 50 mL stavljeno je 50 mL smjese etanola i supernatanta koja je potom centrifugirana u vremenu od 10 minuta pri 8000 okretaja u minuti te temperaturi od + 4 °C. Takav postupak ponovljen je tri puta za svaki od uzoraka. Dobiveni talog ispran je s 96 % etanolom te je ponovo centrifugiran pri istim uvjetima. Nakon centrifugiranja uslijedilo je sušenje taloga na sobnoj temperaturi. Dobiveni talog usitnjen je u prah u tarioniku te je na analitičkoj vagi izvagano 25 mg taloga. U staklenu kivetu dodan je izvagan talog te 250 μL 72 %-tne sumporne kiseline. Sadržaj u staklenoj kiveti je promiješan te je kiveta potom inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije uzorcima je dodano 7 mL destilirane vode te je sadržaj u staklenim kivetama (Sutjeska, Jugoslavija) inkubiran sat vremena pri temperaturi od 121 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu uzorcima je podešen pH na 5 dodatkom kalcijeva karbonata. Supernatant je filtriran kroz membranski filter čije su pore veličine 0,22 μm u vijalu za analizu

na UPLC-u. Koncentracija ugljikohidrata određena je analizom na UPLC-u te je izračunata prema sljedećim jednadžbama:

$$\text{Površina pika} = 144244 \cdot \gamma_k - 1142,6 \quad [8]$$

gdje je:

Površina = površina pika ksiloze (5,590)

$\gamma_k$  = koncentracija ksiloze [g/L]

$$\text{Površina pika} = 128443 \cdot \gamma_a - 3314,1 \quad [9]$$

gdje je:

Površina = površina pika arabinoze(5,763)

$\gamma_a$  = koncentracija arabinoze [g/L]

Udio monosaharida ( $w_{UH}$ ) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$W_{UH} = \frac{m_{UH}}{m_x} \cdot 100 (\%) \quad [10]$$

gdje je:

$m_{UH}$  = masa ugljikohidrata [mg]

$m_x$  = masa biomase [mg]

$w_{UH}$  = udio ugljikohidrata u biomasi [%]

Masa ugljikohidrata u talogu izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_{UH} = V \cdot m_{MS} \cdot k \quad [11]$$

gdje je:

$m_{UH}$  = masa ugljikohidrata [mg]

$V$  = volumen uzorka [mL]

$M_{MS}$  = masa monosaharida (ksiloza + arabinoza) [mg]

$k$  = koeficijent pretvorbe pentoza u pšolisaharide [0,88]

Vrijeme zadržavanja ksiloze u koloni iznosi 5,5 minuta, a arabinoze 6 minuta.

### 3.3.8. Određivanje udjela proteina u biomasi

Udio proteina u biomasi kvasca određen je metodom po Lowry-ju. U lužnatom mediju reagiraju peptidne veze i  $\text{Cu}^{2+}$  ioni čime dolazi do tamnoplavog obojenja zbog redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$  ione. Na kraju je dobiveno plavo obojenje nakon dodavanja Folin-Ciocalteu reagensa u reakcijsku smjesu jer smjesa anorganskih soli reagira s pobočnim lancima triptofana i tirozina. U staklenu kivetu izvagano je 10 mg suhe tvari biomase kvasca te je dodano 0,5 mL destilirane vode. Kako bi se stanice resuspendirale, uzorci su vorteksirani jednu do dvije minute. U uzorak s resuspendiranim stanicama dodano je 0,5 mL 1 M natrijeva hidroksida. Uzorci su razrijeđeni s destiliranom vodom. Začepljene staklene kivete kuhane su u vodenoj kupelji na 100 °C u periodu od 10 minuta. Nakon 10 minuta kivete su izvađene iz vodene kupelji te ostavljene na hlađenju na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu uzeto je 0,5 mL drugog razrijeđenja uzorka te je dodano 2,5 mL otopine C, a nakon 10 minuta naglo je dodano 0,5 mL otopine D te je sadržaj vorteksiran jednu minutu. Kivete su ostavljene na sobnoj temperaturi, u tami, 40 minuta. Uzorak je prebačen u plastičnu kivetu te mu je izmjerena apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 550 nm. Masa i udio proteina u biomasi izračunati su pomoću sljedećih jednačini:

$$m_{pr} = \gamma_{pr} \cdot V \quad [12]$$

$$w_{pr} = \frac{m_{pr}}{m_x} \cdot 100 (\%) \quad [13]$$

gdje je:

$m_{pr}$  = masa proteina [mg]

$\gamma_{pr}$  = koncentracija proteina [mg/L]

$V$  = volumen uzorka [mL]

$w_{pr}$  = udio proteina u biomasi [%]

$m_x$  = masa biomase [mg]

**Tablica 8.** Sastav otopina za određivanje koncentracije proteina

Otopina	Sastav
Reagens A	5 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Reagens B	0,5 % $\text{CuSO}_4$ u 1% K, Na – tartaratu
Reagens C	Reagensi A i B u omjeru 50:1

Reagens D	Folin – Ciocalteu reagens razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:1
-----------	--

### 3.3.9. Određivanje udjela pepela u biomasi kvasca

U prethodno označene, ožarene, u eksikatoru ohlađene porculanske lončice koji su izvagani, odvagano je 500 mg usitnjene i homogenizirane biomase. Porculanski lončići s uzorkom zagrijavani su na Bunsenovom plameniku dok nisu potpuno pougljenili. a potom su prebačeni u mufolnu peć koja je prethodno zagrijana na 550 °C. Uzorak je ostavljen u mufolnoj peći sve dok nije postignut pepeo konstantne mase ili dok nije dobiven jednolični sivi pepeo bez crnih čestica. Nakon spaljivanja porculanski lončići s pepelom hlađeni su u eksikatoru te zatim izvagani na analitičkoj vagi. Udio pepela u biomasi kvasca računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$w_p = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 (\%) \quad [14]$$

gdje je:

$w_p$  = udio pepela [%]

$m_1$  = masa prazne osušene porculanske zdjelice [g]

$m_2$  = masa uzorka i porculanske zdjelice prije spaljivanja [g]

$m_3$  = masa porculanske zdjelice i pepela [g]

### 3.3.10. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja metodom disk difuzije

Za pripremu ekstrakta pomiješano je 500 mg liofilizirane biomase u 5 mL 100 % metanola. Ekstrakcija je provedena pri 15 °C u ultrazvučnoj kupelji kroz sat vremena. Biomasa je odvojena od supernatanta te podvrgnuta još jednom koraku ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji dodatkom 5 mL metanola kroz sat vremena. Ekstrakti iz pojedinih koraka su spojeni te upareni u struji plinovitog dušika. Suhi ostatak je izvagan i otopljen u određenom volumenu 100 % metanola. Pripremljen je stanični ekstrakt u različitim koncentracijama: 0,1 g/L, 1 g/L i 30 g/L.

Kao test mikroorganizmi za ispitivanje antimikrobnog djelovanja ekstrakta kvasca *Rhodotorula sp MG2*. korišteni su: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Fusarium verticilloides*. Test mikroorganizmi uzgojeni su u LB hranjivom mediju (tablica 4) za rast te je na tekuće LB podloge s agarom u Petrijevim zdjelicama nacijepljeno 100 µL kulture. Na čvrste podloge inokulirane test mikroorganizmima stavljeni su sterilni diskovi te je na njih dodano 20 µL



ekstrakta kvasca *Rhodotorula sp.* MG2 koncentracija 0,1 g/L, 1 g/L i 30 g/L i otopine egzopolisaharida čije su koncentracije 0,1 g/L, 1 g/L i 30 g/L. Kao pozitivna kontrola korišteni su antibiotici ampicilin (100 mg/L) i nistatin (50 mg/L), a kao negativna kontrola korišten je 100 % - tni metanol. Ploče s diskovima inkubirane su pri temperaturi od 30 °C u vremenu od 24 sata. Nakon inkubacije izmjerene su zone inhibicije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj strasa na sastav stanice kvasca kvasca *Rhodotorula sp.* MG2 i sintezu karotenoida i lipida u kvascu *Rhodotorula sp.* MG2. Proveden je šaržni uzgoj u tikvicama s podlogama koje sadrže različite koncentracije natrijeva klorida koji ima ulogu stresora. Cilj dodatka natrijeva klorida je povećanje osmotskog tlaka izvan stanice što izaziva promjene sastava stanice te usmjeravanje metabolizma kvasca prema nakupljanju specifičnih proizvoda, to jest, lipida i karotenoida.

Kvasac *Rhodotorula* svrstan je u skupinu oleaginoznih kvasaca koji koriste različite izvore ugljika za proizvodnju karotenoida i lipida koji se dalje koriste u raznim područjima kao što su farmaceutska, prehrambena i kozmetička industrija. Njihova prednost je što lipidi koje proizvode mogu doseći i do 70 % suhe tvari stanice.

Stanice kvasca izložene povećanom osmotskom tlaku izazvanog dodatkom natrijeva klorida pokušavaju se zaštititi od osmotskog stresa te zbog toga formiraju sloj lipidne emulzije. Korištenjem većih koncentracija soli dolazi do nakupljanja veće količine lipida (Chaturverdi, 2021).

Karotenoidi su široko rasprostranjeni pigmenti koji se sve više koriste zbog svojih bioaktivnih svojstava. Primjenjuju se u medicini za antikancerogene, protuupalne i antibakterijske terapije (Jaswir, 2011). Zbog sve veće potražnje cilj je doseći što veći prinos karotenoida biotehnološkom proizvodnjom kao alternativa sintetskoj proizvodnji karotenoida.

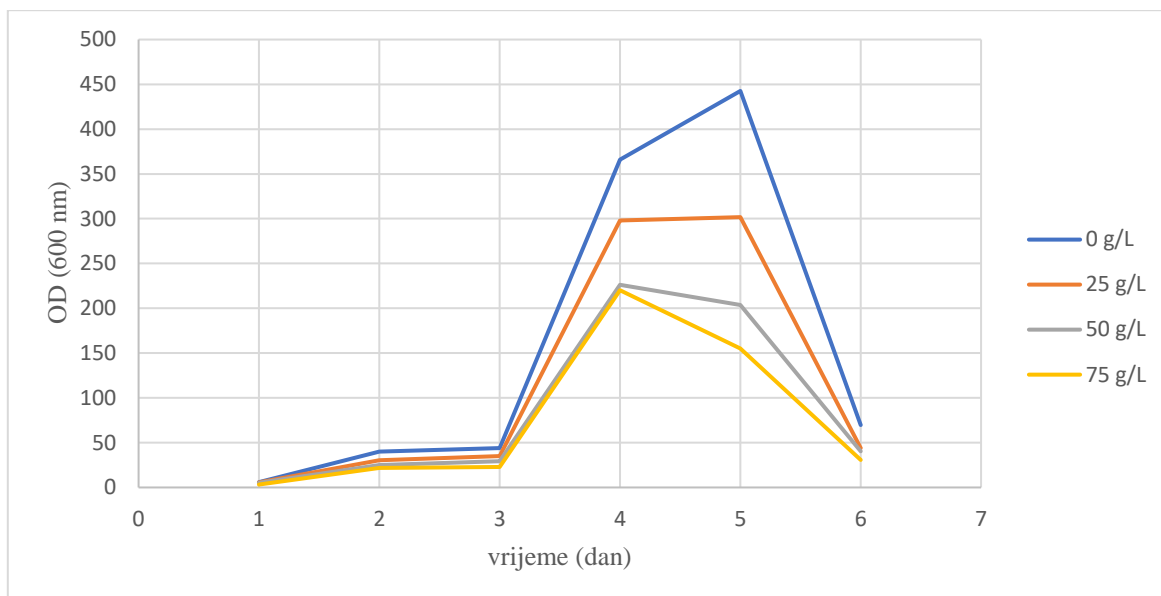
Proveden je uzgoj kvasca *Rhodotorula* u tekućoj podlozi u tikvicama koje su sadržavale različite koncentracije natrijeva klorida. Kao izvor ugljika u podlozi korištena je glukoza, a kao izvori dušika korišteni su kvaščev ekstrakt i pepton. U tikvicama su bile prisutne četiri različite koncentracije natrijeva klorida koji je imao ulogu stresora za nakupljanje što veće količine lipida i karotenoida prilikom uzgoja. Prva serija tikvica nije sadržavala natrijev klorid i to je bila kontrolna skupina. U ostale tri serije tikvica koncentracije natrijeva klorida bile su 25 g/L, 50 g/L i 75 g/L.

Osim što je praćena količina proizvedenih lipida i karotenoida, tijekom ovog istraživanja određen je i sastav stanice kvasca. Određeni su udjeli proteina, ugljikohidrata i pepela u biomasi kvasca.

## 4.1. ŠARŽNI UZGOJ KVASCA U TIKVICAMA

### 4.1.1. Utjecaj koncentracije natrijeva klorida na rast kvasca

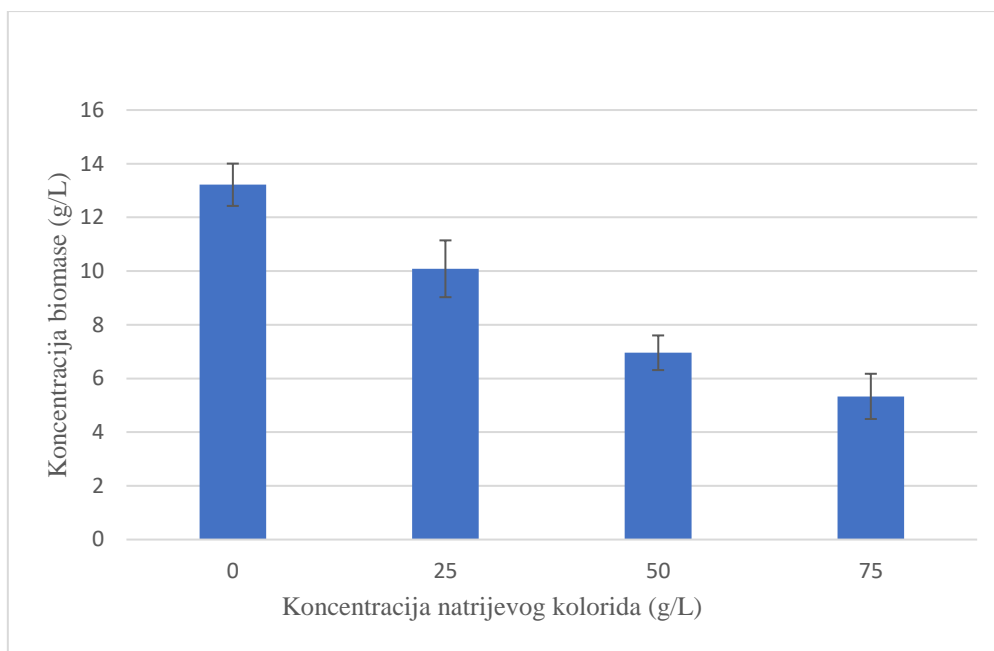
Uzgoj kvasca proveden je pri optimalnoj temperaturi i pH. Temperatura za vrijeme uzgoja bila je 28 °C, a pH je iznosio 5,5 - 6. Uzgoj kvasca u tikvicama trajao je šest dana te je svaki dan mjerena optička gustoća kako bi se pratila uspješnost uzgoja te utjecaj različitih koncentracija natrijeva klorida na optičku gustoću. Valna duljina pri kojoj je mjerena optička gustoća iznosila je 600 nm.



**Slika 7.** Promjena optičke gustoće pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

Izlaganje stanica kvasca povećanom osmotskom tlaku dovodi do brzog istjecanja vode iz stanice u hranjivu podlogu, to jest, dolazi do dehidracije stanice. Dehidracija je brz proces posredovan isključivo istjecanjem vode kroz lipidni dvosloj. Dehidracija dovodi do zaustavljanja rasta stanica. Pod tim uvjetima, stanična prilagodba predstavlja glavnu obranu koja uključuje nakupljanje otopljenih tvari kako bi se osmotski tlak unutar stanice izjednačio s vanjskim (Logothetis i sur., 2007). Optička gustoća mjerena za kvasac *Rhodotorula* sp. bila je najveća u kontrolnim tikvicama koje nisu sadržavale natrijev klorid. U hranjivim podlogama bez natrijeva klorida kvasac je imao optimalne uvjete za rast bez prisutnosti stresora pa je samim time njegov rast bio brži. S povećanjem koncentracije natrijeva klorida u hranjivoj podlozi optička gustoća se smanjivala (slika 7). U hranjivoj podlozi bez natrijeva klorida kvasac *Rhodotorula* sp. je najbrže rastao. Dodatkom natrijevog klorida u hranjivu podlogu rast kvasca se smanjuje proporcionalno koncentraciji soli. Karakterističan oblik krivulje rasta za

jednostanične mikroorganizme zabilježen je kod svih istraženih koncentracija natrijevog klorida. Nakon trećeg dana uzgoja mikroorganizam ulazi u eksponencijalnu fazu rasta koja traje 24 sata neovisno o koncentraciji soli. Kroz iduća 24 sata rast je zabilježen samo u hranjivoj podlozi bez dodatka natrijeva klorida. Ovisno o koncentraciji natrijevog klorida mikroorganizam je ušao u stacionarnu (25 g/L) ili fazu odumiranja (> 25 g/L). Nakon petog dana uzgoja pad optičke gustoće zabilježen je u svim uvjetima uključujući i podlogu bez dodane soli. Na kraju uzgoja UPLC-om je mjerena koncentracija glukoze u podlozi čija je vrijednost iznosila 0 g/L, to jest, glukoza iz podloge je potrošena do kraja uzgoja.



**Slika 8.** Utjecaj koncentracije natrijeva klorida na koncentraciju biomase kvasca

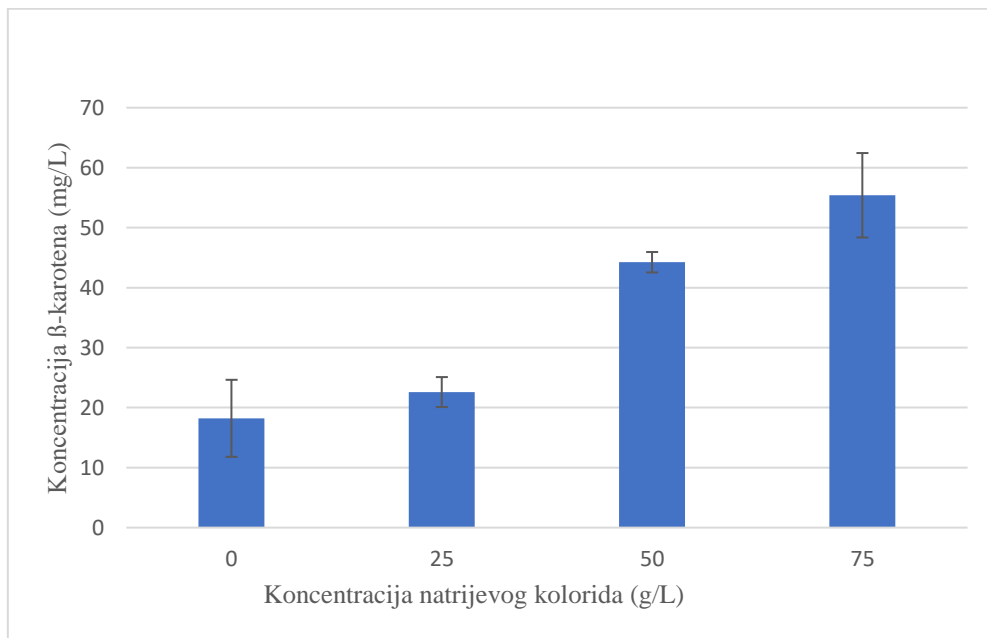
Stres uzrokovan natrijevim kloridom utječe na rast stanica kvasca i nastajanje metabolita jer su stanice uzgajane u hranjivoj podlozi s visokim koncentracijama natrijeva klorida izložene osmotskom stresu zbog smanjenja aktiviteta vode. Niski aktivitet vode ograničava rast stanica kvasca te smanjuje količinu dobivene biomase (Golnaz i sur., 2011). Na slici 8 prikazan je utjecaj različitih koncentracija natrijeva klorida na koncentraciju suhe tvari biomase kvasca *Rhodotorula*. Najveća koncentracija biomase od 13,22 g/L dobivena je prilikom rasta kvasca u hranjivoj podlozi bez dodatka natrijeva klorida. Povećanjem koncentracije natrijeva klorida dobivena koncentracija biomase sve se više smanjivala sukladno optičkoj gustoći (slika 8). Pri najvećoj koncentraciji natrijeva klorida od 75 g/L koncentracija biomase bila je manja za više od 40 % u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje prinosa biomase u prisustvu natrijevog klorida zapazili su Olz i suradnici (1993) u istraživanju učinka osmotskog stresa na rast kvasca

*Saccharomyces cerevisiae*. Kontrolna skupina sadržavala je hranjivu podlogu bez dodatka natrijevog klorida, dok je druga hranjiva podloga sadržavala 0,9 M natrijev klorid. Uočena je niža koncentracija biomase u hranjivoj podlozi s dodatkom natrijeva klorida, a u odnosu na kontrolnu skupinu koncentracija suhe tvari biomase bila je za 55 % niža.

## 4.2. PROIZVODNJA KAROTENOIDA

### 4.2.1. Ekstrakcija karotenoida iz biomase kvasca

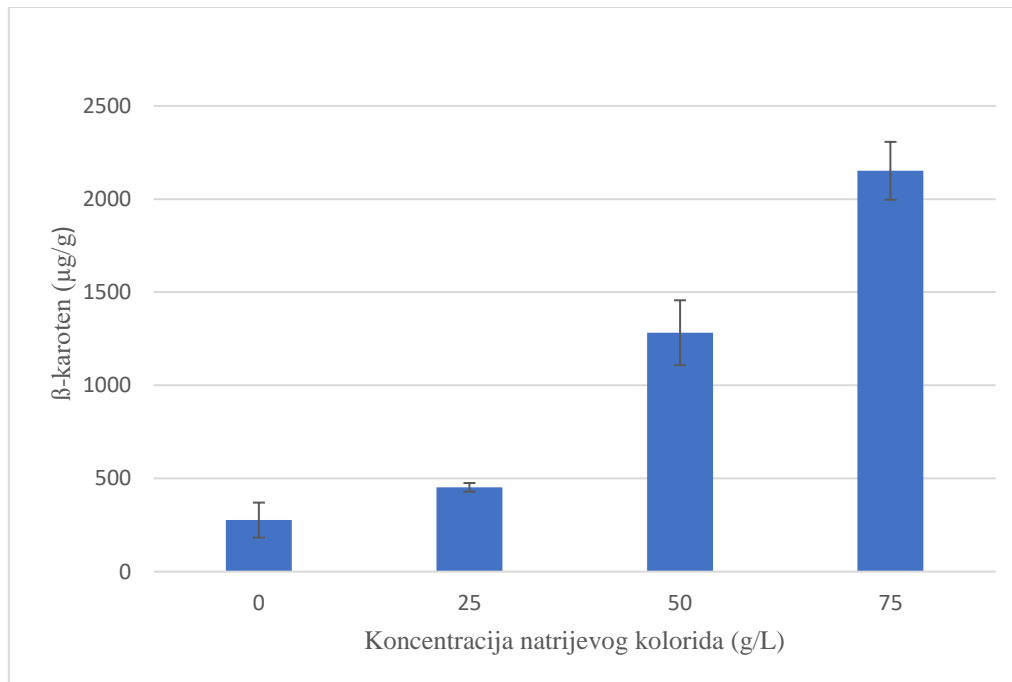
Postupak određivanja udjela karotenoida u biomasi kvasca proveden je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije staničnog ekstrakta. Slika 9 prikazuje koncentracije ukupnih karotenoida u ekstraktima biomase kvasca uzgojenoj uz različite koncentracije natrijeva klorida.



**Slika 9.** Koncentracija ukupnih karotena pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

Koncentracija karotenoida rasla je s povećanjem koncentracije natrijeva klorida. Kontrolna skupina bez dodatka natrijeva klorida sadržavala je najmanju koncentraciju karotenoida od 18,22 mg/L. Porastom koncentracije natrijeva klorida rasla je koncentracija karotenoida do maksimalnih 50,40 mg/L izmjerenih u ekstraktu stanica uzgojenih u hranjivoj podlozi sa 75 g/L natrijeva klorida. Na slici 10 prikazana je koncentracija ukupnih karotenoida u ekstraktu biomase. Kako se koncentracije β-karotena povećavaju pri većim koncentracijama soli tako i zastupljenost β-karotena u biomasi raste kako raste koncentracija soli. Najmanja zastupljenost

$\beta$ -karotena u biomasi zabilježena je u uzorcima bez natrijeva klorida i iznosi 266,76  $\mu\text{g/g}$ . Pri najvećoj koncentraciji natrijeva klorida od 75 g/L dostignuta je zastupljenost  $\beta$ -karotena u biomasi od 2151,69  $\mu\text{g/g}$ .



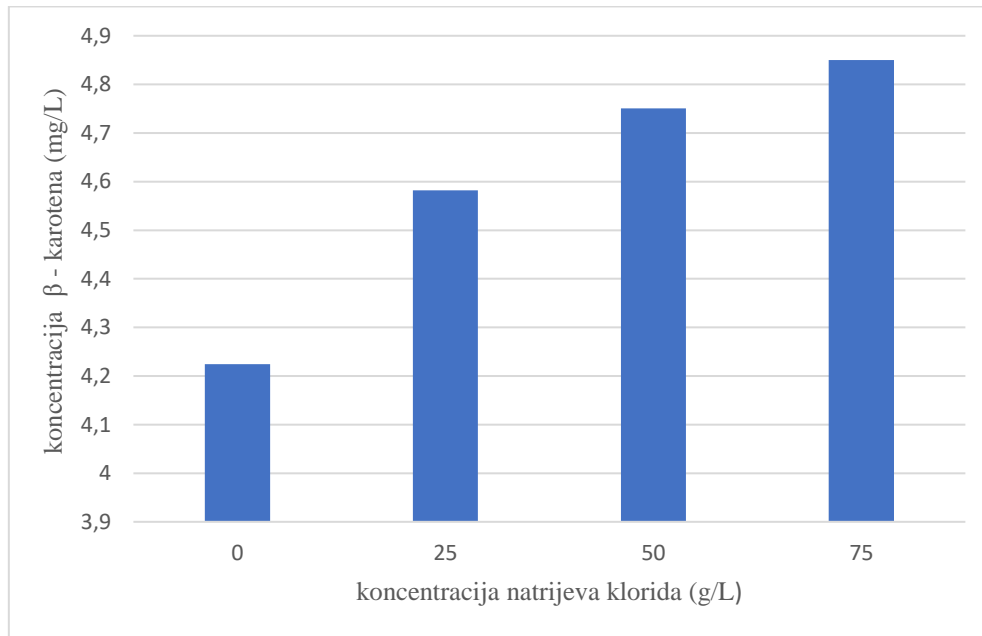
**Slika 10.** Zastupljenost  $\beta$ -karotena u biomasi pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

Stanice mikroorganizama razvile su mehanizme kako bi se uspješno suočile sa stresnim uvjetima iz okoliša. Pri utjecaju stresora mikroorganizmi prekomjerno proizvode određene metabolite kao što su karotenoidi, lipidi i neki ugljikohidrati (Marova i sur., 2004).

Marova i suradnici (2010) proveli su istraživanje s kvascem *Rhodotorula glutinis*. U istraživanju je kao stresor korišteno 10 % (w/v) natrijev klorid čiji je utjecaj praćen u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije sadržavala sol. Praćena je zastupljenost  $\beta$ -karotena u biomasi kad je natrijev klorid prisutan. Rezultati istraživanja također su pokazali porast koncentracije  $\beta$ -karotena dodatkom natrijeva klorida. U kontrolnoj skupini zastupljenost  $\beta$ -karotena u biomasi iznosi 880,35  $\mu\text{g/g}$  te se dodatkom 10 % (w/v) natrijeva klorida povećava na 1749,29  $\mu\text{g/g}$ . Razlika u zastupljenosti  $\beta$ -karotena u biomasi kvasca u istraživanju Marova i suradnika u odnosu na ovo istraživanje nastala je zbog korištenja različitih otapala za ekstrakciju.

U drugom postupku dobivanja karotenoida iz biomase kvasca za ekstrakciju su korišteni petrol eter i aceton. Nakon ekstrakcije karotenoidi su prisutni u petrol eteru koji se nalazio u gorenjem

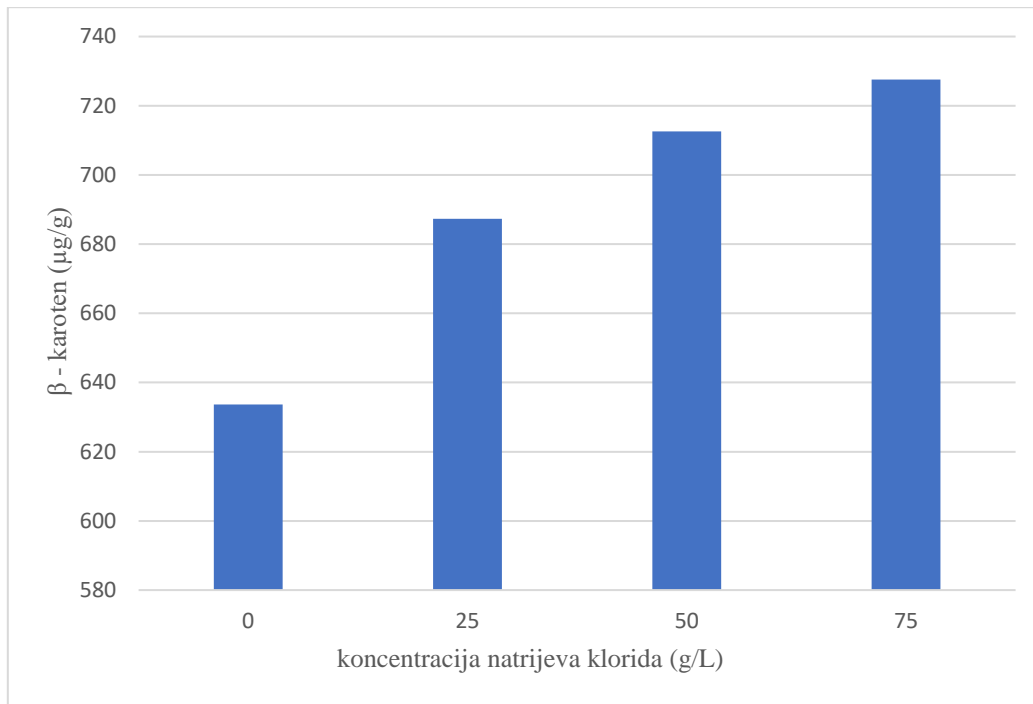
sloju te je mjerena apsorbancija pri 450 nm kako bi se odredila koncentracija  $\beta$ -karotena u uzorcima s različitim koncentracijama natrijeva klorida. Na slici 11 vidljivo je da porastom koncentracije natrijeva klorida raste koncentracija  $\beta$ -karotena pa je u uzorku s najvećom koncentracijom natrijeva klorida od 75 g/L najveća koncentracija  $\beta$ -karotena koja iznosi 4,85 mg/L.



**Slika 11.** Koncentracija  $\beta$  – karotena pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

U istraživanju Da Silve i suradnika (2020) korištena su ista otapala za ekstrakciju kao i u ovom istraživanju. U biomasu kvasca dodano je 2 mL dimetilsulfoksida i 0,5 g staklenih kuglica. Nakon vorteksiranja i inkubacije dodano je 2 mL acetona i 2 mL petroletera. U gornjem sloju petroletera detektirani su karotenoidi čija se apsorbancija mjerila pri 450 nm. U njihovom istraživanju dobivena koncentracija  $\beta$ -karotena bez dodatka natrijeva klorida iznosi 1,13 mg/L, to jest, 92,44  $\mu$ g/g. Skoro četiri puta manja koncentracija  $\beta$ -karotena u istraživanju Da Silve i suradnika moguća je zbog korištenja različitog supstrata. U njihovom istraživanju korišten supstrat je vlaknasti ostatak nakon ekstrakcije vlakna iz biljke sisal.

Na slici 12 prikazana je zastupljenost  $\beta$ -karotena u biomasi pri različitim koncentracijama natrijeva klorida. U kontrolnoj skupini koja nije sadržavala natrijev klorid dobiveno je 637  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotena po gramu biomase dok je pri najvećoj koncentraciji od 75 g/L natrijeva klorida dobiveno 723  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotena po gramu biomase.



**Slika 12.** Zastupljenost  $\beta$ -karotena u biomasi pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

Kanzy i suradnici (2015) također su proveli istraživanje o utjecaju stresa uzrokovanog natrijevim kloridom na proizvodnju karotenoida. U eksperimentu su koristili dva mikroorganizma, kvasce *Rhodotorula glutinis* i *Rhodotorula mucilagenosa*. Rezultati njihovog istraživanja također pokazuju porast koncentracije karotenoida prilikom porasta koncentracije natrijeva klorida. Najveća koncentracija karotenoida od 6,54 mg/L dobivena je dodatkom 3 % (w/v) natrijeva klorida korištenjem kvasca *Rhodotorula glutinis*. Najveća koncentracija karotenoida od 5,044 mg/L dobivena je dodatkom 6 % (w/v) natrijeva klorida korištenjem kvasca *Rhodotorula mucilagenosa*. Karotenoidi djeluju kao antioksidansi koji štite membranu i vežu slobodne radikale te je zbog toga sinteza karotenoida poboljšana pri stresnim uvjetima (dodatak natrijeva klorida) zbog zaštite stanice.

U istraživanju Kota i suradnika (2019) u kvascu *Rhodotorula gracilis* sintetizirano je 360,4  $\mu\text{g}$  karotenoida po gramu biomase dodatkom 50 g/L natrijeva klorida. Manja zastupljenost karotenoida u biomasi moguća je zbog korištenja industrijskih ostataka kao hranjive podloge



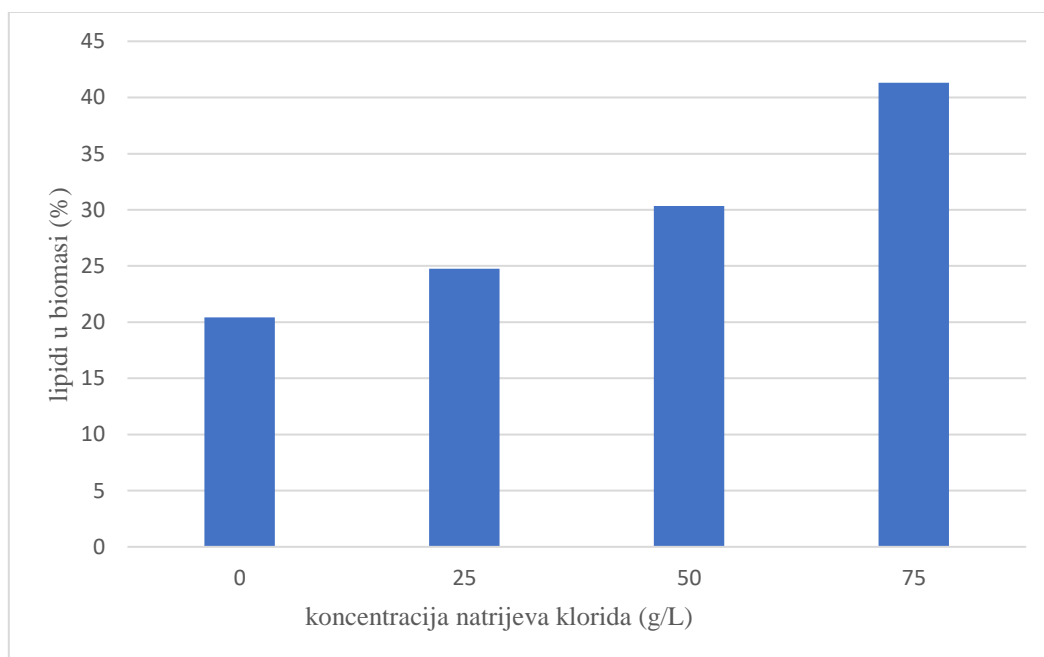
(ostaci glicerola u proizvodnji biodizela) te korištenja drugačijih otapala za ekstrakciju (metanol i kloroform).

Razlike u koncentraciji karotenoida u prvom i drugom postupku moguće su zbog korištenja različitih otapala za ekstrakciju. U prvom postupku korišten je samo aceton, a u drugom postupku korišteni su aceton, petrol eter i 20 % (w/v) otopina natrijeva klorida. Također, u prvom postupku proizvodnje karotenoida biomasa je teže odvajana od ekstrakta pa su zbog toga vrijednosti koncentracije karotenoida više.

### 4.3. SASTAV STANICE KVASCA

#### 4.3.1. Lipidi u biomasi kvasca

Udio lipida u biomasi je određen ekstrakcijom lipida iz biomase. Ekstrakcija je provedena s kloroformom i metanolom te su lipidi zadržani u donjem dijelu u kojem se nalazio kloroform. Na slici 13 je prikaz udjela lipida u biomasi u ovisnosti s koncentracijom natrijeva klorida.



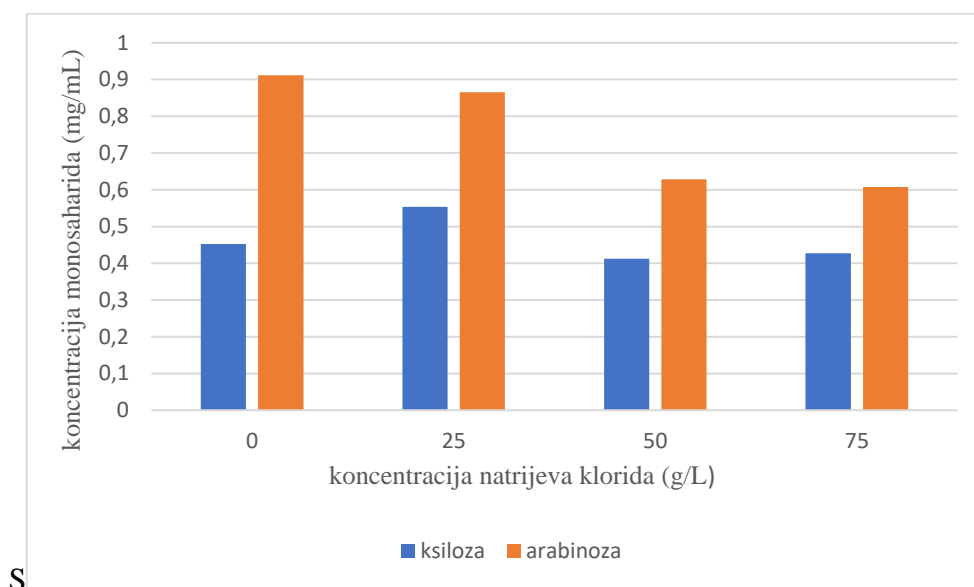
**Slika 13.** Udio lipida u biomasi kvasca pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

Oleaginozni kvasci mogu proizvesti i akumulirati više od 20 % mase suhe tvari biomase u obliku lipida (Ratledge, 2004). Udio lipida u biomasi pri najvećoj koncentraciji natrijeva klorida od 75 g/L iznosi 41,3 %. Smanjenjem koncentracije natrijeva klorida smanjuje se i udio proizvedenih lipida u biomasi pa je tako pri koncentraciji natrijeva klorida od 50 g/L udio lipida 30,35 %, a pri koncentraciji od 25 g/L udio lipida iznosi 24,76 %. Utjecaj povećanog osmotskog tlaka dodatno potiče proizvodnju lipida, ali obzirom da je *Rhodotorula* oleaginozni kvasac udio

proizvedenih lipida bez dodatka soli također prelazi 20 %. U istraživanju Tchakoutea i suradnika (2016) praćena je proizvodnja lipida s oleaginoznim kvascem *Rhodotorula toruloides* te utjecaj natrijeva klorida na njihovu sintezu. Koncentracija natrijeva klorida iznosila je od 0 do 6 % (w/v). U kontrolnoj podlozi bez dodatka natrijeva klorida udio lipida iznosio je 55,1 %. Dodatkom 4 % (w/v) natrijeva klorida stimulirana je akumulacija lipida te je njihov udio porastao na 71,3 %.

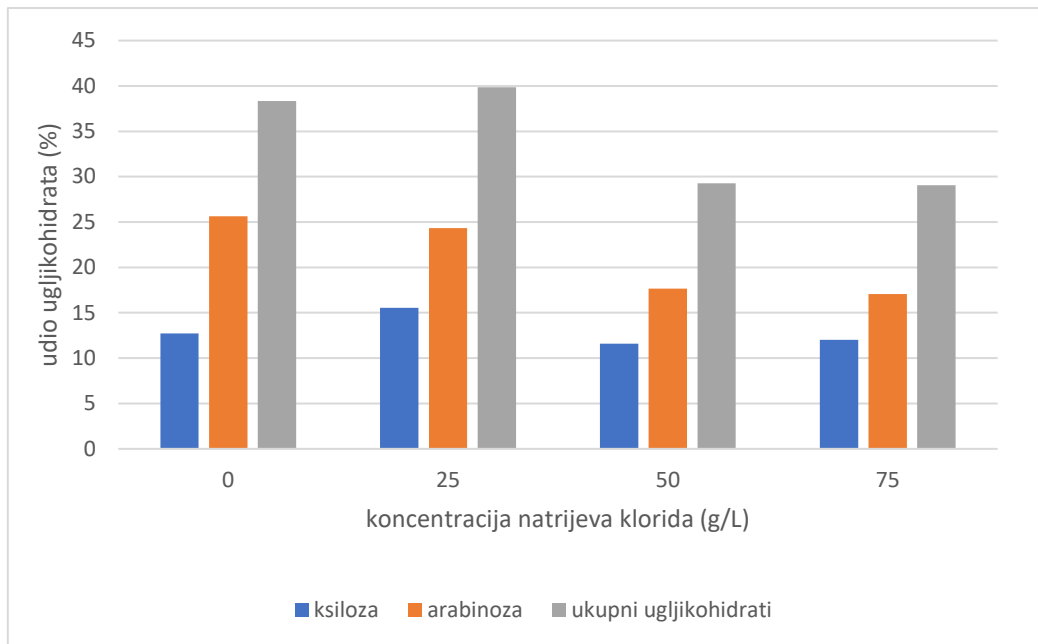
#### 4.3.2. Sastav egzopolisaharida

Sastav egzopolisaharida određen je UPLC metodom hidrolizom nepročišćenog taloga egzopolisaharida sa sumpornom kiselinom. Hidrolizat je sadržavao arabinozu i ksilozu te su identificirani i drugi monosaharidi čije su koncentracije bile ispod granice detekcije korištene analitičke metode. Na slici 14 prikazane su koncentracije ksiloze i arabinoze u hidrolizatu egzopolisaharida izdvojenih iz prevrele hranjive podloge s različitim koncentracijama natrijeva klorida.



**Slika 14.** Koncentracija monosaharida u kiselinskom hidrolizatu izdvojenih egzopolisaharida sintetiziranih u hranjivoj podlozi s različitim koncentracijama natrijeva klorida

Arabinoza je zastupljenija od ksiloze u svim hidrolizatima. Koncentracija arabinoze pada s povećanjem osmotskog tlaka, dok se koncentracija ksiloze nije značajnije mijenjala (slika 15).



**Slika 15.** Udio ugljikohidrata u istaloženim egzopolisaharidima

Pavlova i Grigorova (1999) istraživale su proizvodnju egzopolisaharida s kvascem *Rhodotorula acheniorum* MC. U sastavu egzopolisaharida ovog kvasca zastupljeni su monosaharidi manoza (92,8 %) i glukoza (7,2 %).

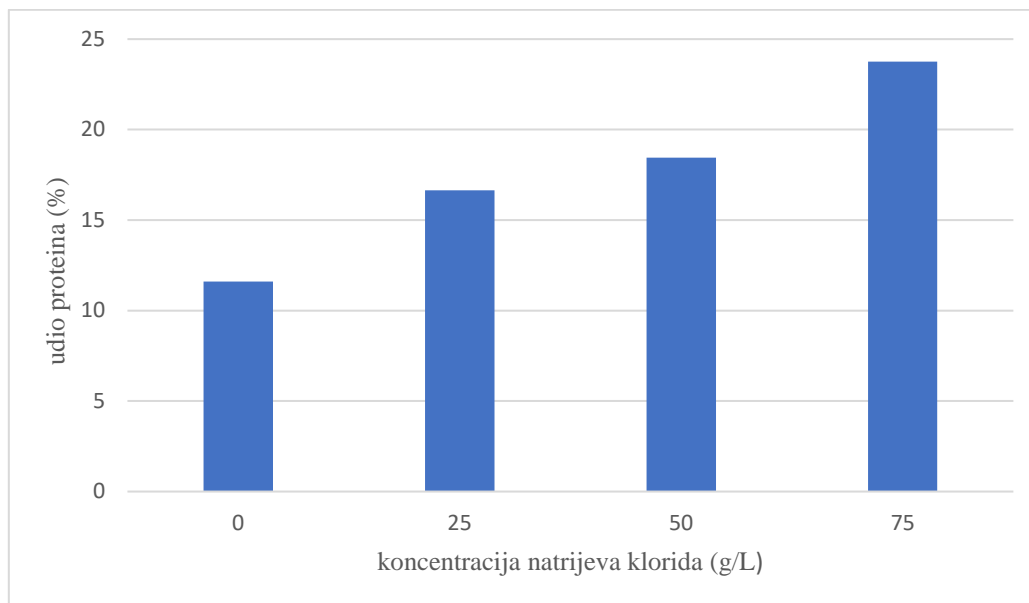
U istraživanju Grigorove, Pavlove i Pancheva (1999) proučavana je sinteza egzopolisaharida pomoću kvasca *Rhodotorula acheniorum* MC. Najveće vrijednosti egzopolisaharida postignute su u hranjivoj podlozi u koju je dodano 5 % saharoze. Određivan je sastav monosaharida u dobivenim egzopolisaharidima te je utvrđeno da je najzastupljeniji monosaharid manoza (69,13 %).

Sastav egzopolisaharida ovisi o soju, uvjetima uzgoja i fazi rasta mikroorganizma.

#### 4.3.3. Proteini u biomasi kvasca

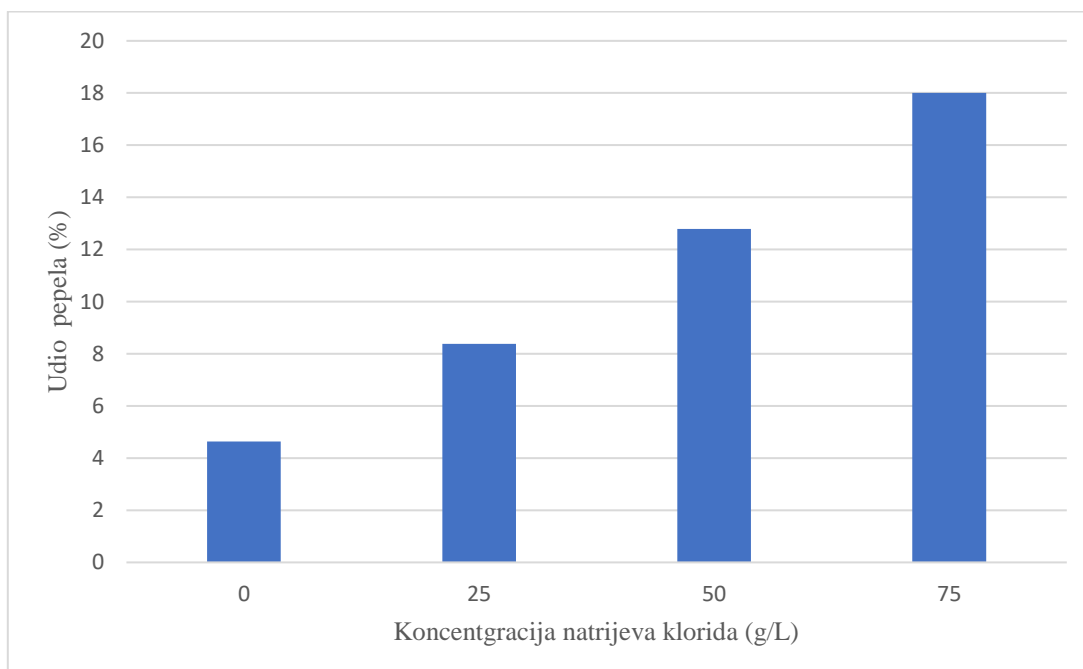
Koncentracija proteina u biomasi kvasca (slika 16) određena je metodom po Lowryju. Nakon pripreme uzoraka izmjerena je apsorbancija iz koje je izračunata koncentracija proteina u biomasi kvasca. Iz dobivenih koncentracija proteina određen je udio proteina u biomasi kvasca. Najveći udio proteina prisutan je pri koncentraciji natrijeva klorida od 75 g/L i iznosi 23,76 %.

Najmanji udio proteina od 11,61 % prisutan je u kontrolnom uzorku koji ne sadrži natrijev klorid.



**Slika 16.** Udio proteina pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

#### 4.3.4. Pepeo u biomasi kvasca



**Slika 17.** Udio pepela u ovisnosti pri različitim koncentracijama natrijeva klorida

U istraživanju je određen i udio pepela, koji je anorganski ostatak nakon izgaranja biomase. S obzirom da je natrijev klorid anorganska sol, povećanjem koncentracije natrijeva klorida povećavao se udio pepela u biomasi (slika 17). Udio pepela od 4,64 % prisutan je u uzorku bez dodatka natrijeva klorida. Pri koncentraciji od 25 g/L natrijeva klorida udio pepela iznosi 8,39 %, porastom koncentracije natrijeva klorida na 50 g/L udio pepela raste na 12,78 g/L. Najveći udio pepela od 18,00 g/L dobiven je pri koncentraciji natrijeva klorida od 75 g/L.

#### 4.4. PROIZVODNJA SOFOROLIPIDA

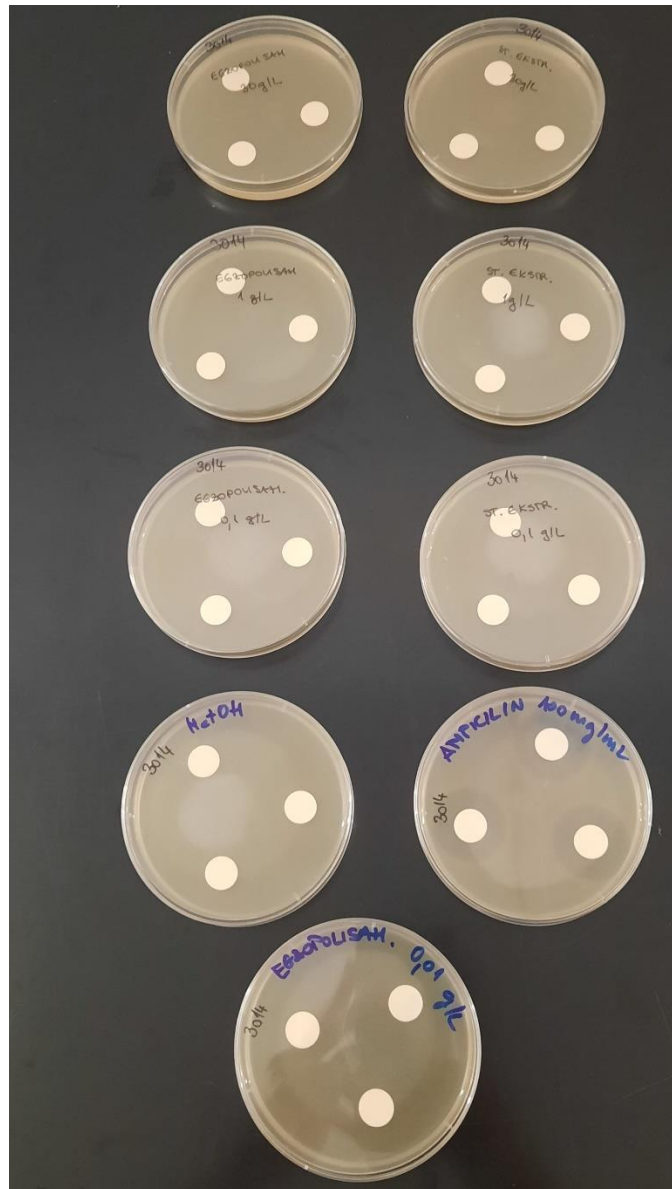
Soforolipidi su glikolipidni biosurfaktanti čiji je hidrofilni dio uvijek disaharid soforoza, a lipofilni dio je hidroksilirana dugolančana masna kiselina (Kurtzman i suradnici, 2010). Za razliku od soforolipida koje proizvode drugi mikroorganizmi, oni koji su proizvedeni kvascem *Rhodotorula* u svojoj strukturi imaju C22 masnu kiselinu (umjesto uobičajenih C16 i C18 masnih kiselina). Također, hidroksilna skupina vezana je na C13 ugljik iako je uobičajeno vezana na terminalni ugljik. Soforolipidi proizvedeni kvascem *Rhodotorula* postoje samo u kiselom (otvorenom) obliku, a inače dolaze i u laktonskom obliku (Zhang i sur., 2011).



**Slika 18.** Smjesa supernatanta kulture i suncokretovog ulja (*vlastita slika*)

Dodatkom biljnog suncokretovog ulja u supernatant kulture došlo je do stvaranja trenutne emulzije, ali su se slojevi odmah potom razdijelili. Visine slojeva bile su jednake i nakon jednog sata i 24 sata (slika 18). Soforolipidi su emulgatori te u njihovoj prisutnosti emulzija ostaje postojana. U istraživanju Zhanga i suradnika (2011) s kvascem *Rhodotorula bogoriensis* soforolipidi su proizvedeni u koncentraciji od 0,33 g/L. Dodatkom ulja u hranjivu podlogu dobiveni su i veći prinosi soforolipida. Kvasac *Rhodotorula* korišten u ovom istraživanju nema sposobnost proizvodnje soforolipida, ali neke vrste tog kvasca proizvode soforolipide.

#### 4.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST



**Slika 19.** Antimikrobna aktivnost kvasca *Rhodotorula* (vlastita slika)

U istraživanju je praćena antimikrobna aktivnost kvasca *Rhodotorula*. Test mikroorganizmi korišteni u istraživanju su: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Fusarium verticillioides*. Kao negativna kontrola korišten je 100 % metanol, a kao pozitivna kontrola korišteni su antibiotici nistatin u koncentraciji od 50 g/L i ampicilin u koncentraciji od 100 g/L. U Petrijevim zdjelicama u kojima su u hranjive podloge nacijepljeni test mikroorganizmi oko diskova sa staničnim ekstraktom i egzopolisaharidima nisu uočene zone inhibicije što upućuje na

nepostojanje antimikrobne aktivnosti kvasca *Rhodotorula* (slika 19). Oko diskova na kojima su bili ampicilin i nistatin uočene su i izmjerene zone inhibicije (tablica 8).

**Tablica 8.** Osjetljivost odabranih sojeva bakterija, kvasca i plijesni na djelovanje egzopolisaharida i staničnog ekstrakta kvasca *Rhodotorula sp.* MG2

<b>mikroorganizam</b>	<b>dodana tvar</b>	<b>promjer zona inhibicije – aritmetička sredina (cm)</b>	<b>standardna devijacija</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ampicilin	3,3	0,1
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0
<i>Escherichia coli</i>	ampicilin	2,9	0
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	ampicilin	3,133	0,115
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0
<i>Candida</i>	nistatin	2,3	0,1
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	ampicilin	3,167	0,153
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ampicilin	1,667	0,153
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0

<i>Fusarium verticillioides</i>	nistatin	2,2	0,1
	metanol	0	0
	egzopolisaharidi	0	0
	stanični ekstrakt	0	0

Yolmeha i suradnici (2016) ispitivali su antimikrobnu aktivnost kvasca *Rhodotorula glutinis*. Kao test mikroorganizmi također su korišteni *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Rezultati njihovog istraživanja razlikuju se od rezultata dobivenih ovim istraživanjem jer su uočene zone inhibicije te je dokazana antimikrobna aktivnost *Rhodotorule glutinis*. Razlike u rezultatima između ova dva istraživanja moguće su zbog korištenja različitih metoda ekstrakcije. U ovom istraživanju kao otapalo je korišten metanol. U istraživanju Yolmeha i suradnika kao otapala su korišteni aceton i petrol eter.



## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Natrijev klorid potiče nakupljanje karotenoida u kvascu *Rhodotorula sp. MG2*. Porastom koncentracije natrijeva klorida od 25 do 75 g/L raste udjel karotenoida u biomasi od 0,045 % do 0,22 %
2. Tijekom uzgoja kvasca *Rhodotorula sp. MG2* bez dodatka natrijeva klorida udjel lipida iznosio je 20,43 %, udjel proteina 11,61 %, a udjel pepela 4,64 %.
3. U kiselinskom hidrolizatu izdvojenih egzopolisaharida najzastupljeniji ugljikohidrati su arabinoza i ksiloza, a arabinoza je prisutna u većoj koncentraciji od ksiloze.
4. Udjeli proteina i lipida rastu povećanjem koncentracije natrijeva klorida i najveći su pri koncentraciji od 75 g/L te iznose: 41,3 % i 23,75 %. Udjeli ugljikohidrata ne ovise o povećanoj koncentraciji natrijeva klorida.
5. Kvasac *Rhodotorula sp. MG2* nema sposobnost sinteze soforolipida.
6. Metanolski ekstrakti suhe tvari biomase kvasca *Rhodotorula sp. MG2* ne inhibiraju rast bakterija *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, kvasca *Candida* i plijesni *Fusarium verticillioides*.

## 6. LITERATURA

Adrio JL (2017). Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol Bioeng*, **114(9)**, 1915-1920. <https://doi.org/10.1002/bit.26337>

Arain MA, Mei Z, Hassan F, Saeed M, Alagawany M, Shar A, Rajput I (2018). Lycopene: A natural antioxidant for prevention of heat-induced oxidative stress in poultry. *World's Poult Sci J*, **74(1)**, 89–100. <https://doi.org/10.1017/S004393391>

Bhosale P i Gadre R (2002). Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced beta-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Lett. Appl. Microbiol*, **34**, 349-353. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01095.x>

Burri BJ (2015). Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *J Sci Food Agric*, **95(9)**, 1786–1794. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6942>

Cardoso LAC, Kanno KYF, Karp SG (2017). Microbial production of carotenoids: A review, *African J. Biotechnol*. **16**, 139–146. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15763>

Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR (2015) Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci Technol* **45**, 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>

Chaturvedi S, Sadaf A, Bhattacharya A, Rout PK, Nain, L, i Khare SK (2021). Environment-friendly Synergistic Abiotic Stress for Enhancing the Yield of Lipids from Oleaginous Yeasts. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2000376. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000376>

Cooper DG i Goldenberg BG (1987). Surface – active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* **53 (2)**, 224 – 229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>

De Silva J, Honorato da Silva FL, Nobrega de Melo DJ, Sntos FA i Lucena de Medeiros L (2020). Effect of supplementation, temperature an pH on carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Bioanal Agric Biotechnol* **30**, 101 – 847. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101847>

Dworecka-Kaszak B i Kizerwetter-Swida M. (2011). Pseudomycelium forming *Rhodotorula* – unusual picture of biofilm. *Mikologia Lekarska* **18(2)**, 74–78.

Elfeky N, Elmahmoudy M i Bao, Y (2020). Manipulation of Culture Conditions: Tool for Correlating/Improving Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis*. *Processes* **8(2)**, 140-169. <https://doi.org/10.3390/pr8020140>

- Golnaz S, Mohammad HS, Sohrab I, Mahmoud S, i Shahram A (2011). A laboratory assessment of the potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Beauvarin) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Afr J Microbiol Res* **5(10)**, 1192–1196. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.011>
- Harrison FC, Abarenkov K (2023). UNITE - Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification. <https://doi.org/10.15468/mkpcy3>
- Hernández-Almanza A, Cesar Montanez J, Aguilar-González MA, Martínez-Ávila C, Rodríguez-Herrera R i Aguilar CN (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci*, **5**, 64 – 72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>
- Irwandi J (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J Med Plants Res* **5(33)**, 7119 - 7131. <https://doi.org/10.5897/JMPRX11.011>
- Kaczor A i Pacia MZ (2016). Impact of Stress Factors on Carotenoid Composition, Structures, and Bioavailability in Microbial Sources. *Carotenoids*, 241–260. <https://doi.org/10.1002/9781118622223.ch13>
- Kanzy HM i sur. (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *Int J Curr Microbiol App Sci* **4**, 456-469.
- Kot AM, Błażej S, Kurcz A, Gientka I i Kieliszek M (2016). *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Appl Microbiol Biotechnol* **100(14)**, 6103–6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>
- Kot AM, Błażej S, Kieliszek M. (2019) Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World J Microbiol Biotechnol* **35**, 157 <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2732-8>
- Kurtzman CP, Price NPJ, Ray KJ, Kuo TM (2010) Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiol Lett* **311**, 140–146. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02082.x>

- Li M, Liu GL, Chi Z i Chi ZM (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marinederived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass Bioenerg* **34**, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.10.005>
- Logothetis S, Walker G i Nerantzis ET (2007). Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 271-284. <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-4906/2007/0352-49060713271L.pdf>
- Liu Z, Feist AM, Dragone G, Mussatto SI (2020) Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts, *J Clean Prod* **249**, 119 - 308. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119308>
- Louhasakul Y, Cheirsilp B, Maneerat S, Prasertsan P (2018). Direct transesterification of oleaginous yeast lipids into biodiesel: Development of vigorously stirred tank reactor and process optimization, *Biochem Eng J* **137**, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.009>
- Marova I, Breierová E, Kočí R, Friedl Z, Slovak B, Pokorna, J (2004). Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Ann Microbiol* **54**, 73-85.
- Marova I, Carnecka M, Halienova A, Breierova E i Koci R. (2010). Production of Carotenoid-/Ergosterol-Supplemented Biomass by Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Grown Under External Stress. *Food Technol Biotechnol* **48** (1), 56-61. <https://hrcak.srce.hr/48436>
- Meng, X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energ* **34**, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>
- Miziorko HM (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **505**, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>
- Nabi F, Arain, MA, Rajput, N, Alagawany M, Soomro J, Umer M, Liu J (2020). Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry. A review. *J Anim Physiol Anim Nutr* **104**, 1809 – 1818. <https://doi.org/10.1111/jpn.13375>
- Nasrabadi MRN i Razavi SH (2011). Optimization of  $\beta$ -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Sci Biotechnol* **20**(2), 445–454. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0062-1>

Novoveská L, Ross ME, Stanley MS, Pradelles R, Wasiolek V, JSassi JF (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction, *Mar. Drugs* **17**, 640. <https://doi.org/10.3390/md17110640>.

Olz R, Larsson K, Adler L i Gustafsson L (1993). Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J Bacteriol* **175(8)**, 2205–2213. <https://doi.org/10.1128/jb.175.8.2205-2213.1993>.

Pacia MZ, Turnau K, Baranska M i Kaczor A (2015). Interplay between carotenoids, hemoproteins and the “life band” origin studied in live *Rhodotorula mucilaginosa* cells by means of Raman microimaging *Analyst* **140**, 1809. <https://doi.org/10.1039/C4AN01787K>

Pavlova K i Grigorova D (1999). Production and properties of exopolysaccharide by *Rhodotorula acheniorum* MC. *Food Res Int*, **32(7)**, 473–477. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00110-6)

Grigorova D, Pavlova K i Panchev I (1999) Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Appl Biochem Biotechnol* **81**, 181–191 <https://doi.org/10.1385/ABAB:81:3:181>

Poontawee R, Yongmanitchai W i Limtong S (2017). Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochem*, **53**, 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.013>

Ratledge C (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* **86**, 807–815. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>

Rodrigues E, Mariutti LRB, Chiste RC i Mercadante AZ(2012). Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity. Application to carotenoids and structure-activity relationship. *Food Chem*, **135**, 2103–2111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.074>

Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT i Bourtoom T (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem*, **46(1)**, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.009>

- Sahin K, Orhan C, Tuzcu M i Sahin N. (2013). The Effects of lycopene on the meat lycopene levels, antioxidant enzymes and Nrf2 pathway in broiler chickens. *Front Vet Sci* **9**. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.833346>
- Sala R, Certik M, Brezova V, Brlejeva M, Hanusova V i Breierova E (2012). Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26.2. *Biotechnol* <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0069-1>
- Sen S, Borah SN, Bora A (2017). Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb Cell Fact* **16**, 95 <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0711-z>
- Singh A, Ahmad S i Ahmad A (2015). Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. *RSC Advances* **5(77)**, 62358–62393. <https://doi.org/10.1039/C5RA10243J>
- Tang G. (2014). Vitamin A value of plant food provitamin A—evaluated by the stable isotope technologies. *Int J Vitam Nutr Res* **84**, 25–29. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000183>
- Tchakouteu SS, Kopsahelis N, Chatzifragkou A, Kalantzi O, Stoforos NG, Koutinas AA, Papanikolaou S (2016). *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Eng Life Sci* **17(3)**, 237–248. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201500125>
- Thelivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 255–270. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.07.004>
- Verdugo FJ, Briones E, Porte L, Amaro J i Fica A (2016). Peritonitis fúngica por *Rhodotorula mucilaginosa* en una paciente en diálisis peritoneal automatizada: Revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología*, **33(2)**, 222–225. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200012>
- Wu JL, Wang WY, Cheng YL, Du C, Qian H (2015) Neuroprotective effects of torularhodin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury and apoptosis in PC12 cells. *Pharmazie* **70**, 17–23.
- Yen HW i Yang YC (2012). The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol* **107**, 539–541. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.134>

Yellapu SK, Bharti R, Kaur LR, Kumar B, Tiwari X, Zhang RT (2018). Recent developments of downstream processing for microbial lipids and conversion to biodiesel, *Bioresour Technol* **256**, 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.129>

Yolmeh M, Hamed H, Khomeiri M (2016). Antimicrobial Activity of Pigments Extracted from *Rhodotorula glutinis* Against Some Bacteria and Fungi. *Zahedan J Res Med Sci* **18 (12)**, 49-54. <https://doi.org/10.17795/zjrms-4954>

Zhang J, Saerens KMJ, Van Bogaert INA, Soetaert W (2011). Vegetable oil enhances sophorolipid production by *Rhodotorula bogoriensis*. *Biotechnology Letters* **33(12)**, 2417–2423. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0703-8>

Zheng Y, Chi Z, Ahring BK, Chen S (2012) Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: Amonnia's effect. *Biomass bioenerg* **37**, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.022>

Zoz L, Carvalho JC, Soccol VT, Casagrande TC, Cardoso L (2015) Torularhodin and torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics—a review. *Braz Arch Biol Technol* **58**, 278–288. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400152>

### IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, SARA TOMIĆ, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

S. Tomić