# Uzgoj kvasca Scheffersomyces stipitis na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru s ciljem proizvodnje (S)-adenozil-L-metionina

**Kralj, Elizabeta**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:034586

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Elizabeta Kralj
667/BPI

# Uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru s ciljem proizvodnje *(S)*-adenozil-L-metionina

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca u Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Damira Stanzera, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dipl.ing. Stele Križanović, asistentice.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Damiru Stanzeru koji mi je omogućio izradu diplomskog rada pod svojim vodstvom.

Posebno se zahvaljujem dipl. ing. Steli Križanović na uloženom vremenu, strpljenju i savjetima kojima me vodila kroz eksperimente te na ugodnoj i prijateljskoj radnoj atmosferi u laboratoriju prilikom izrade ovog rada.

Hvala mojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj podršci i financijskoj pomoći tijekom studiranja.

I hvala Antoniju što je uvijek vjerovao u mene i tijekom studija bio velika podrška i motivacija.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Diplomski rad**

**Sveučilište u Zagrebu**
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**
**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**
**Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

# Uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru s ciljem proizvodnje *(S)*-adenozil-L- metionina

*Elizabeta Kralj, 667/BPI*

**Sažetak:** *(S)*-adenozil-L-metionin (SAMe, AdoMet) je glavni donor metilne skupine u reakcijama kataliziranim enzimima metiltransferazama te sudjeluje u metilaciji DNA, RNA, sterola i fosfolipida. Kod ljudi se poremećaji u metabolizmu SAMe povezuju s različitim oboljenjima pa ima značajnu ulogu kao farmaceutik i nutraceutik u liječenju depresije, osteoartritisa, bolesti jetre i Alzheimerove bolesti. Najčešće se proizvodi mikrobiološkom sintezom pomoću kvasaca. U ovom radu uzgajana je biomasa soja M12 kvasca *Scheffersomyces stipitis* na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru. S ciljem ispitivanja utjecaja dodatka protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola i kolina) na rast biomase i udio SAMe uzgoji su provedeni u tzv. O-podlozi bez i uz dodatak protektivnih spojeva. Dodatak glicerola u O-podlogu u uvjetima povećane aeracije pozitivno je djelovao na rast soja M12 kao i na udio SAMe u kvascu uzgojenom na laboratorijskoj tresilici. Uzgojem soja M12 kvasca *S. stipitis* u laboratorijskom bioreaktoru u modificiranoj O-podlozi s glicerolom kao osnovnim izvorom ugljika postignut je dobar rast soja M12 kvasca *S. stipitis*, a uz pulsni dodatak D,L-metionina na početku stacionarne faze ostvareno je povećanje udjela SAMe u kvaščevoj biomasi.

**Ključne riječi:** *(S)*-adenozil-L-metionin, kvasac *Scheffersomyces stipitis*, glicerol, bioreaktor
**Rad sadrži:** 62 stranice, 23 slike, 10 tablica, 86 literaturnih navoda
**Jezik izvornika**: hrvatski
**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *izv. prof. dr. sc. Damir Stanzer*
**Pomoć pri izradi**: *dipl. ing. Stela Križanović, asistentica*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**
1. Izv.prof.dr.sc. *Vlatka Petravić Tominac*
2. Izv.prof.dr.sc. *Damir Stanzer*
3. Izv.prof.dr.sc. *Ksenija Markov*
4. Izv.prof.dr.sc. *Jasna Mrvčić*

**Datum obrane:** 13. srpnja 2016.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Graduate Thesis**

**University of Zagreb**
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**
**Department of Food Engineering**
**Laboratory for Fermentation Technology and Yeast**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences
**Scientific field:** Biotechnology

# Cultivation of yeast *Scheffersomyces stipitis* in laboratory shaker and in laboratory bioreactor with purpose of (*S*)-adenosyl-L-methionine production

*Elizabeta Kralj, 667/BPI*

**Abstract:** (*S*)-adenosyl-L-methionine (SAMe, AdoMet) is a primary donor of methyl group in reactions catalyzed by methyltransferases and is directly involved in methylation of DNA, RNA, sterols and phospholipids. Disorders in SAMe metabolism are associated with various diseases in humans, so it has an important role as a pharmaceutical and a nutraceutical in treatments of conditions such as depression, osteoarthritis, liver diseases and Alzheimer's disease. SAMe is most commonly produced by microbial synthesis using yeasts. In this study a biomass of yeast strain *Scheffersomyces stipitis* M12 was grown in laboratory shaker and in laboratory bioreactor. Cultivations were carried out in O-medium without and with addition of protective compounds, so the impact of this compounds (glycerol, myo-inositol and choline) on the growth of biomass and on the SAMe content could have been tested. Addition of glycerol in O-medium in conditions of increased aeration positively affected the growth of M12 strain as well as SAMe content in the laboratory shaker. During the cultivation of M12 strain in a laboratory bioreactor in the modified O-medium with glycerol as a primary carbon source a satisfactory amount of M12 biomass was produced, while pulsed addition of D, L-methionine at the start of the stationary phase increased the SAMe content in biomass.

**Keywords:** *(S)*-adenosyl-L-methionine, yeast *Scheffersomyces stipitis*, glycerol, bioreactor
**Thesis contains:** 62 pages, 23 figures, 10 tables, 86 references
**Original in**: Croatian
**Graduate Thesis in printed and electronic (**pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD Damir Stanzer, Associate Professor*
**Technical support and assistance**: *Stela Križanović, BSc*
**Reviewers:**
1. PhD *Vlatka Petravić Tominac*, Associate Professor
2. PhD *Damir Stanzer*, Associate Professor
3. PhD *Ksenija Markov*, Associate Professor
4. PhD *Jasna Mrvčić*, Associate professor

**Thesis defended:** July 13th 2016

# SADRŽAJ:

**1. UVOD ..... 1**
**2. TEORIJSKI DIO ..... 2**
2.1. Kvasci ..... 2
2.1.1. Regulacija metabolizma kvasca ..... 2
2.1.1.1. Pasteurov efekt ..... 2
2.1.1.2. Crabtree - efekt ..... 2
2.1.1.3. Kluyverov efekt ..... 2
2.1.1.4. Custerov efekt ..... 3
2.1.2. Potencijal kvasaca u biotehnologiji ..... 3
2.1.2.1. Proizvodnja bioetanola ..... 4
2.1.2.2. Proizvodnja enzima ..... 4
2.1.2.3. Proizvodnja farmaceutskih proizvoda ..... 4
2.1.2.4. Proizvodnja biološki aktivnih spojeva ..... 4
2.1.3. Odabrane biotehnološki interesantne vrste kvasaca ..... 5
2.1.3.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ..... 6
2.1.3.2. Kvasac *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus* ..... 6
2.1.3.3. Kvasac *Yarrowia lipolytica* ..... 6
2.1.4. Kvasac *Scheffersomyces stipitis* ..... 7
2.1.4.1. Značajke kvasca *Scheffersomyces stipitis* ..... 7
2.1.4.2. Fiziologija kvasca *Scheffersomyces stipitis* ..... 8
2.1.4.3. Proizvodnja heterolognih proteina pomoću kvasca *Scheffersomyces stipitis* ..... 10
2.1.4.4. Prednosti kvasca *Scheffersomyces stipitis* naspram *Saccharomyces cerevisiae* ..... 10
2.1.5. Sastojci hranjivog medija za uzgoj kvasaca ..... 11
2.1.5.1. Voda ..... 12
2.1.5.2. Biogeni elementi ..... 12
2.1.5.3. Mineralne soli ..... 15
2.1.5.4. Faktori rasta ..... 15
2.1.5.5. Prekursori, induktori i ostali sastojci ..... 15

2.2. *(S)*-adenozil-L-metionin (SAMe) ..... 15

2.2.1. Biološki značaj SAMe za ljudski organizam ..... 17

2.2.2. Mikrobiološka proizvodnja SAMe pomoću kvasaca ..... 18

2.2.3. Povezanost SAMe-ovisne metilacije i biosinteze lipidnih komponenata stanice kvasca ..... 19

**3. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 23**

3.1. Materijali ..... 23

3.1.1. Radni mikroorganizam ..... 23

3.1.2. Kemikalije ..... 23

3.1.3. Laboratorijska oprema ..... 24

3.1.3.1. Laboratorijski pribor ..... 24

3.1.3.2. Uređaji i instrumenti ..... 25

3.1.4. Hranjive podloge i otopine ..... 25

3.1.4.1. YPD podloga za čuvanje sojeva kvasca *S. stipitis* ..... 25

3.1.4.2. O-podloga za umnažanje sojeva kvasca *S. stipitis* i proizvodnju *S*-adenozil-L-metionina ..... 26

3.1.5. Puferi i otopine ..... 27

3.2. Metode rada ..... 28

3.2.1. Čuvanje i održavanje sojeva kvasca *S. stipitis* ..... 28

3.2.2. Uzgoj inokuluma ..... 28

3.2.3. Uzgoj kvaščeve biomase u svrhu proizvodnje SAMe ..... 28

3.2.4. Praćenje brzine rasta i potrošnje osnovnog izvora ugljika tijekom uzgoja soja M12 i divljeg soja kvasca *S. stipitis* ..... 28

3.2.5. Priprema biomase za određivanje sadržaja SAMe u biomasi soja M12 i divljeg soja kvasca *S. stipitis* ..... 29

3.3. Analitičke metode ..... 29

3.3.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase ..... 29

3.3.1.1. Proračun pokazatelja rasta ..... 30

3.3.2. Određivanje suhe tvari kvaščeve biomase u kvaščevoj suspenziji namijenjenoj određivanju SAMe ..... 30

3.3.3. Određivanje koncentracije glukoze ..... 31

3.3.4. Određivanje koncentracije glicerola ..... 31

3.3.4.1. Priprema uzorka za HPLC- analizu ..... 31

3.3.4.2. Priprema otopina standarda ..... 32

3.3.4.3. Kromatografski uvjeti analize ....32
3.3.4.4. Identifikacija i kvantifikacija....33
3.3.5. Određivanje koncentracije *S*-adenozil-L-metionina....33
3.3.5.1. Priprema uzorka za HPLC-analizu ....34
3.3.5.2. Priprema otopina standarda....34
3.3.5.3. Kromatografski uvjeti analize ....35
3.3.5.4. Identifikacija i kvantifikacija SAMe....35
3.3.6. Određivanje koncentracije ergosterola u biomasi kvasca (*eng. Sterol quantitation method*)....36
**4. REZULTATI....38**
4.1. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe na laboratorijskoj tresilici....38
4.1.1. Kinetika rasta soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) ....38
4.1.2. Utjecaj stupnja aeracije na rast biomase soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) ....40
4.1.3. Udio SAMe i ergosterola u biomasi soja *S. stipitis* M12 u stacionarnoj fazi rasta u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) ....41
4.2. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe u laboratorijskom bioreaktoru ....43
**5. RASPRAVA ....46**
5.1. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe na laboratorijskoj tresilici....46
5.1.1. Kinetika rasta soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) ....46
5.1.2. Utjecaj stupnja aeracije na rast biomase soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) ....47
5.1.3. Udio SAMe i ergosterola u biomasi soja *S. stipitis* M12 u stacionarnoj fazi rasta u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) ....49
5.2. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe u laboratorijskom bioreaktoru ....50
**6. ZAKLJUČCI....54**
**7. LITERATURA....55**

# 1. UVOD

*(S)*-adenozil-L-metionin (SAMe, AdoMet) je biološka molekula koja služi kao glavni donor metilne skupine u reakcijama kataliziranim enzimima metiltransferazama. SAMe je prekursor za sintezu glutationa (GSH), važan je faktor u metabolizmu nukleinskih kiselina i poliamina, biosintezi sterola i fosofolipida zbog čega je nužan za normalno funkcioniranje biomembrana i održavanje njihove strukture, te se pokazao kao koristan farmaceutik i nutraceutik u liječenju različitih bolesti poput depresije, osteoartritisa, demencije i bolesti jetre (Bottiglieri, 2002). Biosinteza SAMe odvija se u citoplazmi stanica svih mikroorganizama te u tkivima organa viših organizama, a najčešće se proizvodi izolacijom iz kvaščeve biomase uzgojene mikrobnom fermentacijom u hranjivom mediju koji sadrži prekursor L-metionin (L-Met). U proizvodnji SAMe koriste se kvasci koji su sposobni nakupljati veće količine SAMe pri čemu se sinteza odvija djelovanjem SAM sintetaze iz L-metionina i ATP-a (Cao i sur., 2012).

*Scheffersomyces stipitis* je Crabtree-negativni askomicetni kvasac koji je ranije bio poznat i pod imenom *Pichia stipitis*, a već duže vrijeme se istražuje kao potencijalni mikroorganizam za proizvodnju bioetanola i proizvoda visoke vrijednosti (heterolognih proteina). Značajan je zbog sposobnosti fermentacije i rasta na velikom broju različitih šećera (heksoza i pentoza) (Nigam, 2002), zbog čega se može koristiti za proizvodnju bioetanola i ostalih kemikalija iz predobrađenih lignoceluloznih sirovina poput otpadnog drveta, pšenične i rižine slame, bagase šećerne trske, kukuruznih oklasaka i kukuruzovine (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008).

U ovom radu istražit će se uzgoj selekcioniranog kvasca *S. stipitis* M12 rezistentnog na nistatin na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru s ciljem optimiranja hranjivog medija za rast soja M12 i proizvodnju SAMe u uvjetima intenzivne aeracije. Zbog usporedbe će u istim uvjetima paralelno biti uzgajan divlji soj kvasca *S. stipitis*. Soj M12 izoliran je s podloge s nistatinom nakon primjene ultraljubičastog (UV) svjetla, zbog čega ima poremećaj u biosintezi ergosterola koji dovodi do povećanog udjela SAMe u stanici kvasca. Soj M12 ne eksprimira enzim Δ-24-sterol-C-metiltransferazu (Erg6) koja u divljem soju katalizira metilaciju zimosterola u fekosterol prilikom biosinteze ergosterola u kojoj se troši znatan dio staničnog SAMe. Osim toga, prekidom biosinteze ergosterola dobiven je soj M12 s nižim udjelom ergosterola u staničnoj membrani, što znatno utječe na fluidnost membrane i čini ga osjetljivijim na osmotski i oksidativni stres, zbog čega zahtjeva posebne uvjete za rast. Prilikom istraživanja ispititat će se utjecaj dodatka različitih vrsta i koncentracija protektivnih spojeva u hranjivi medij na rast i proizvodnju SAMe kako bi se osigurao dobar rast soja kvasca *S. stipitis* M12 i proizvodnja SAMe u uvjetima intenzivne aeracije.

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. Kvasci

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi koji se već tradicionalno primjenjuju u biotehnologiji. Svrstani su u carstvo *Fungi* koje se na osnovu karakteristika vegetativnog rasta i prirode spora dijeli u četiri koljena (Grba, 2010):

1. *Zygomycota*
2. *Ascomycota*
3. *Deuteromycota* (*Fungi imperfecti*)
4. *Basidiomycota*.

Kvasce možemo definirati kao askomicetne i bazidiomicetne gljive koje se mogu razmnožavati vegetativno pupanjem ili cijepanjem (fisijom). Industrijski značajni kvasci svrstani su u razred *Ascomycetes,* a samo neki u *Basidiomycetes* (Grba, 2010).

### 2.1.1. Regulacija metabolizma kvasca

#### *2.1.1.1. Pasteurov efekt*

Pasteurov efekt opisuje metabolizam ugljikohidrata u stanici kvasca u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Prema Pasteurovom efektu, u aerobnim uvjetima ugljikohidrati se u potpunosti oksidiraju do $CO_2$ i vode, ne nastaje etanol, a stvara se veća količina biomase, dok se u anaerobnim uvjetima ugljikohidrati brzo previru u etanol i $CO_2$, pri čemu nastaje vrlo malo biomase. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) i koeficijent pretvorbe supstrata u produkt (etanol) ($Y_{P/S}$) u aerobnim uvjetima iznose 0,5 g X $g^{-1}$ S, i 0 g EtOH $g^{-1}$ S, odnosno u anaerobnim uvjetima 0,02 g X $g^{-1}$ S, i 0,45 g EtOH $g^{-1}$ S (Slavica, 2016) .

#### *2.1.1.2. Crabtree - efekt*

Crabtree-efekt je pojava kod određenih vrsta kvasaca prilikom koje, u aerobnim uvjetima uslijed visoke koncentracije izvora ugljika (šećera), kvasac umjesto razgradnje šećera TCA ciklusom i stvaranja biomase fermentira šećer u alkohol (etanol). Fenomen je nazvan po engleskom biokemičaru Herbertu Graceu Crabtree-ju koji ga je opisao 1929. godine, a zapažen je kod rodova S*accharomyces, Schizosaccharomyces, Debaryomyces, Brettanomyces, Torulopsis, Nematospora,* i *Nadsonia* (De Deken, 1966).

#### *2.1.1.3. Kluyverov efekt*

Kluyverov efekt predstavlja nemogućnost nekih fakultativno-fermentativnih kvasaca, koji fermentiraju glukozu, da u anaerobnim uvjetima fermentiraju određene ugljikohidrate u etanol, iako ih mogu oksidirati u aerobnim uvjetima (respiracija). Kluyver-pozitivni

ugljikohidrati su u pravilu disaharidi, a od monosaharida Kluyver-pozitivna je jedino galaktoza (Fukuhara,2003).

#### *2.1.1.4. Custerov efekt*

Custerov efekt je pojava kod koje u aerobnim uvjetima kvasci fermentiraju glukozu u etanol uz nakupljanje acetata. Promjenom aerobnih uvjeta u anaerobne, fermentacija supstrata se zaustavlja tijekom nekoliko sati, a nakon toga se nastavlja vrlo sporo. Neki od Custer-pozitivnih kvasaca su vrste iz rodova *Brettanomyces, Dekkera* i *Einiella* (Uscanga i sur., 2003).

### 2.1.2. Potencijal kvasaca u biotehnologiji

Još od drevnih vremena, kvasci se tradicionalno primjenjuju kao biokatalizatori u proizvodnji fermentiranih proizvoda (piva, vina), etanola i jakih alkoholnih pića te pekarskih proizvoda. Napretkom znanosti i biotehnologije, kvasci se počinju primjenjivati u proizvodnji biogoriva, „single cell“ proteina (SCP), industrijskih enzima i metabolita male molarne mase, a pokazali su se i kao dobri indikatori prilikom bioremedijacije (slika 1).




**Slika 1.** Područja primjene kvasca u biotehnologiji (prilagođeno iz Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

#### *2.1.2.1. Proizvodnja bioetanola*

U posljednjih nekoliko godina, zbog sve veće potrošnje fosilnih goriva i sve veće bojazni od iscrpljivanja njihovih izvora, razvili su se različiti procesi proizvodnje biogoriva iz alternativnih izvora. Kad govorimo o kvascima u proizvodnji biogoriva, najčešće se taj izraz odnosi na dosad najbolje okarakterizirani kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. No primjenom lignoceluloznih sirovina u proizvodnji bioetanola interes se usmjerava ka vrstama sposobnim za fermentaciju pentoznih šećera poput *Pachysolen tannophilus, Candida shehatae, Scheffersomyces stipitis, Kluyveromyces marxianus* te vrstama roda *Brettanomyces, Clavispora, Schizosaccharomyces* i *Debaromyces* (Kuhad i sur., 2011). Primjena genetičkog inženjerstva omogućila je razvoj rekombinantnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji mogu fermentirati pentozne šećere što je, zbog visoke tolerancije *Saccharomyces* vrsta na etanol, uvelike unaprijedilo proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina.

#### *2.1.2.2. Proizvodnja enzima*

Kvaščeva biomasa dobar je izvor enzima invertaza, alkohol dehidrogenaza, *β*-galaktozidaza, lipaza, rafinaza, fosfofruktokinaza i fosfoglicerol-kinaza koje se nalaze u stanicama kvasca u velikim količinama, zbog čega su pogodne za komercijalnu proizvodnju. Invertaza, proteolitički enzimi, melibiaza (*α*-galaktozidaza) i alkohol dehidrogenaza najčešće se izoliraju ekstrakcijom iz biomase pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*), lipaze iz kvasaca roda *Candida* (*Candida rugosa*), a laktaze (*β*-galaktozidaze) iz kvasaca rodova *Kluyveromyces* (*K. marxianus*) i *Candida* (Grba, 2010).

#### *2.1.2.3. Proizvodnja farmaceutskih proizvoda*

Kvasci imaju posebno mjesto u proizvodnji farmaceutskih preparata i lijekova, jer se neke od komponenata izoliraju iz same kvaščeve biomase, dok se druge sintetiziraju pomoću kvasaca, što je posebno došlo do izražaja primjenom rDNA tehnologije (genetičko inženjerstvo). Za proizvodnju se najčešće koriste kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i kvasci roda *Pichia* (*Pichia pastoris*), a jedni od najčešćih proizvoda su kožni respiracijski faktor, *β*-glukan, koenzim-A sintetizirajući kompleks i (*S*)-adenozil-L-metionin (Grba, 2010).

#### *2.1.2.4. Proizvodnja biološki aktivnih spojeva*

Razvoj tehnologije rekombinantne DNA omogućio je da se pomoću mikroorganizama proizvedu biološki aktivne komponente za farmakološku primjenu. U početku je dominantnu ulogu u proizvodnji biološki aktivnih spojeva imala bakterija probavnog trakta *Escherichia coli* koja intracelularno nakuplja proteine u inkluzijska tijela zbog čega je potrebno naknadno

izdvajanje iz stanica i pročišćavanje proizvoda do visoke čistoće. Kasnije, počinje primjena eukariotskih stanica kvasca (*S. cerevisiae,* a kasnije *Pichia pastoris*) s mogućnošću ekstracelularnog izlučivanja željenih proteina kako bi se olakšao proces proizvodnje (Grba, 2010). Neki od terapeutskih proteina proizvedenih pomoću stanica kvasca prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Terapeutski proteini proizvedeni pomoću stanica kvasca (prilagođeno iz Grba, 2010).

| Komercijalni naziv | Rekombinantni protein | Proizvođač | Kvasac |
|---|---|---|---|
| Actrapid / Novolog | Inzulin | Novo Nordisk | *S. cerevisiae* |
| Albumen | Rh albumen | Delta Biotechnol | S. cerevisiae |
| Comvax *S.cerevisiae* | Hepatitis B-antigen | Merck | *S. cerevisiae* |
| Glukagen | Glukagon | Novo Nordisk | *S. cerevisiae* |
| Hepatitis B vaccine | Hepatitis B-proteini | Crucell:Green Cross (J.Koreja) | *P. angusta* |
| Trypsin | Inzulin | Aventis | *P. pastoris* |
| Valtropin | Somatropin, rh GH | Biopartners | *S. cerevisiae* |

### 2.1.3. Odabrane biotehnološki interesantne vrste kvasaca

**Tablica 2**. Kvasci od posebnog značaja u biotehnologiji (prilagođeno prema Johnson i Echavarri-Erasun, 2011 i Walker, 2009).

| Vrsta kvasca | Primjena |
|---|---|
| *Saccharomyces cerevisiae* | Proizvodnja alkohola, piva, vina, kruha, jakih alkoholnih pića, enzima, SCP, itd. |
| *Schizosaccharomyces pombe* | Proizvodnja lambic piva i ruma, osmotolerantan kvasac. |
| *Kluyveromyces lactis*<br>*Kluyveromyces marxianus* | Fermentacija laktoze, inulina, proizvodnja enzima i rekombinantnih proteina |
| *Scheffersomyces stipitis* | Fermentacija ksiloze u etanol, mliječnu kiselinu i dr. |
| *Yarrowia lipolytica* | Proizvodnja limunske kiseline, lipaza i proteina iz ugljikovodika. |
| *Candida shehatae* | Fermentacija ksiloze, proizvodnja kemikalija i farmaceutika. |

#### *2.1.3.1. Kvasac Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* je najstariji komercijalno upotrebljavani kvasac koji se koristi u proizvodnji vina, piva, kruha i jakih alkoholnih pića, a u posljednjem desetljeću i u proizvodnji biogoriva, lijekova i finih kemikalija. Industrijski sojevi *S. cerevisiae* su Crabtree pozitivni sojevi karakteristični po potpunoj fermentaciji šećera, povećanoj proizvodnji etanola i toleranciji na isti, pojačanoj flokulaciji te po proizvodnji karakterističnih aroma i okusa (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011). Sposoban je fermentirati monosaharide (glukozu, maltozu, trehalozu) i disaharide (saharoza) veoma brzo, trisaharid maltotriozu sporije, rafinozu samo djelomično, a pentoze i disaharid laktozu ne može fermentirati (Grba, 2010). Do sad je najbolje genetički i fiziološki karakteriziran eukariotski mikroorganizam zbog čega se smatra modelnim organizmom u temeljnim istraživanjima. Primjena rekombinantne DNA (rDNA) tehnologije – genetičkog inženjerstva, omogućila je njegovu primjenu kao domaćina za proizvodnju heterolognih proteina i metabolita (Svetec i Zgaga, 2010).

#### *2.1.3.2. Kvasac Kluyveromyces lactis i Kluyveromyces marxianus*

Vrste roda *Kluyveromyces* vrlo su važne u mliječnoj industriji jer proizvode enzim *β*-galaktozidazu (laktaza) koji im omogućava korištenje šećera laktoze kao izvora ugljika i energije pa se mogu primjenjivati za proizvodnju alkohola i kvaščeve biomase na jeftinim supstratima i otpadnim materijalima koji sadrže laktozu, npr. sirutka. Osim laktoze, neki kvasci ovog roda mogu metabolizirati inulin što ih čini potencijalnim mikroorganizmima za proizvodnju etanola iz alternativnih sirovina poput jeruzalemske artičoke, kasave i slatkog krumpira koje sadrže navedeni rezervni ugljikohidrat (Grba, 2010). Kvasci *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus* prisutni su u mnogim mliječnim proizvodima, posjeduju GRAS status, tj. sigurni su mikroorganizmi za ljudsku upotrebu (eng. *Generally Recognized as Safe*) te su značajani za proizvodnju heterolognih proteina, enzima (inulinaza, invertaza, *β*-galaktozidaza) (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

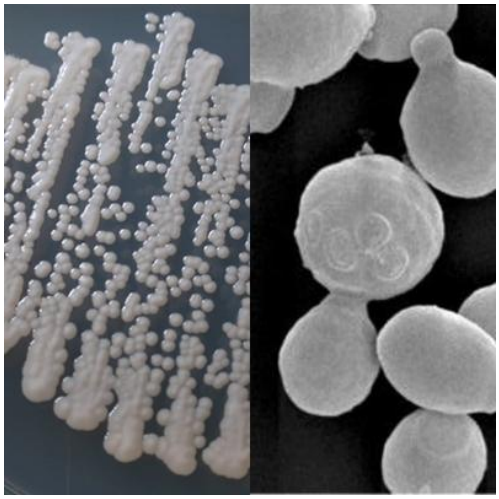
#### *2.1.3.3. Kvasac Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* je kvasac sa GRAS statusom koji se najviše primjenjuje u proizvodnji limunske kiseline iz ulja repice (Grba, 2010). Upotrebljava ravnolančane ugljikovodike i različite masti kao izvore ugljika, a osim limunske kiseline dobar je proizvođač ostalih organskih kiselina (piruvata, citrata, izocitrata), SCP-a (*eng. Single Cell Proteins*) te laktona i aroma (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

### 2.1.4. Kvasac *Scheffersomyces stipitis*

**Tablica 3.** Taksonomija kvasca *Scheffersomyces stipitis* (Kurtzman i Suzuki.,2010).

| **Taksonomska kategorija** | **Primjer (*Scheffersomyces stipitis)*** |
|---|---|
| Carstvo | *Fungi* |
| Koljeno | *Ascomycota* |
| Razred | *Saccharomycetes* |
| Red | *Saccharomycetales* |
| Porodica | *Debaryomycetaceae* |
| Rod | *Scheffersomyces* |
| Vrsta | *stipitis* |



**Slika 2.** Prikaz kolonija (lijevo) i mikroskopske slike haploidnih stanica (desno) kvasca *Scheffersomyces stipitis* (prilagođeno i prošireno iz Modugu, 2013).

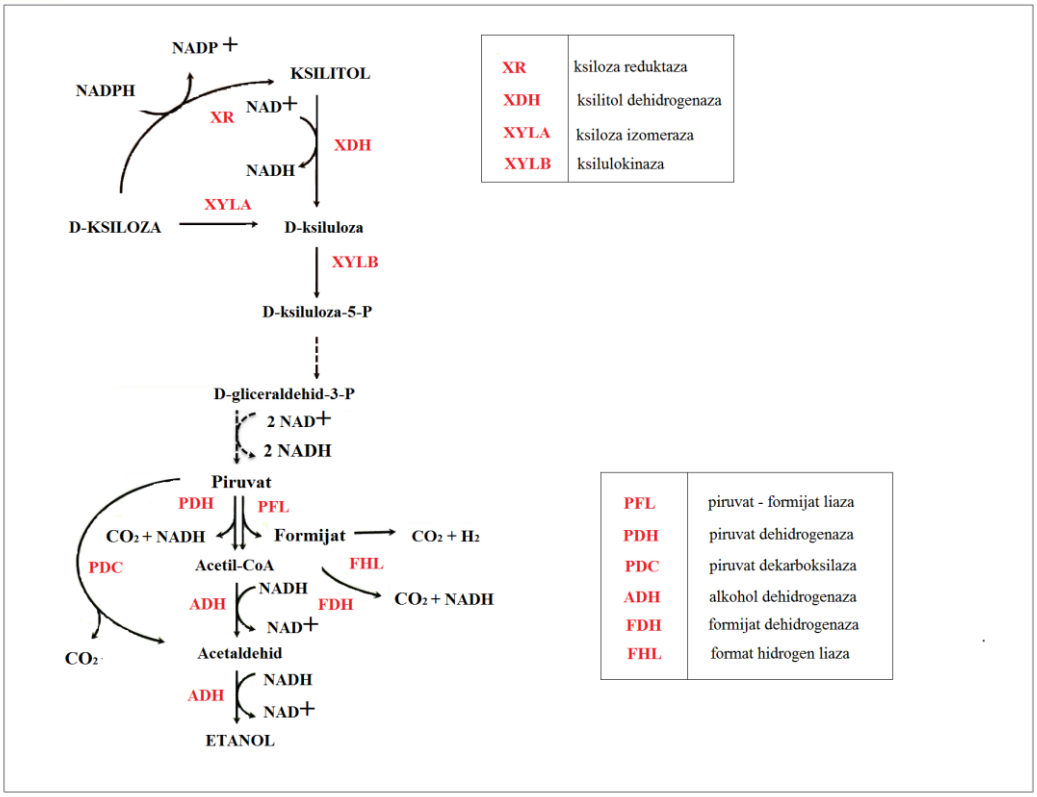
#### *2.1.4.1. Značajke kvasca Scheffersomyces stipitis*

*Scheffersomyces stipitis* je haploidni (slika 2), homotalični, hemiaskomicetni kvasac iz porodice *Debaryomyceraceae* (tablica 3) čiji je stariji naziv *Pichia stipitis* (Jeffries i VanVleet, 2009). Izoliran je iz larvi insekata i kornjaša koji nastanjuju i razlažu trulo bijelo drvo (Suh i sur., 2003) te je sposoban koristiti većinu šećera prisutnih u drvetu. *Scheffersomyces stipitis* fermentira glukozu, ksilozu, manozu, galaktozu i celobiozu, može rasti i na *L*-arabinozi, no ne može ju fermentirati u etanol (Nigam, 2002). Transport šećera u stanicu kvasca *S. stipitis* reguliran je djelovanjem visokoafinitetnog i niskoafinitetnog trasportnog sustava. Niskoafinitetnim sustavom transportiraju se glukoza i ksiloza kada se u

okolini stanice nalaze u velikim količinama, pri čemu prisutnost glukoze u okolini stanice reprimira transport ksiloze (katabolička represija glukozom). Kada je u okolini stanice koncentracija šećera niska transport se odvija visokoafinitetnim transportnim sustavom. *S. stipitis* jedan je od rijetkih kvasaca koji može u anaerobnim uvjetima fermentirati ksilozu u etanol jer posjeduje specifične NADH i NADPH kofaktore ksiloza-reduktaze, pri čemu ravnoteža navedenih kofaktora sprečava fermentaciju ksiloze u ksilitol (slika 3) (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008). Zbog sposobnosti fermentacije pentoznih šećera u etanol, *S. stipitis* se pokazao značajnim kvascem u proizvodnji bioetanola iz predobrađenih sekundarnih sirovina (otpadno drvo, pšenična i rižina slama, bagasa šećerne trske, kukuruzni oklasci, kukuruzovina i dr.) (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008).

#### *2.1.4.2. Fiziologija kvasca Scheffersomyces stipitis*

*S. stipitis* je Crabtree negativan (respiratorni) kvasac optimalne temperature rasta 25 do 33 °C i optimalnog pH raspona 4,5 do 5,5. Važan čimbenik rasta i fermentacije je sastav hranjivog (fermentacijskog) medija pri čemu dodatak dušika, vitamina, aminokiselina, purina i pirimidina te mikro- i makrohranjiva pospješuje rast *S. stipitis* i fermentaciju (Slininger i sur., 2006). Koncentracija kisika u hranjivom mediju ima važnu ulogu u metabolizmu *S. stipitis* jer utječe na rast stanica, redoks ravnotežu, rad mitohondrija i stvaranje energije potrebne za transport ksiloze u stanicu. Budući da je Crabtree negativan kvasac, visoka koncentracija šećera u hranjivom mediju u aerobnim uvjetima ne inducira fermentaciju i stvaranje etanola, već prelazak sa oksidativnog na fermentativni metabolizam ovisi o koncentraciji otopljenog kisika u hranjivom mediju (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008).




**Slika 3.** Metabolički put fermentacije ksiloze u etanol u kvascu *S. stipits* (prilagođeno prema Dellomonaco i sur., 2010).

Početna koncentracija šećera utječe na produktivnost fermentacije pri čemu su du Preez i suradnici 1985. utvrdili da se maksimalni prinos etanola postiže s 50 $gL^{-1}$ ksiloze, a inhibicija nastupa kod početnih koncetracija od 76 do 99 $gL^{-1}$ ksiloze. Ovaj kvasac značajan je zbog gotovo teorijskog prinosa etanola iz pentoza uz nizak prinos ksilitola (Huang i Lefsrud, 2012), te po brzoj fermentaciji ksiloze (Kurtzman, 1990). Prema Delgenes i sur. (1988), kvasac *S. stipitis* može proizvesti 50 $gL^{-1}$ etanola, iako to u potpunosti inhibira stanice u mikroaerofilnim uvjetima jer etanol utječe na organizaciju i permeabilnost stanične membrane, odnosno utječe na prijenos protona kroz staničnu membranu što dovodi do zakiseljavanja citoplazme i smrti stanice. Tolerancija na etanol povezana je s ATP-aznom aktivnošću stanične membrane jer se ATP-aze koriste za transport protona kroz staničnu membranu uslijed čega se smanjuje zakiseljavanje citoplazme (Meyrial i sur., 1995). Kod stanica kvasca *S. stipitis* koje rastu na glukozi uočena je veća ATP-azna aktivnost u odnosu na stanice koje rastu na ksilozi, a samim time i veća tolerancija na etanol kod stanica koje rastu na glukozi (Meyrial i sur., 1995).

#### *2.1.4.3. Proizvodnja heterolognih proteina pomoću kvasca Scheffersomyces stipitis*

Zbog svoje Crabtree-negativnosti (ne formira etanol tijekom aerobnog rasta pri visokim koncetracijama šećera u podlozi) i dobre konverzije izvora ugljika u biomasu, kvasac *Scheffersomyces stipitis* je prikladan kvasac za proizvodnju heterolognih proteina. Ovaj kvasac može izlučivati proteine iz stanice u hranjivi medij što znatno olakšava njihovu izolaciju i pročišćavanje (Passoth i Hahn-Hägerdal, 2000). Visoka koncentracija biomase kvasca osigurava i visok volumetrijski prinos heterolognih proteina (Hensing i sur., 1995), a dodatak aminokiselina u definirani medij za uzgoj biomase *S. stipitis* pospješuje proizvodnju heterolognih proteina (Toman i sur., 2000). Pogodan je za proizvodnju enzima *β*-1,4-ksilanaza i ksiloza-reduktaza odgovornih za razgradnju D-ksiloze te dehidrogenaza ključnih u proizvodnji etanola iz *D*-ksiloze (ksilitol dehidrogenza) (Den Haan i Zyl, 2003). *S. stipitis* je i izvor gena koji nose informaciju za sintezu enzima koji se mogu klonirati u kvasac *Saccharomyces cerevisiae* s ciljem omogućavanja korištenja pentoznih šećera i njihove konverzije u etanol kako bi se povećali prinosi etanola pri proizvodnji biogoriva druge generacije (Jeppsson i sur., 2002).

#### *2.1.4.4. Prednosti kvasca Scheffersomyces stipitis naspram Saccharomyces cerevisiae*

Razlike u metabolizmu kvasaca *Scheffersomyces stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* omogućavaju bolje razumijevanje fermentacijskih pojava te na taj način olakšavaju konstrukciju sojeva za proizvodnju etanola. *Scheffersomyces stipitis* je, za razliku od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, Crabtree-negativan kvasac i ima veći respiratorni kapacitet zbog prisutnosti alternativnog respiratornog sustava koji donira elektrone preko ubikvinona izravno na molekularni kisik ($O_2$) (Jeppsson i sur., 1995). Prednost kvasca *S. stipitis* naspram *S. cerevisiae* je i mogućnost fermentacije pentoza u etanol, jer ima jedan od najvećih prirodnih kapaciteta fermentacije ksiloze u etanol (0,35-0,44 g etanola $g^{-1}$ ksiloze) pri niskim brzinama prijenosa kisika (OTR; *eng. Oxygen Transfer Rate*) (Hahn-Hägerdal i Pamment, 2004). Fermentacija je kod kvasca *S. stipitis* regulirana limitacijom kisika, pri čemu su geni koji nose informaciju za sintezu kompleksa alkohol dehidrogenaze (ADH1 i ADH2), odgovorni za produkciju etanola, inducirani niskom razinom otopljenog kisika (Kliner i sur., 2005). Kod *S. cerevisiae* fermentacija je regulirana dostupnošću izvora ugljika neovisno o dostupnosti kisika (Gancedo, 1998).

**Tablica 4.** Usporedba kvasaca *Scheffersomyces stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* (prilagođeno prema Gibbons i Huges, 2011).

| | ***Scheffersomyces stipitis*** | ***Saccharomyces cerevisiae*** |
|---|---|---|
| **Izvori ugljika za rast** | glukoza<br>saharoza<br>maltoza<br>galaktoza<br>fruktoza<br>trehaloza<br>izomaltoza<br>rafinoza<br>maltotrioza<br>riboza<br>glukuronska kiselina<br>laktoza, ksiloza<br>arabinoza<br>celobioza<br>ramnoza<br>fukoza<br>sorboza<br>maltotetraoza | <u>Divlji sojevi</u>:<br>glukoza<br>saharoza<br>maltoza<br>galaktoza<br>fruktoza<br>trehaloza<br>izomaltoza<br>rafinoza<br>maltotrioza<br>riboza<br>glukuronska kiselina<br><br><u>Rekombinantni sojevi</u>:<br>laktoza<br>ksiloza<br>arabinoza |
| **Izvori ugljika za fermentaciju** | glukoza<br>saharoza<br>maltoza<br>galaktoza<br>fruktoza<br>trehaloza<br>izomaltoza<br>rafinoza<br>maltotrioza<br>ksiloza<br>arabinoza | glukoza<br>saharoza<br>maltoza<br>galaktoza<br>fruktoza<br>trehaloza<br>izomaltoza<br>rafinoza<br>maltotrioza |
| **Optimalna temperatura rasta** | 26–35°C | <44°C |
| **Optimalna pH vrijednost** | 4,0–7,5 | 3,0–8,0 |
| **Crabtree efekt** | negativan | pozitivan |
| **GRAS status** | zasad nema | + |

### 2.1.5. Sastojci hranjivog medija za uzgoj kvasaca

Hranjive podloge za mikrobne procese temeljni su čimbenik biotehnološke proizvodnje i sastoje se od brojnih sastojaka jednostavne ili složene građe, otopljenih, suspendiranih ili emulgiranih u vodi. Poznate su i pod nazivima hranjivi medij, supstrat i komina te se sastoje od 5 - 6 osnovnih sastojaka koji zadovoljavaju fiziološke potrebe odabranog proizvodnog mikroorganizma (biosinteza gradivnih sastojaka stanice, metabolička energija, rast, razmnožavanje i nakupljanje odgovarajućih metabolita) (Marić, 2000).

#### *2.1.5.1. Voda*

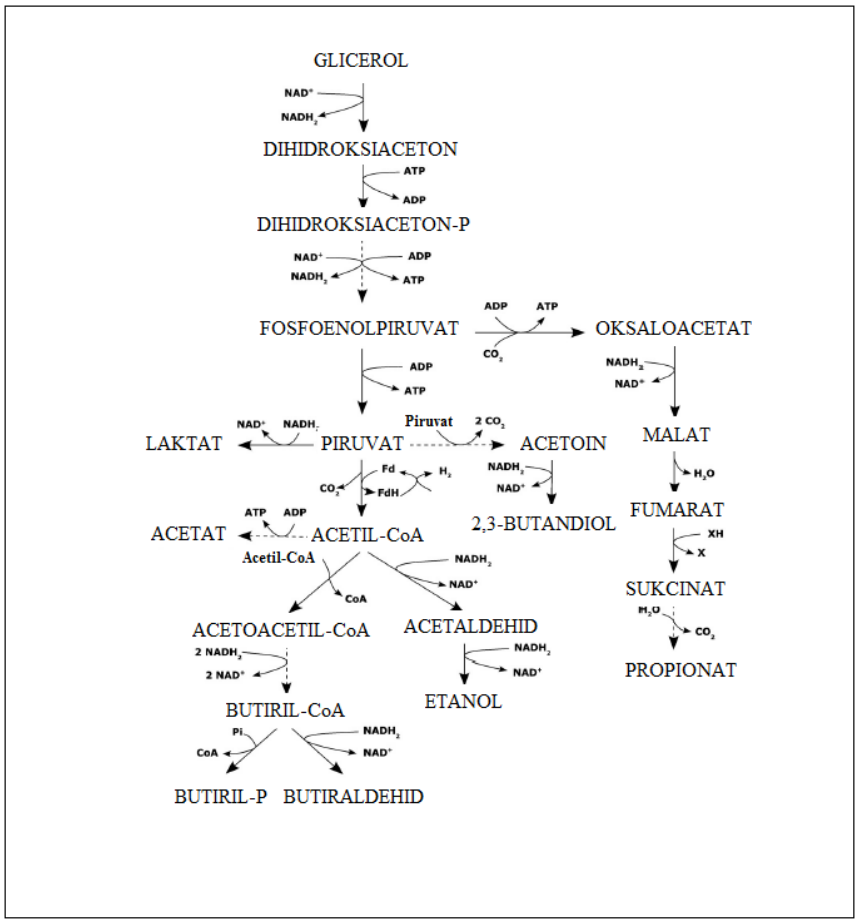
Voda je sastojak svakog hranjivog medija za mikrobne procese jer je nužna za odvijanje svih biokemijskih reakcija u živim stanicama. Dobar je vodič topline što pogoduje podešavanju temperature procesa, pogodan je medij za otapanje i prijenos otopljenih, suspendiranih i emulgiranih sastojaka hranjivog medija do stanica suspendiranih u istome te povećava dodirnu površinu između stanica i hranjivog medija čime pospješuje brzinu procesa. Mikrobni procesi odvijaju se u razrjeđenim hranjivim medijima pri čemu se potreba za vodom može kvantitativno izraziti kao vodena aktivnost ($a_v$; za čistu vodu $a_v$=1,0, za kvasce $a_v$=0,63) (Marić, 2000).

#### *2.1.5.2. Biogeni elementi*

Biogeni elementi (bioelementi) su ugljik, vodik, kisik, dušik, fosfor i sumpor (C, H, O, N, P, S), odnosno kemijski elementi koji ulaze u sastav glavnih makromolekula u stanici i neophodni su za životne funkcije svakog organizma zbog čega su njihovi izvori neophodni sastojci svake hranjive podloge (Marić, 2000).

1) Izvori ugljika

Industrijski mikroorganizmi su u pravilu kemoorganotrofi, rast im ovisi o oksidaciji ili fermentaciji ugljikovih spojeva, zbog čega su izvori ugljika najvažniji sastojak hranjivih medija za njihov uzgoj. Izvori ugljika u hranjivim medijima za uzgoj kvasaca najčešće su monosaharidi (glukoza, fruktoza) i oligosaharidi (saharoza, maltoza) jer ih kvasci lako asimiliraju i metaboliziraju, no zbog visokih cijena čistih šećera češće se koriste njihovi prirodni izvori (voćne komine), tekući šećeri (sladni ekstrakt, šećerni sirupi), sekundarni izvori (melasa, hidrol, CSL) te otpadni materijali (voćni trop, sulfitna lužina) (Marić, 2000). Od monosaharida, potencijalan izvor ugljika je i pentozni šećer ksiloza koja se pojavljuje kao sastojak hemiceluloze te sastavni dio otpada pri dobivanju celuloze. Predobrađeni polisaharidi (škrob, celuloza i inulin) dobar su izvor ugljika jer su sastojak obnovljivih sirovina interesantnih za industrijsku primjenu. Osim toga, mnogi mikroorganizmi kao izvor ugljika mogu koristiti alkohole (metanol, etanol, glicerol, manitol i sorbitol) (Marić, 2000).




**Slika 4.** Prikaz mogućih produkata razgradnje glicerola u kvascima (Da Silva i sur., 2009)

Glicerol je, od polialkohola, najčešći izvor ugljika u medijima za uzgoj mikroorganizama jer može zamijeniti tradicionalne ugljikohidratne supstrate u mikrobnim procesima (Da Silva i sur., 2009). To je trovalentni alkohol slatkasta okusa, bez mirisa i boje, topljiv u vodi i etanolu. Najčešće se primjenjuje u biosintezi antibiotika, steroida, aminokiselina i enzima (Da Silva i sur., 2009). U stanicama kvasca, glicerol se prevodi u glicerol-3-fosfat koji se može ili razgraditi glikolizom preko dihidroksiaceton-fosfata, odnosno gliceraldehid-3-fosfata, ili koristiti kao prekursor za biosintezu lipida i drugih metabolita (slika 4) (Wang i sur., 2001). Budući da je glicerol nusproizvod proizvodnje biodizela i bioetanola, smatra se otpadnim produktom pa je njegova cijena prihvatljivija od jednostavnih šećera, a njegovom razgradnjom postižu se znatno veći prinosi biogoriva i reduciranih kemikalija nego razgradnjom jednostavnih šećera (Dellomonaco i sur., 2010). Osim većih prinosa bioprocesa, prednost glicerola kao sirovine je i u tome

što spada u oksidativne supstrate, uslijed čega pri visokim koncentracijama glicerola u hranjivom mediju ne dolazi do promjene oksidativnog na oksidativno-fermentativni metabolizam u Crabtree pozitivnim kvascima pa je moguće šaržno vođenje bioprocesa (Ochoa-Estopier i sur., 2011).

2) Izvori dušika

Biosinteza i nakupljanje proteina, nukleinskih kiselina, slobodnih aminokiselina i vitamina utječe na brzinu rasta kvasca, zbog toga su omjer ugljika i dušika te vrsta izvora dšika u hranjivoj podlozi iznimno bitni. Mikroorganizmi mogu asimilirati dušik u svakom obliku osim $NO_3^-$, no većina ih preferira amonijev ion jer se on izravno ugrađuje u stanične sastojke. Izvori dušika mogu biti mineralni (amonijak, amonijev sulfat, diamonijev hidrogen fosfat, nitrat), organski (urea, aminokiseline, peptidi, purini, pirimidini), biljni (razna biljna brašna, kukuruzna krupica, kukuruzna močevina, krumpirovi proteini, proteinski hidrolizati i destilacijski ostaci), mikrobni (suhi kvasac, autolizati kvasca, otpadne biomase) i životinjski (meso, mesno brašno i mesni ekstrakt, kazein, želatina, pepton, riblje brašno) (Marić, 2000).

3) Izvori fosfora

Izvori fosfora su nezaobilazni sastojci hranjivih medija jer se fosfor u stanicama pojavljuje kao fosfat u nukleotidima i nukleinskim kiselinama. Izvori fosfora su soli fosforne kiseline (najčešće $K_2HPO_4$, $KH_2PO_4$, $Na_2PO_4$ i $(NH_4)_2PO_4$) koje se ujedno koriste i za puferiranje hranjivog medija. Osim soli, dobar izvor fosfora je i kukuruzna močevina (CSL) (Marić, 2000).

4) Izvori sumpora

Sumpor se u staničnoj građi pojavljuje u sastavu aminokiseline cistein koja sudjeluje u građi proteina u obliku tiola i drugim staničnim sastojcima koji sadrže sumpor poput aminokiseline metionina, koenzima biotina, tiamina, glutationa te donora metilne skupine *(S)*-adenozil-L-metionina (SAMe, AdoMet) (Linder, 2012). Izvor sumpora najčešće su sulfati i sumporna kiselina koja se koristi i za regulaciju pH vrijednosti medija (Marić, 2000).

#### *2.1.5.3. Mineralne soli*

Mineralne soli su izvor kemijskih elemenata koji u metabolizmu služe kao kofaktori određenih enzima. Dijele se u dvije skupine:

1) Makrohranjiva (K, Mg, Ca, Zn, Cl) – u staničnoj građi prisutni su u velikim količinama, a u podlogu se unose kao soli fosforne, sumporne i solne kiseline.

2) Mikrohranjiva (Co, B, Cd, Cr, Cu, Mo, Ni) – zbog male količine prisutne u staničnoj građi nazivaju se još i elementima u tragovima, potrebna koncentracija u hranjivom mediju ovisi o proizvodnom mikroorganizmu, tipu mikrobnog procesa i ostalim sastojcima podloge, ključni su za odvijanje biokemijskih reakcija i sekundarnog metabolizma (Marić, 2009).

#### *2.1.5.4. Faktori rasta*

Faktori rasta su molekule potrebne za gradnju staničnih sastojaka. Uglavnom su to aminokiseline, purini, pirimidini te vitamini. Razlikujemo *bitne faktore rasta* (molekule koje mikroorganizam ne može samostalno proizvesti) te *pomoćne faktore rasta* (molekule koje mikroorganizam može samostalno proizvesti, ali u nedovoljnoj količini za odvijanje metaboličkih procesa). Faktori rasta sastavni su dio prirodnih izvora ugljika i dušika, no često njihova koncetracija nije dovoljna pa se dodaju u hranjivi medij u obliku čistih pripravaka ili kao pripravak kvaščevog ekstrakta, kazeina, peptona, kukuruzne močevine (*eng. Corn Steep Liqour*; CSL) (Marić, 2009).

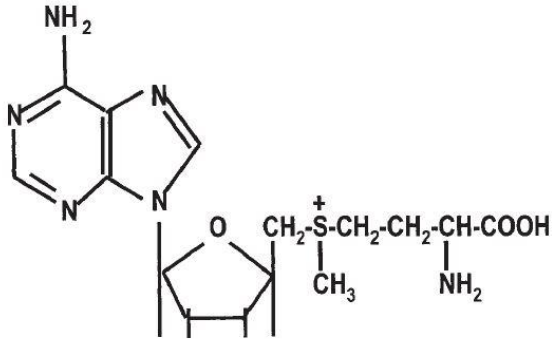
#### *2.1.5.5. Prekursori, induktori i ostali sastojci*

Prekursori su sastojci koje mikroorganizmi ne troše za rast već ih direktno ugrađuju u sekundarne metabolite te tako povećavaju prinos sekundarnih metabolita, induktori potiču biosintezu ekstracelularnih enzima te se dodaju u hranjivi medij samo kad je potrebna njihova prisutnost, od ostalih sastojaka u hranjivi medij se ovisno o mikrobnom procesu dodaju površinski aktivne tvari, suspendirane čestice, emulgatori, regulatori pjene i pH-regulatori, antiseptici i slično (Marić, 2009).

### 2.2. *(S)*-adenozil-L-metionin (SAMe)

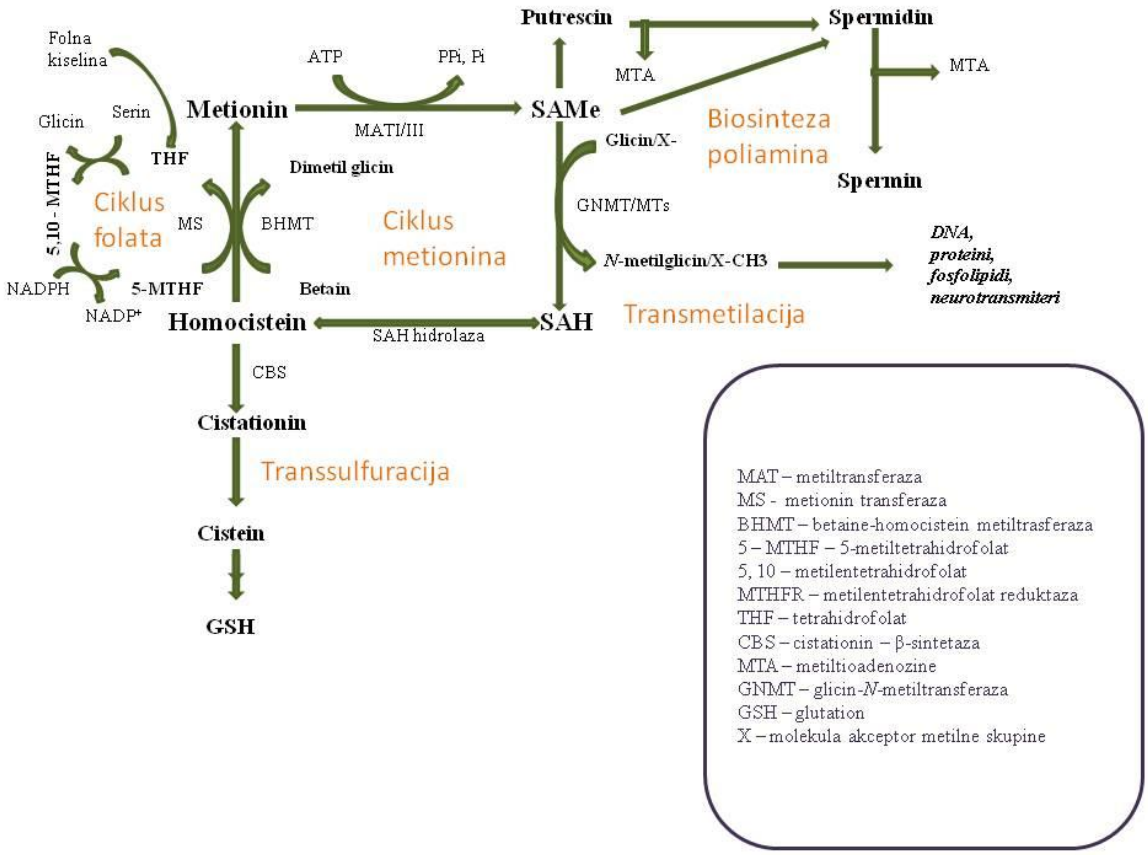
*(S)*-adenozil-L- metionin (SAMe, AdoMet) je važna pleiotropna molekula metabolizma stanice koja sudjeluje u staničnim reakcijama kao prekursor za sintezu glutationa i glavni donor metilne skupine prilikom metilacije nukleinskih kiselina, fosfolipida, histona, esencijalnih aminokiselina i proteina (Anstee i Day, 2012). Cantoni je 1952. godine opisao

strukturu molekule SAMe (slika 5) koja je formirana od esencijalne aminokiseline metionina (Met) i nukleotida adenozin-3-fosfata (ATP) (Bottiglieri, 2002).




**Slika 5.** Molekulska struktura *(S)*-adenozil-L-metionina (Lieber i Packer, 2002).

Biosinteza SAMe se odvija u citoplazmi mikrobnih stanica ili tkivu organizama (Grillo i Colombatto, 2008). SAMe sadrži visokoenergetski sumporni ion koji nukleofilnim napadom aktivira susjedne atome ugljika i tako omogućuje sudjelovanje SAMe u reakcijama transmetilacije, transsulfuracije i aminopropilacije (slika 6) (Lu, 2000) te je, nakon ATP, slijedeći najupotrebljivaniji supstrat (Cantoni, 1975). Molekula SAMe postoji u dvije stereoizomerne konformacije, *(S,S)*-SAMe i *(R,S)*-SAMe, sa kiralnim centrom na sumpornom ionu koji određuje biološku aktivnost. *(S,S)*-SAMe je biološki aktivni oblik, dok je *(R,S)*-SAMe potencijalni inhibitor metiltrasferaze (Chiang i sur.,1996). U nativnoj konformaciji SAMe je iznimno labilan i brzo se razgrađuje, no njegove soli su stabilne i omogućavaju farmakološku primjenu SAMe (Bottiglieri, 2002).




**Slika 6.** Metabolizam *(S)*-adenozil-L-metionina u ljudskom organizmu (Martinez-López i sur., 2008).

### 2.2.1. Biološki značaj SAMe za ljudski organizam

Glavnu ulogu u održavanju homeostaze SAMe u organizmu ima jetra, jer se u njoj odvija više od 85% reakcija metilacije i više od 50% dnevne količine metionina prevodi u SAMe, a enzim odgovoran za biosintezu SAMe iz metionina i ATP je metionin adenoziltransferaza (MAT) (Mudd i Poole, 1975). SAMe je u stanici regulacijska komponenta metabolizma metionina, prekursor biosinteze poliamina potrebnih za normalan rast stanica te prekursor glutationa (GSH), jednog od najvažnijih staničnih antioksidansa (Lauruengtana i sur., 2010). U standardnim uvjetima, većina nastalog SAMe koristi se u reakcijama transmetilacije dijelovanjem enzima glicin-N-metil transferaze (GNMT) pri čemu nastaje *S*-adenozil-homocistein (SAH) koji se djelovanjem SAH hidrolaze hidrolizira u homocistein i adenozin (slika 6). Ova reakcija je vrlo važna za metabolizam SAMe jer visoka koncentracija SAH u stanici inhibira SAMe-ovisne rekacije metilacije (Anstee i Day, 2012). Glavni

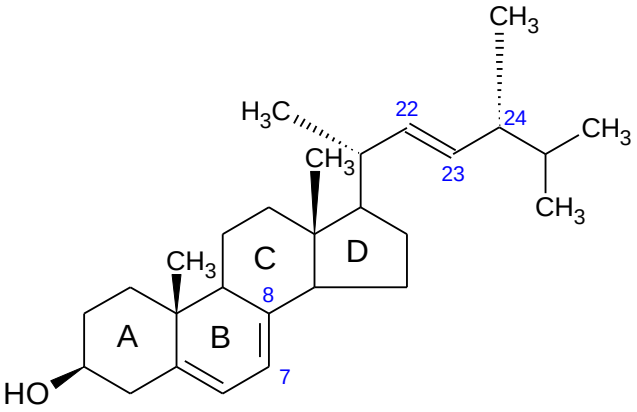
nedostatak SAMe je nestabilnost pri visokim temperaturama, neutralnoj i alkalnoj pH-vrijednosti te visokim razinama vlažnosti (Izu i sur., 2006), no s obzirom na staničnu ulogu, pokazao se kao koristan farmaceutik i nutraceutik u liječenju depresije, osteoartritisa i bolesti jetre (Bottiglieri, 2002).

### 2.2.2. Mikrobiološka proizvodnja SAMe pomoću kvasaca

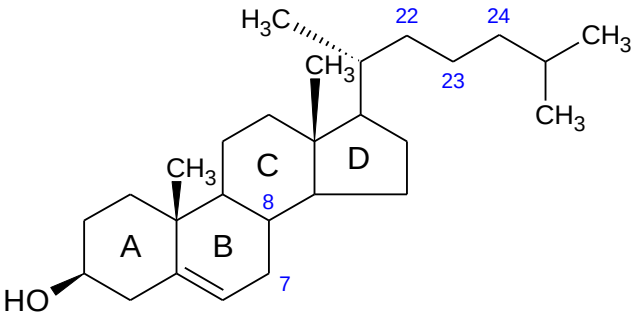
Proizvodnja SAMe može se odvijati kemijskom sintezom, enzimskom sintezom i mikrobnom fermentacijom, no zbog niske produktivnosti te problema prilikom izolacije i pročišćavanja proizvoda dobivenog kemijskom i enzimskom sintezom, najčešće se proizvodi mikrobnom fermentacijom. SAMe se nakon fermentacije ekstrahira iz kvaščeve biomase uzgojene u hranjivom mediju koji sadrži prekursor L-metionin (L-Met) (Cao i sur., 2012). SAMe se u kvascima sintetizira iz L-metionina i ATP djelovanjem SAM sintetaze koju mogu inhibirati analozi metionina (etionin i selenometionin), no inhibicija se može spriječiti prisustvom modificirane SAM sintetaze *in vivo* (Barra i sur., 1996). Sake kvasci (vrste *Saccharomyces*) akumuliraju veću količinu SAMe od drugih vrsta kvasaca (Cao i sur., 2012), a sojevi *S. cerevisiae*, zbog GRAS statusa, potencijalni su sojevi za unapređenje proizvodnje SAMe. Produktivnost proizvodnih sojeva moguće je povećati ciljanim mutacijama, metodama genetičkog inženjerstva tako da se poveća akivnost SAM sintetaze, inaktivira gen odgovoran za koverziju SAMe i L-Met u cistein te inhibicijom povratnom spregom reakcije katalizirane metilentetrahidrofolat reduktazom (MTHFR) (Chu i sur., 2013). Osim *S. cerevisiae*, za proizvodnju SAMe istraženi su i kvasci *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus* (Mincheva i sur., 2002), *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* (Yu i Shen., 2012) te *Candida utilis*. Kvasac *C. utilis* je specifičan po tome što skladišti SAMe u velikoj količini i ne troši ga bez obzira na nedostatak hranjiva u mediju za uzgoj (Svihla i Schlenk, 1959). Izazovi u proizvodnji SAMe pomoću kvasaca su prijenos procesa u veće mjerilo te optimizacija hranjivog medija za proizvodnju SAMe. Nastoji se zamjeniti skupe izvore ugljika i energije (jednostavne šećere) jeftinijim kompleksnim sirovinama (škrob, lignocelulozne sirovine) kako bi se snizila cijena procesa, a samim time i konačnog proizvoda. Zbog toga se pozornost usmjerava na kvasce sa amilolitičkom aktivnošću i sposobnošću razgradnje lignoceluloznog kompleksa te mogućnošću rasta na proizvodima njegove razgradnje. Jedan od potencijalnih proizvodnih mikroorganizama SAMe sposoban rasti na lignoceluloznim sirovinama je *Scheffersomyces stipitis*.

### 2.2.3. Povezanost SAMe-ovisne metilacije i biosinteze lipidnih komponenata stanice kvasca

Lipidi su esencijalne komponente eukariotskih mikroorganizama. To su masne kiseline, steroli, fosfolipidi i sfingolipidi, a u stanicama kvasca većina lipidnih komponenata značajna je zbog utjecaja na karakteristike staničnih membrana i membrana organela koje ih sadrže. Masne kiseline su važan izvor energije te su rezervni izvori ugljika koji se nakupljaju u stanici tijekom stacionarne faze rasta stanica u obliku triacilglicerida i estera sterola (Leber i sur., 1994). Steroli su komponente staničnih membrana kvasaca koje utječu na biološke funkcije membrana te zajedno s masnim kiselinama utječu na propusnost membrana, a sfingolipidi aktivno sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa, starenju stanica, apoptozi i odgovoru na stres (Dickson i Lester, 2002). SAMe sudjeluje u putevima biosinteze sterola i fosfolipida kao donor metilne skupine.




a) Ergosterol

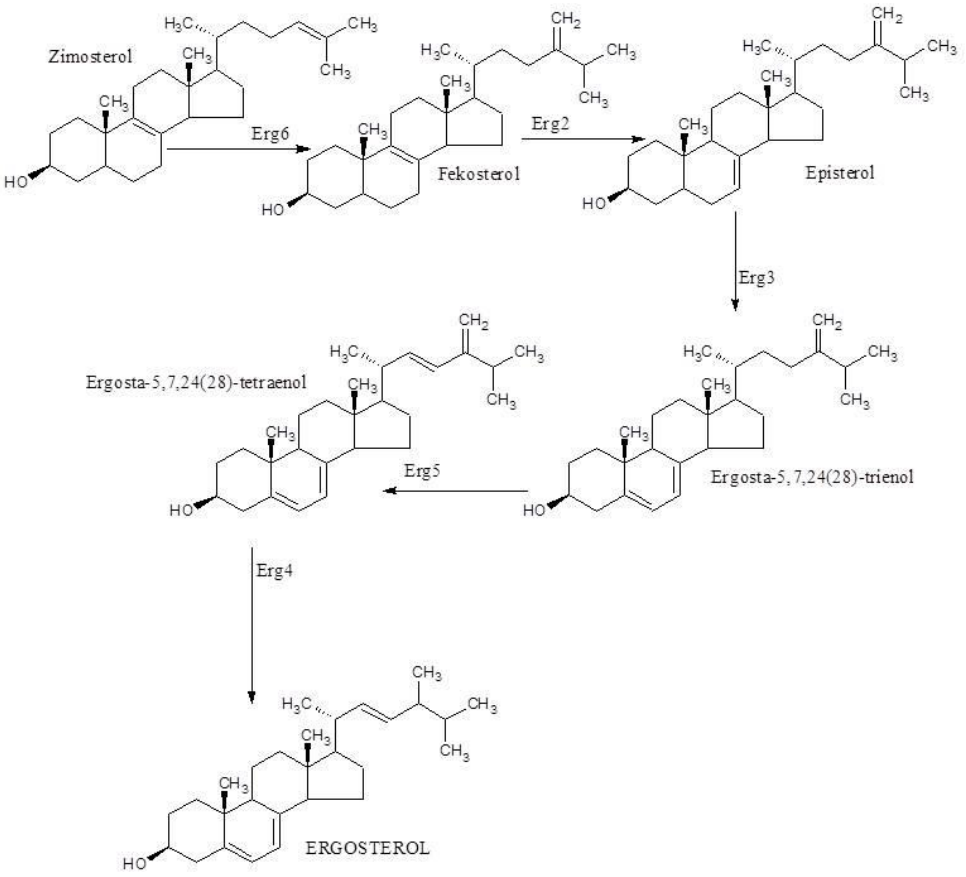



b) Kolesterol

**Slika 7.** Strukturni prikaz konformacija ergosterola i kolesterola.

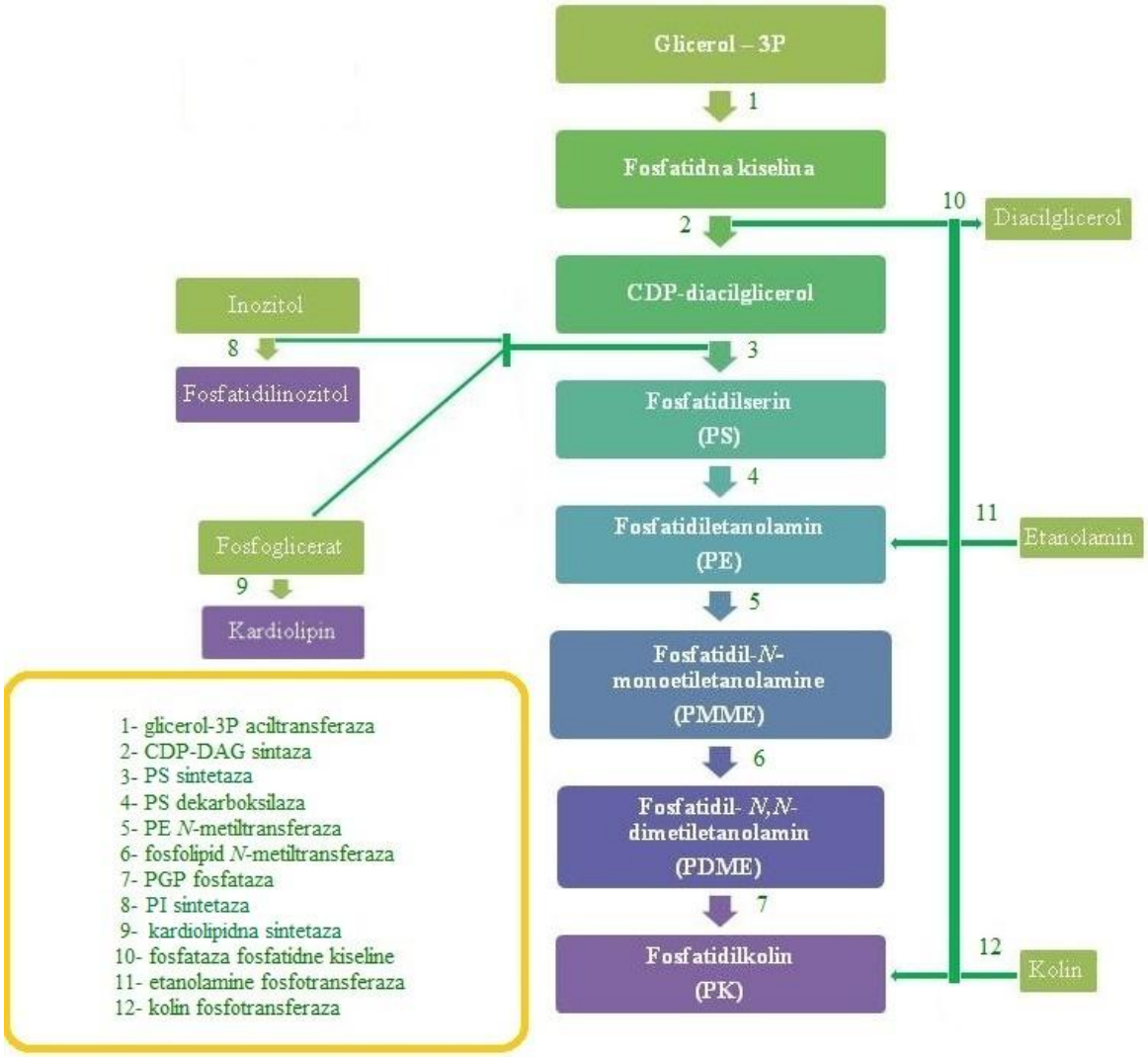
Steroli se uglavnom sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu (ER) te se koncentriraju prilikom transporta od ER preko Golgijevog tijela do plazmine membrane koja, za razliku od drugim membrana u eukariotskim stanicama, ima najveći udio slobodnih sterola (Pichler i Riezman, 2004). Kako bi se održala homeostaza sterola u stanici i spriječilo toksično nakupljanje slobodnih sterola na membrani ER, potrebna je stroga kontrola ravnoteže u biosintezi, transportu, esterifikaciji slobodnih sterola i hidrolizi estera sterola (Feng i sur., 2003). Egosterol je najzastupljeniji sterol u kvascima koji se od sterola sisavaca (kolesterola) razlikuje po tri strukturne modifikacije, dvije u bočnom lancu i jednoj u B prstenu, odnosno ergosterol ima dodatne dvostruke veze između 7. i 8., te 22. i 23. C-atoma te metilnu skupinu na 24. C-atomu (Lees i Bard, 2004) (slika 7).

Put biosinteze sterola energetski je zahtjevan proces koji se sastoji od više od 20 reakcija u kojima se acetil-CoA prevodi u ergosterol, pri čemu dio puta karakterističan za sintezu ergosterola u stanicama kvasca započinje kondenzacijom dvije molekule farnezil-pirofosfata u skvalen. Iako je većina enzima u putu biosinteze esencijalna za život stanice, enzimi koji kataliziraju poslijednjih pet reakcija biosintetskog puta ergosterola nisu esencijalni, već kataliziraju strukturne modifikacije osnovnog sterolnog kostura s ciljem sinteze ergosterola (Eisenkolb i sur., 2002). Prva karakteristična reakcija je metilacija zimosterola u fekosterol djelovanjem C-24 sterol metiltransferaze (Erg6p) pri čemu je donor metilne skupine SAMe, zatim slijede reakcije izomerizacije fekosterola u episterol (Erg2), stvaranja dvostrukih veza djelovanjem C-5 i C-22 desaturaza (Erg3, Erg5) te reakcije redukcije (Erg4) (slika 8).




**Slika 8.** Karakteristične reakcije biosinteze ergosterola (prilagođeno prema Dupont i sur., 2012).

Fosfolipidi su važan čimbenik svih membrana, građeni su od hidrofilne glave (glicerol + fosfatna skupina + organska skupina) i hidrofobnih repova (dvije masne kiseline). Na fosfatnu skupinu mogu biti vezane različite skupine poput kolina, etanolamina, serina, mio-inozitola i glicerola pa prema tome u stanici imamo različite vrste fosfolipida. U stanicama kvasaca najzastupljeniji su: fosfatidilkolin (PK), fosfatildiletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI) i fosfatidilserin (PS) (Carman i Henry, 1989).




**Slika 9.** Shematski prikaz biosinteze fosfolipida (prilagođeno prema Van der Rest i sur., 1995).

Biosinteza fosfolipida u stanicama kvasaca uglavnom se odvija u endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijima, a kao donor metilne skupine u reakcijama kataliziranim metiltransferazama je SAMe (slika 9).

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizmi prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovoga rada korišteni su divlji soj kvasca *Pichia stipitis* CBS 5776 (*Scheffersomyces stipitis*), uzet iz Njemačke zbirke mikroorganizama i staničnih kultura (DSMZ; *njem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) i čuvan u zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te selekcionirani soj *S. stipitis* M12 rezistentan na nistatin. Soj M12 dobiven je primjenom UV svjetla doze 160 $Jm^{-2}$ i izoliran je s podloge s 15 $\mu gmL^{-1}$ nistatina.

### 3.1.2. Kemikalije

- D(+)-glukoza (bezvodna) p.a., Kemika, Hrvatska
- glicerol-redestiliran, Gram-mol, Hrvatska
- pepton, Merck, Njemačka
- kvaščev ekstrakt, Merck, Njemačka
- amonijev sulfat ($(NH_4)_2SO4$) p.a., Kemika, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat ($KH_2PO_4$) p.a., Kemika, Hrvatska
- dikalijev hidrogenfosfat ($K_2HPO_4$) p.a., Kemika, Hrvatska
- magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \times 7H_20$) p.a., Kemika, Hrvatska
- D,L-metionin, Acros organics, Belgija
- sulfatna kiselina ($H_2SO_4$) p.a., Kemika, Hrvatska
- 96 % etanol ($C_2H_5OH$), Gram-mol, Hrvatska
- agar, Biolife, Italija
- 99 % mio-inozitol, Sigma-Aldrich, SAD
- 98 % kolin klorid, Sigma-Aldrich, SAD
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- glukoza-PAP reagens, Greiner, Njemačka
- glukoza standard, Greiner, Njemačka
- natrijev hidroksid (NaOH) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- kalij-heksacijanoferat (II)-trihidrat ($K_4(Fe(CN)_6)x3H_2O$) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- cinkov sulfat heptahidrat ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) p.a., *Kemika*, Hrvatska

- sulfatna kiselina ($H_2SO4$ ) p.a., Kemika, Hrvatska
- redestilirana voda, PBF, Hrvatska
- etil-acetat, Kemika, Hrvatska
- amonijev formijat, HPLC čistoće, Sigma-Aldrich, SAD
- mravlja kiselina, J.T.Baker, SAD
- metanol, HPLC čistoće, Merck-Lichrosolov, SAD
- standard SAMe-klorid, Sigma-Aldrich, SAD
- kalijev hidroksid (KOH) p.a., Kemika, Hrvatska
- apsolutni etanol, Gram-mol, Hrvatska
- n-heptan, J.T.Baker, SAD
- natrijev hidrogenfosfat ($Na_2HPO_4$) p.a., Kemika, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat ($KH_2PO_4$) p.a., Kemika, Hrvatska
- agaroza, Sigma-Aldrich, SAD
- amonijev acetat p.a., Kemika, Hrvatska

### 3.1.3. Laboratorijska oprema

#### *3.1.3.1. Laboratorijski pribor*

- Erlenmayerove tikvice 500-1000 mL
- filter papir, veličina pore 0,45mm
- filteri, veličina pore 0,45 μm
- filter za zrak, veličina pore 0,20 μm
- staklene i plastične menzure
- staklene i plastične čaše
- staklene epruvete od 10-15 mL
- staklene pipete različitih volumena
- staklene odmjerne tikvice različitih volumena
- plastične epruvete od 15 mL
- mikropipete, 0,2-5000 μL, *Eppendorf*, Njemačka
- kivete za spektrofotometar, *Eppendorf*, Njemačka
- Varian MetaCarb 67H kolona, *Agilent*, SAD
- ChromSep HPLC Column SS (250 x 4,6 mm); guard column IonoSpher 5C, *Agilent*, SAD

#### *3.1.3.2. Uređaji i instrumenti*

- autoklav, *Istrumentaria,* Hrvatska
- laminar s UV lampom (30 W), *Klimaoprema*, Hrvatska
- termostat, *Istrumentaria*, Hrvatska
- analitička vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- tehnička vaga, *Kern*, Njemačka
- rotacijska tresilica Certomat IS, *Braun*,Velika Britanija
- laboratorijska centrifuga Rotofix 32, *Hettich*, Njemačka
- vrtložna mješalica, Reax top, *Heidolph*, Njemačka
- sušionik ST-01/02, *Istrumentaria*, Hrvatska
- pH metar, *Schott*, Njemačka
- UV-VIS spektrofotometar UNICAM, *HEλIOS β*, Velika Britanija
- tekućinski kromatograf Prostar 230 uz uporabu UV/VIS Photo Diode Array detektora (Varian Prostar 330) i RI detektora, *Varian*, SAD
- laboratorijski bioreaktor 5 L Biostar A, *B.Braun Biotech International-Santorius group*, Njemačka

### 3.1.4. Hranjive podloge i otopine

#### *3.1.4.1. YPD podloga za čuvanje sojeva kvasca S. stipitis*

Za čuvanje soja M12 i divljeg soja kvasca *P. stipitis* korištena je YPD podloga (Li i sur., 2007) čiji je sastav prikazan u tablici 5. Nakon otapanja osnovnih sastojaka u vodi, podloga je sterilizirana 15 minuta pri temperaturi od 121˚C.

**Tablica 5**. Kemijski sastav YPD podloge (Li i sur., 2007).

| **Sastojak** | **γ ($gL^{-1}$)** |
|---|---|
| glukoza | 20 |
| pepton | 20 |
| kvaščev ekstrakt | 10 |
| destilirana voda | 1L |

Za pripravu krute YPD podloge potrebno je dodati agar prema preporuci proizvođača.

### *3.1.4.2. O-podloga za umnažanje sojeva kvasca S. stipitis i proizvodnju S-adenozil-L-metionina*

Za umnažanje biomase sojeva kvasca S. *stipitis* i proizvodnju SAMe korištena je O-podloga bez dodatka i uz dodatak protektivnih spojeva (tablica 6). Osnovni sastav O-podloge opisali su Shiozaki i sur. (1989). Nakon priprave podloga je sterilizirana 15 minuta pri temperaturi od 121˚C.

**Tablica 6.** Kemijski sastav O-podloge.

| **Sastojak** | **γ ($gL^{-1}$)** |
|---|---|
| glukoza | 50 |
| pepton | 10 |
| kvaščev ekstrakt | 5 |
| amonij sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) | 5 |
| kalijev dihidrogen fosfat ($KH_2PO_4$) | 4 |
| dikalijev hidrogen fosfat ($K_2HPO_4$) | 2 |
| magnezijev sulfat ($MgSO_4 \times 7H_20$) | 0,5 |
| D,L-metionin | 6 |
| destilirana voda | 1L |

Protektivni spojevi zajedno s pripadajućim udjelom navedeni su u tablici 7. U tablici 8. prikazan je sastav modificirane O-podloge s glicerolom kao osnovnim izvorom ugljika.

**Tablica 7.** Protektivni spojevi s pripadajućim udjelom korišteni kao dodatak u O-podlogu.

| **Dodatak** | **Količina** |
|---|---|
| glicerol | 3 % (v/v) |
| kolin klorid | 0,143 % |
| mio-inozitol | 0,0025 %; 0,005 %; 0,5 % |

**Tablica 8**. Sastav modificirane O-podloge gdje je osnovni izvor ugljika 5 % (v/v) glicerol.

| Sastojak | $\gamma(gL^{-1})$ |
|---|---|
| glicerol | 63 |
| pepton | 10 |
| kvaščev ekstrakt | 5 |
| amonijev sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) | 5 |
| kalijev dihidrogenfosfat ($KH_2PO_4$) | 4 |
| kalijev hidrogenfosfat ($K_2HPO_4$) | 2 |
| magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4x7H_2O$) | 0,5 |
| D,L-metionin | 6,0 |
| destilirana voda | 1 L |

D,L-metionin potreban za pulsni dodatak u laboratorijski bioreaktor je steriliziran u obliku praha.

### 3.1.5. Puferi i otopine

**1 M $H_2SO_4$**

Otopina je pripremljena dodatkom 5,64 mL $H_2SO_4$ (> 95 %) u 50 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 100 mL. Volumen je nadopunjen destiliranom vodom.

**0,25 M amonij formijatni pufer**

Otopina je pripremljena otapanjem 15,75 g amonijevog formijata u 1L redestilirane vode. pH-vrijednost je korigirana pomoću mravlje kiseline (minimalne koncentracije 98 %) na 4,0±0,1.

**25 % alkoholni KOH**

Otopina je pripremljena otapanjem 25 g KOH u 35 ml destilirane vode te je volumen nadopunjen apsolutnim alkoholom do 100 mL.

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Čuvanje i održavanje sojeva kvasca *S. stipitis*

Radne kulture divljeg soja kvasca *S. stipitis* i soja M12 dobivenog primjenom UV svjetla i rezistentnog na nistatin čuvane su na kosom agaru (YPD) u hladnjaku na temperaturi +4 °C. Svakih 14 dana kvasci su precijepljeni na svježe pripremljeni kosi agar. Nakon inkubacije na temperaturi od 30 °C tijekom 48 sati ponovo su čuvani u hladnjaku pri +4 °C. Trajne kulture čuvane su u 10 % glicerolu na -70 °C.

### 3.2.2. Uzgoj inokuluma

Uzgoj inokuluma divljeg soja kvasca *S. stipitis* i soja M12 rezistentnog na nistatin proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Korištena je O-podloga volumena 100 mL. pH-vrijednost podloge je korigirana s 20 %-tnom sulfatnom kiselinom na pH-vrijednost 6. Podloga je pomoću sterilne mikrobiološke ušice nacijepljena stanicama poraslim na kosom agaru. Uzgoj inokuluma trajao je 48 sati pri 30 °C i 130 $omin^{-1}$ na laboratorijskoj tresilici.

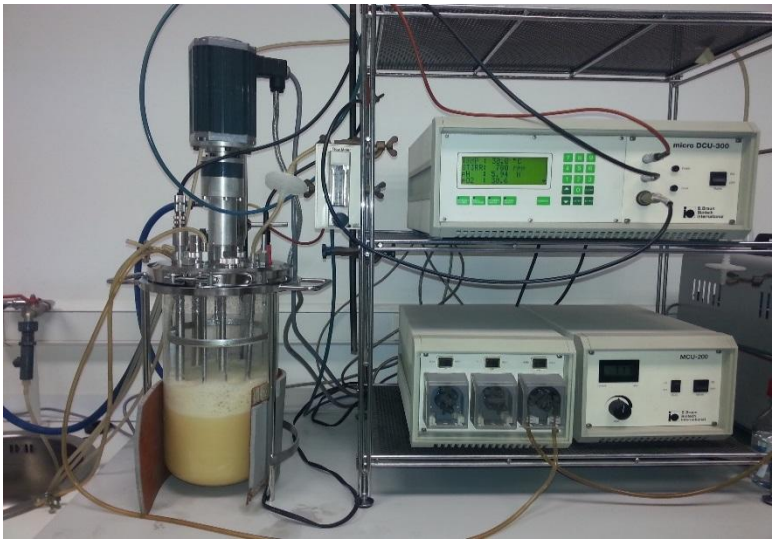
### 3.2.3. Uzgoj kvaščeve biomase u svrhu proizvodnje SAMe

Uzgoj biomase divljeg soja kvasca *S. stipitis* i soja M12 rezistentnog na nistatin provedeno je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL u različitim volumenima O-podloge, O-podloge s dodatkom protektivnih spojeva te modificirane O-podloge (Tablica 6.- 8.). pH-vrijednost svih podloga korigirana je s 20 %-tnom sumpornom kiselinom na pH-vrijednost 6. Sterilne podloge su inokulirane s 10 % (v/v) suspenzije inokuluma divljeg soja kvasca *S. stipitis* odnosno soja M12, prethodno uzgojenih u istoj podlozi. Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici pri 30 °C pri 200 $omin^{-1}$ tijekom 48 sati. Također je uzgoj biomase proveden u laboratorijskom bioreaktoru ukupnog volumena 5 L u 3 L O-podloge s dodatkom 3 % (v/v) glicerola odnosno u modificiranoj O-podlozi pri 30 °C i pH-vrijednosti 6.

### 3.2.4. Praćenje brzine rasta i potrošnje osnovnog izvora ugljika tijekom uzgoja soja M12 i divljeg soja kvasca *S. stipitis*

Uzgoj kvaščeve biomase proveden je na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru od 5 L (Slika 10.). Tijekom uzgoja uzimani su uzorci za analizu. Prirast biomase

praćen je gravimetrijski, a potrošnja supstrata spektrofotometrijski (glukoza) i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) (glicerol).




**Slika 10.** Uzgoj soja M12 kvasca *S. stipitis* u laboratorijskom bioreaktoru.

### 3.2.5. Priprema biomase za određivanje sadržaja SAMe u biomasi soja M12 i divljeg soja kvasca *S. stipitis*

Tijekom uzgoja kvaščeve biomase na laboratorijskoj tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru uzimani su uzorci u određenim satima u svrhu određivanja sadržaja SAMe u biomasi ispitivanih sojeva. Cjelokupna kvaščeva suspenzija uzgojena u tikvici (100 mL) odnosno 100 mL kvaščeve suspenzije iz bioreaktora je centrifugirano 10 min pri 4000 $omin^{-1}$, a zatim je talog biomase ispran destiliranom vodom i ponovno centrifugiran. Uzorci su spremljeni na -20 °C kao 5 mL kvaščeve suspenzije do HPLC analize.

## 3.3. Analitičke metode

### 3.3.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase

Koncentracija kvaščeve biomase tijekom uzgoja sojeva u O-podlozi, O-podlozi s dodatkom protektivnog spoja i modificiranoj O-podlozi određivana je gravimetrijski. Uzorci (10 mL) komine uzimani su tijekom uzgoja kvaščeve biomase te centrifugirani pri 4000 $omin^{-1}$ kroz 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je dekantiran, a kivete su sušene u

sušioniku pri 105 °C do konstantne mase i vagane na analitičkoj vagi. Koncentracija biomase u komini izračunata je iz formule:

$$X = (a - b) * 100 \qquad [g_{s.tv.}L^{-1}] \qquad (1)$$

a – masa pune kivete (g)
b – masa prazne kivete (g)

Prirast biomase određen je iz razlike koncentracije biomase na kraju ($X_t$) i na početku uzgoja ($X_0$):

$$\Delta X = X_t - X_0 \qquad [g_{s.tv.}L^{-1}] \qquad (2)$$

#### *3.3.1.1. Proračun pokazatelja rasta*

Na osnovu određene koncentracije biomase i koncentracije supstrata proračunate su vrijednosti specifične brzine rasta (μ) i koeficijenta konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) prema formulama:

$$\mu = \frac{dX}{dt} * \frac{1}{X} \qquad [h^{-1}] \qquad (3)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{X_{n+1} - X_{n-1}}{t_{n+1} - t_{n-1}} \qquad [gL^{-1}h^{-1}] \qquad (4)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \qquad [gXg^{-1}S] \qquad (5)$$

X – koncentracija biomase [$gL^{-1}$]
S – koncentracija supstrata [$gL^{-1}$]
t – vrijeme [h]

### 3.3.2. Određivanje suhe tvari kvaščeve biomase u kvaščevoj suspenziji namijenjenoj određivanju SAMe

Suha tvar u kvaščevoj suspenziji određena je prema izrazu:

$$\%\ \text{vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100 \qquad (6)$$

$m_1$ – masa kvaščeve biomase prije sušenja (vlažna biomasa)

$m_2$ – masa kvaščeve biomase nakon sušenja (suha biomasa)

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad (7)$$

### 3.3.3. Određivanje koncentracije glukoze

Glukoza je određivana spektrofotometrijski, prema glukoza-PAP metodi (Trinder, 1969). Metoda se temelji na oksidaciji glukoze u glukonsku kiselinu i peroksid pomoću glukoza oksidaze i reakciji peroksida, 4-hidroksibenzojeve kiseline i 4-aminoantipirina pomoću peroksidaze, pri čemu nastaju kinonimin i voda. U mikrokivete je otpipetiran 1 mL reagensa i 10 µL uzorka odnosno standarda. Uzorci su inkubirani 10 min pri 37 °C, nakon čega je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 500 nm. Koncentracija glukoze izračunata je prema formuli:

$$\gamma(\text{glukoza}) = \frac{Au}{Ast} * 5{,}56 * 0{,}18 * r \ [\text{gL}^{-1}] \quad (8)$$

Au – apsorbancija uzorka
Ast – apsorbancija standarda
r – razrjeđenje (jer je metoda linearna do 5 $\text{gL}^{-1}$)

### 3.3.4. Određivanje koncentracije glicerola

Za određivanje glicerola u svim ispitivanim uzorcima korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), uz RI-detektor prema metodi koju su opisali Lefebvre i sur. (2002), korištenjem vanjskog standarda.

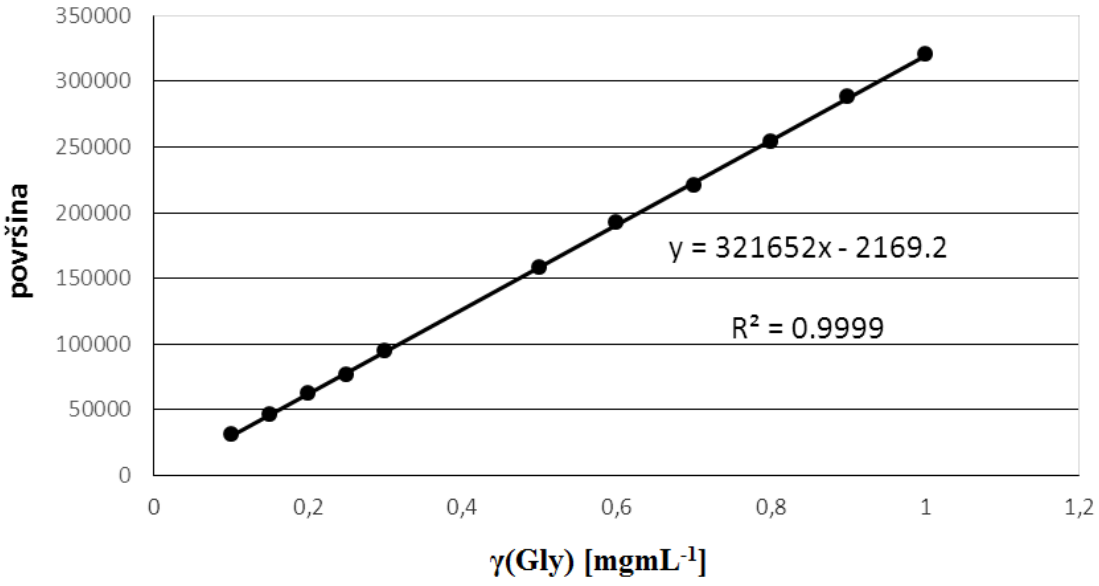
#### *3.3.4.1. Priprema uzorka za HPLC- analizu*

Ovisno o očekivanoj koncentraciji glicerola, 0,5-5 mL supernatanta dobivenog centrifugiranjem kvaščeve suspenzije je pomiješano s oko 30 mL destilirane vode u

odmjernoj tikvici od 50 mL (razrjeđenja od 10 do 100 puta). U odmjernu tikvicu je zatim dodano 2,5 mL otopine Carrez I (kalij-heksacijanoferat trihidrat, $\gamma$=36 $gL^{-1}$) i 2,5 mL otopine Carrez II (cinkov sulfat heptahidrat, $\gamma$=300 $gL^{-1}$) da bi se istaložili proteini. Slijedila je neutralizacija uzorka s 2 M NaOH do pH-vrijednosti 8,0 ± 0,5. Destiliranom vodom se dopunio volumen tikvice do 50 mL, a onda se cijeli sadržaj profiltrirao kroz filter papir veličine pora 0,45 mm te kroz filter veličine pora 0,45 μm.

### *3.3.4.2. Priprema otopina standarda*

U odmjernoj tikvici od 100 mL je najprije pripremljena otopina standarda glicerola koncentracije 1 $gL^{-1}$ iz koje su zatim napravljene ostale standardne otopine nižih koncentracija. Iz ovisnosti površine ispod pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtan je baždarni pravac i izračunata jednadžba pravca (slika 11).




**Slika 11.** Baždarni pravac standarda glicerola.

### *3.3.4.3. Kromatografski uvjeti analize*

Određivanje glicerola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) provedeno je pri uvjetima navedenim u tablici 9.

**Tablica 9.** Parametri analize glicerola HPLC metodom.

| | |
|---|---|
| **uređaj** | Varian Prostar 230 |
| **kolona** | MetaCarb 67H, 300 x 6,5 mm |
| **temperatura kolone** | 60 ˚C |
| **detektor** | RI |
| **mobilna faza** | 5 mM $H_2SO_4$ |
| **protok** | 0,5 $mLmin^{-1}$ |
| **eluiranje** | izokratno |
| **injektirani volumen** | 20 µL |
| **vrijeme eluiranja** | 20 min |
| **vrijeme zadržavanja** | 11, 4 min |

Mobilna faza (5 mM $H_2SO_4$) je pripremljena dodavanjem 276,76 µL koncentrirane $H_2SO_4$ u 500 mL redestilirane vode u odmjernoj tikvici od 1L. Volumen je nadopunjen redestiliranom vodom do oznake.

#### *3.3.4.4. Identifikacija i kvantifikacija*

Identifikacija glicerola u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja ($R_t$) razdvojenog pika s vremenom zadržavanja standarda (11,4 min).

Kvantifikacija je provedena tako da se površina pika glicerola svakog uzorka uvrstila u jednadžbu pravca dobivenu iz baždarnog dijagrama standarda glicerola (Slika 11.) (uz korekciju zbog razrjeđenja):

$$\gamma(\text{glicerol}) = \frac{A(glicerol) + 2169{,}2}{321652} * r \quad [gL^{-1}] \qquad (9)$$

r – razrjeđenje

### 3.3.5. Određivanje koncentracije *S*-adenozil-L-metionina

Za određivanje SAMe u svim ispitivanim uzorcima korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), uz UV-Diode Array detekciju (Valko i sur., 1993).

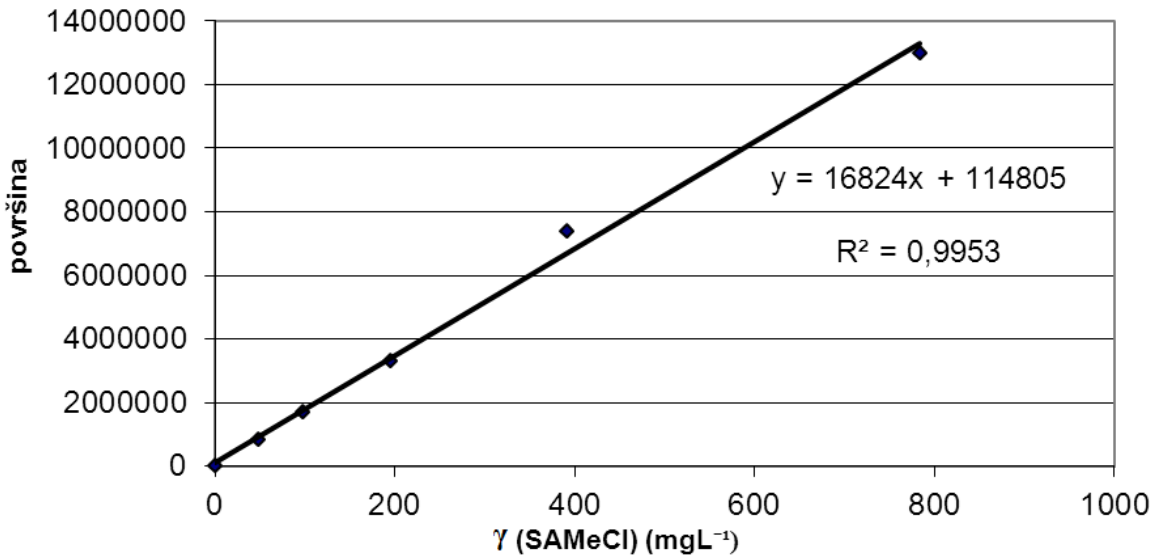
### *3.3.5.1. Priprema uzorka za HPLC-analizu*

SAMe je unutarstanični proizvod pa je za njegovo određivanje prvo potrebno lizirati stanice kvasca. U graduiranu kivetu od 15 mL dodano je 2 mL uzorka kvaščeve suspenzije, 0,25 mL etil acetata i 1 mL 1 M $H_2SO_4$. Uzorci su miješani na vrtložnoj mješalici 30 minuta. Lizirani uzorci dopunjeni su destiliranom vodom do 10 mL, promiješani na vrtložnoj mješalici 4 min i centrifugirani 10 minuta pri 4000 $omin^{-1}$. Supernatanti su dekantirani u novu kivetu (volumen supernatanta), razrijeđeni s destiliranom vodom u omjeru 1:1, a nakon toga su profiltrirani kroz filter veličine pora 0,45 μm. Tako pripremljenim uzorcima određena je koncentracija SAMe HPLC analizom.

### *3.3.5.2. Priprema otopina standarda*

Standard *S*-(5′-adenozil)-L-metionin klorid (≥ 80 %) otopljen je pomoću mobilne faze. Mobilna faza je smjesa amonij formijatnog pufera (pH = 4,0±0,1) i metanola u omjeru 9:1 (v/v).

Iz ovisnosti površine ispod pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtan je baždarni pravac i izračunata jednadžba pravca:




**Slika 12.** Baždarni pravac standarda *S*-(5′-adenozil)-L-metionin klorid (SAMeCl).

### *3.3.5.3. Kromatografski uvjeti analize*

Određivanje SAMe primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) provedeno je uz uvjete navedene u tablici 10.

**Tablica 10.** Parametri analize SAMe HPLC metodom.

| | |
|---|---|
| **uređaj** | Varian Prostar 230 |
| **kolona** | ChromSep Column SS 250 x 4,6 mm; predkolona: ChromSep guard column IonoSpher 5C |
| **temperatura kolone** | 35 ˚C |
| **detektor** | UV-VIS diode array (valna duljina: signal A 260 nm, BW 4 nm; referentni signal 550 nm, BW 100 nm) |
| **protok** | 1,0 $mLmin^{-1}$ |
| **eluiranje** | izokratno |
| **temperatura otopine za injektiranje** | sobna |
| **injektirani volumen** | 20 µL |
| **vrijeme eluiranja** | 50 min |
| **vrijeme zadržavanja** | 9,04 min |

### *3.3.5.4. Identifikacija i kvantifikacija SAMe*

Identifikacija SAMe u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja ($R_t$) razdvojenog pika s vremenom zadržavanja standarda (9,04 min).

Kvantifikacija je provedena tako da se površina pika SAMe svakog uzorka uvrstila u jednadžbu pravca dobivenu iz baždarnog dijagrama standarda SAMe klorida (Slika 11.):

$$\gamma(\text{SAMe}) = \frac{A(SAMe) - 114805}{16824} \qquad [mg_{SAMe}L^{-1}] \qquad (10)$$

Uzimajući u obzir dobiveni volumen supernatanta tijekom priprave uzorka za HPLC analizu i razrjeđenja uzorka:

$$m(\text{SAMe}) = \gamma(\text{SAMe}) * V(\text{supernatanta}) * 2 \quad [mg_{SAMe}] \qquad (11)$$

Zbog uzimanja 2 mL kvaščeve suspenzije za liziranje stanica kvasca, masa SAMe se korigira:

$$m\,(\text{SAMe})\text{u kvaščevoj suspenziji} = m\,(\text{SAMe}) * \frac{5mL}{2mL} \quad [mg_{SAMe}] \qquad (12)$$

$$\text{SAMe u kvaščevoj biomasi} = \frac{m(SAMe)}{m(5mL) * \%s.tv.} * 100 \quad [mg_{SAMe}g^{-1}{}_{s.tv.}\ \text{kvasca}] \qquad (13)$$

### 3.3.6. Određivanje koncentracije ergosterola u biomasi kvasca (*eng. Sterol quantitation method*)

Koncentracija ergosterola u biomasi kvasca određivana je spektrofotometrijski.

U graduiranu kivetu pipetom je dodano 1 mL kvaščeve suspenzije i 3 mL 25 % alkoholnog KOH te je sadržaj miješan na vortex-u 1 minutu. Uzorci su zatim termostatirati na 85 ˚C u vodenoj kupelji 1 sat. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu dodano je 1 mL destilirane vode i 3 mL n-heptana te je sadržaj miješan na vortex-u 3 minute. Nakon stabilizacije 30 minuta na sobnoj temperaturi izdvojen je sloj n-heptana s ekstrahiranim ergosterolom u tamne bočice i čuvan na -20 ˚C do analize.

Na valnoj duljini od 281,5 nm izmjerena je apsorbancija uzorka koja je proporcionalna koncentraciji ergosterola i 24,28-dihidroksiergosterola.

Na valnoj duljini od 230 nm izmjerena je apsorbancija uzorka koja je proporcijalna koncentraciji 24,28-dihidroksiergosterola. Koncentracija ergosterola određuje se iz razlike apsorbanci izmjerenih na 281,5 i 230 nm prema formulama (Arthington-Skaggs i sur., 1999):

$$\%\ \text{ergosterola u vlažnoj biomasi} = \left(\frac{A_{281,5}}{290 * m_{uzorka}} * r\right) - \left(\frac{A_{230}}{518 * m_{uzorka}} * r\right) \quad (14)$$

$A_{281,5}$ - apsorbanca izmjerena na 281,5 nm

$A_{230}$ – apsorbanca izmjerena na 230 nm

$m_{uzorka}$ – masa 1 mL kvaščeve suspenzije

r – razrjeđenje

Linearnost: od 0,01 do 0,03 $mgmL^{-1}$ ergosterola odnosno apsorbanca od 0,353-0,893 pri 281,5 nm.

$$\%\ \text{ergosterola u suhoj biomasi} = \left(\%erg_{vlaž} * \frac{100}{\%\ s.tv.}\right) \quad (15)$$

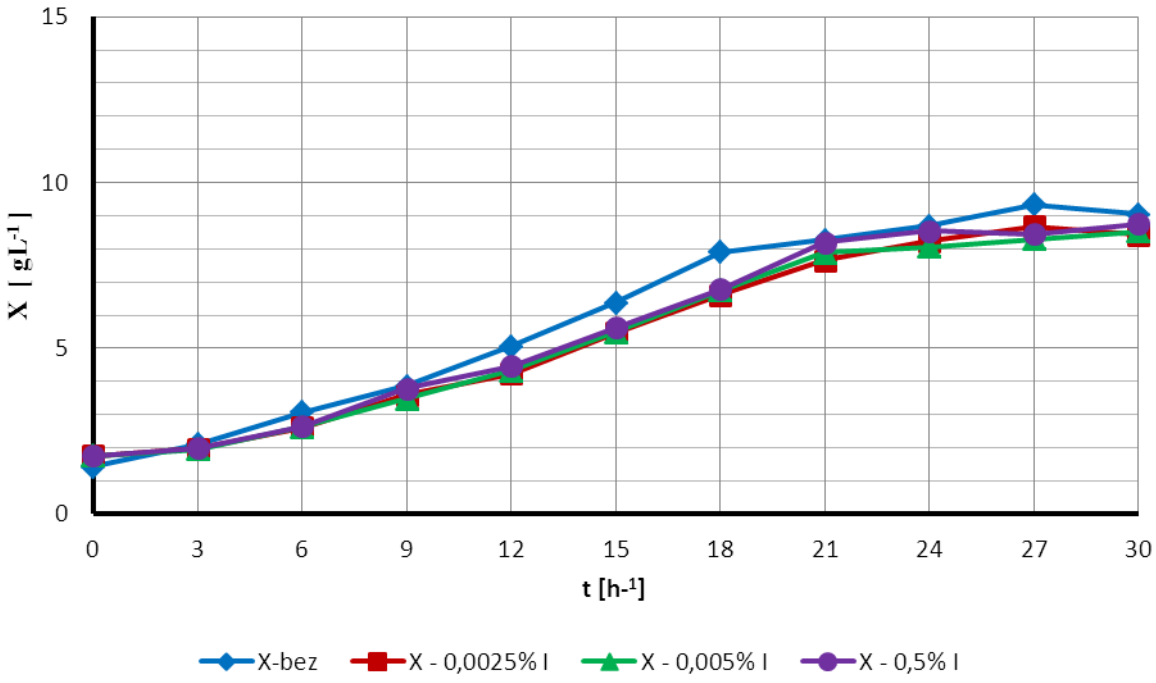
$$\text{ergosterol u kvaščevoj biomasi} = \%\ \text{ergosterola u suhoj biomasi} * 10 \quad [mgg^{-1}_{s.tv.}] \quad (16)$$

# 4. REZULTATI

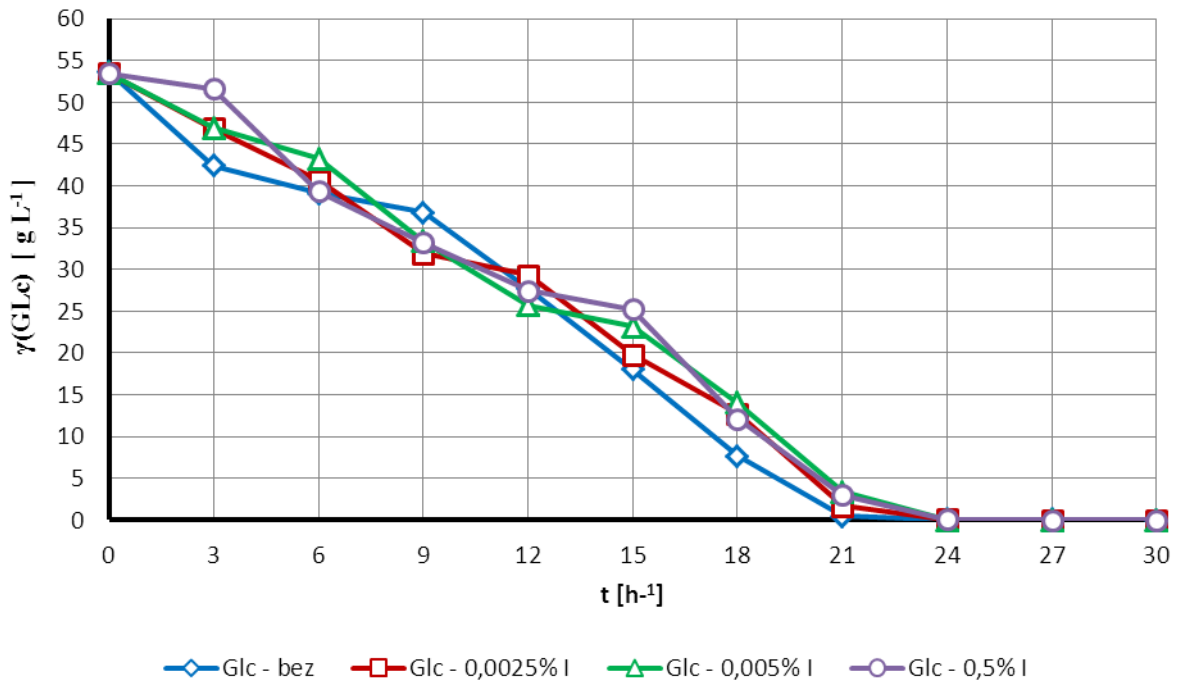
## 4.1. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe na laboratorijskoj tresilici

### 4.1.1. Kinetika rasta soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina)

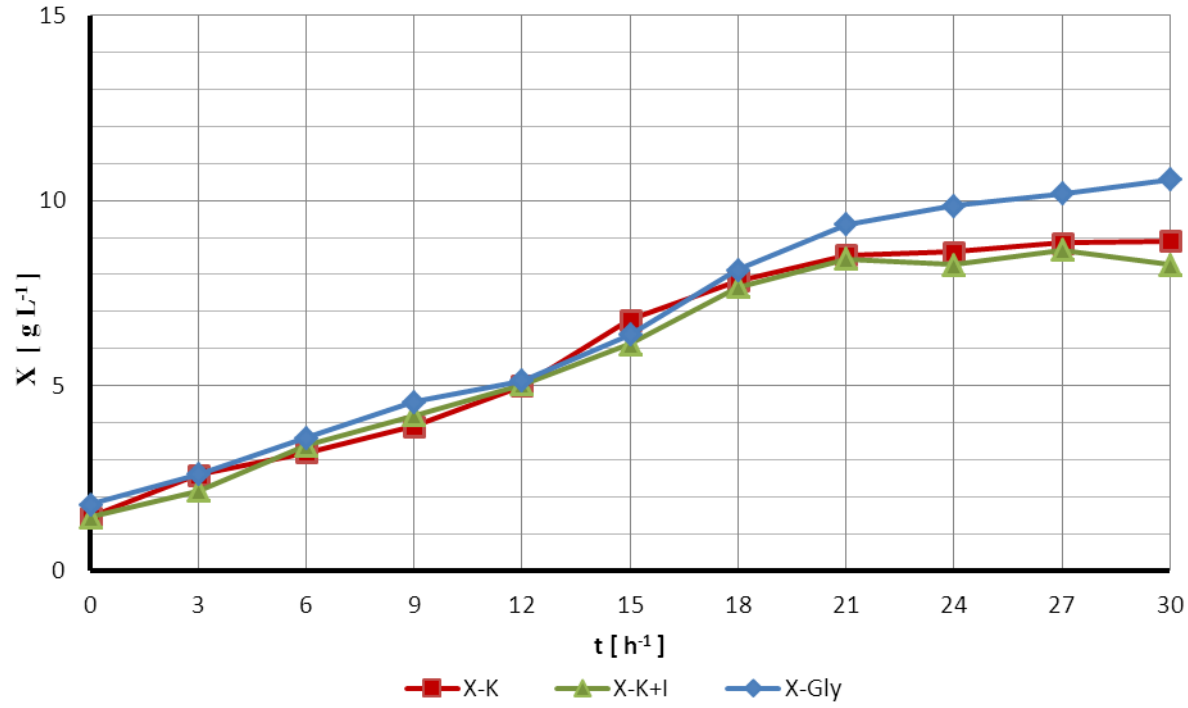
S ciljem ispitivanja utjecaja pojedinih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) na rast soja *S. stipitis* M12 u O-podlogu su dodani 3 % (v/v) glicerola, 0,025%; 0,005% i 0,5% mio-inozitola i 0,1 % kolina. Uzgoj je proveden u volumenu od 100 mL na laboratorijskoj tresilici pri 200 $omin^{-1}$ i temperaturi 30°C tijekom 30 sati, pri pH vrijednosti 6. Uzorci za analizu uzimani su svaka 3 sata. Rast biomase je praćen gravimetrijski. Potrošnja osnovnog izvora ugljika (glukoze) je praćena spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani slikama 13-16.



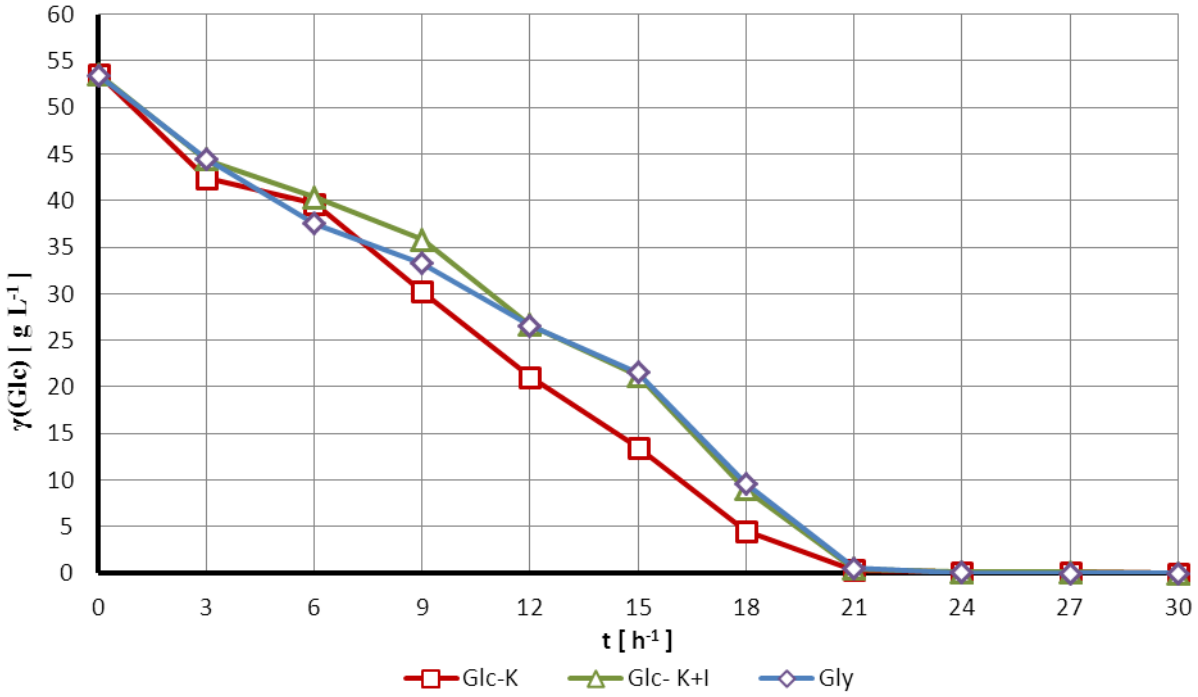

**Slika 13.** Porast biomse soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom 0,0025 - 0,5% mio-inozitola na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri 30°C tijekom 30 sati.




**Slika 14.** Potrošnja glukoze tijekom uzgoja soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom 0,0025 - 0,5% mio-inozitola na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri 30°C tijekom 30 sati.



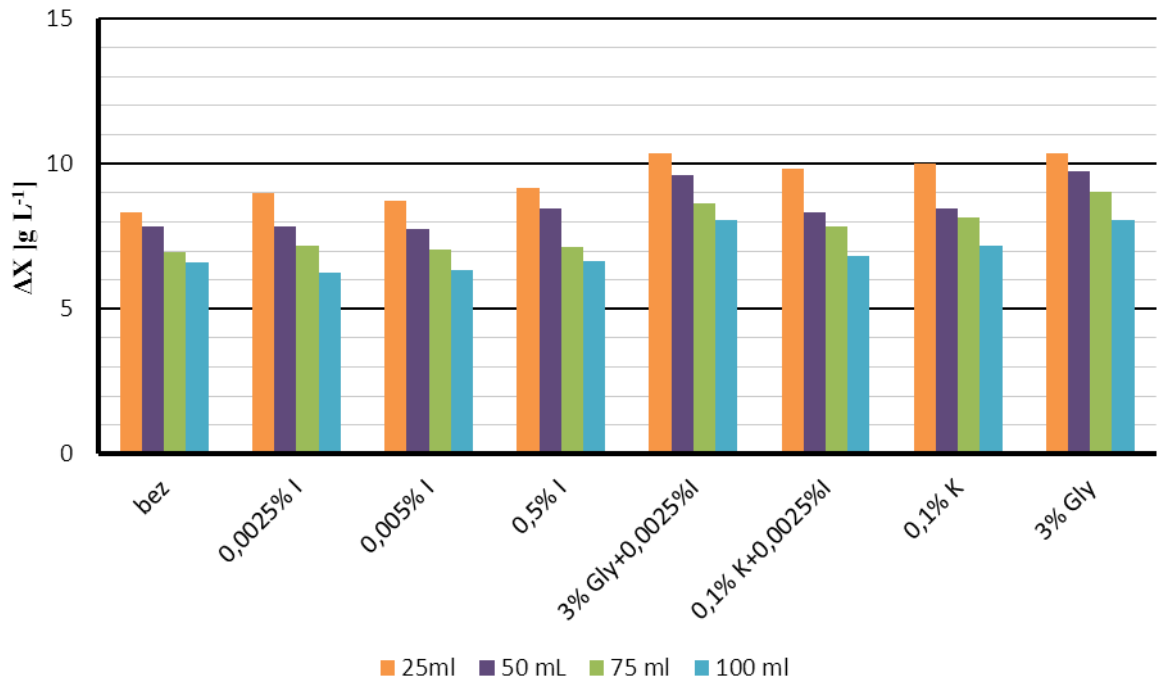

**Slika 15.** Porast biomase soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi s dodatkom kolina, kolina i mio-inozitola te glicerola na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri 30°C tijekom 30 sati.




**Slika 16.** Potrošnja glukoze tijekom uzgoja soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi s dodatkom kolina, kolina i mio-inozitola te glicerola na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri 30°C tijekom 30 sati.

### 4.1.2. Utjecaj stupnja aeracije na rast biomase soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina)

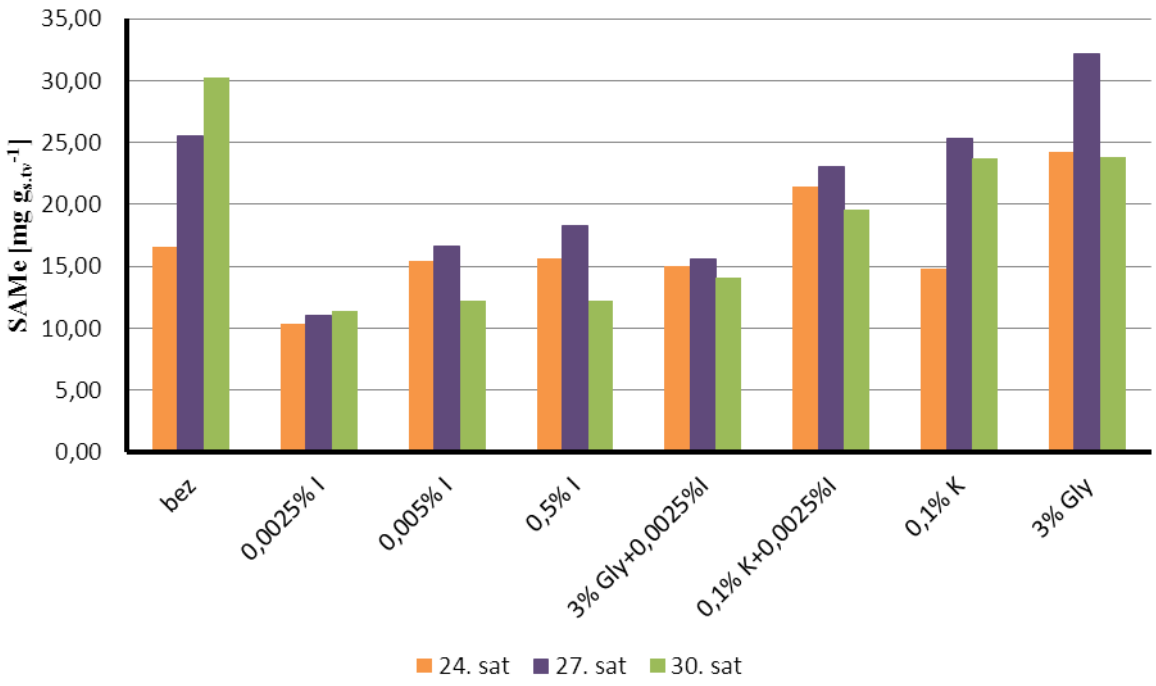
Praćen je prirast soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina) na laboratorijskoj tresilici, kako bi se odredio utjecaja aeracije na porast biomase soja *S. stipitis* M12. U O-podlogu su dodani 3% (v/v) glicerola; 3% (v/v) glicerola i 0,0025% mio-inozitola; 0,0025 % mio-inozitola; 0,005 % mio-inozitola; 0,05 % mio-inozitola; 0,0025 % mio-inozitola i 0,1 % kolina te 0,1 % kolina. Različiti stupanj aeracije osiguran je uzgojem soja *S. stipitis* M12 u različitim volumenima podloge (25 - 100 mL). Prirast biomase je praćen gravimetrijski i prikazan na slici 17.



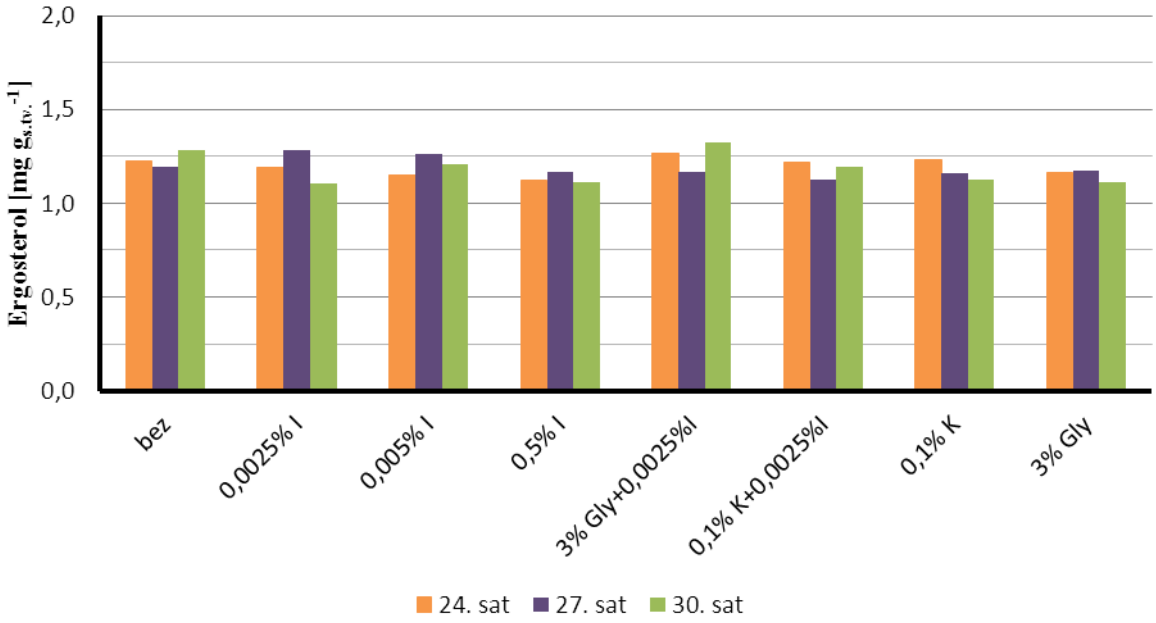

**Slika 17.** Utjecaj različitog volumena O-podloge odnosno stupnja aeracije na prirast soja *S. stipitis* M12 raslog u u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva nakon 24 sata uzgoja na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri temperaturi 30 °C.

### 4.1.3. Udio SAMe i ergosterola u biomasi soja *S. stipitis* M12 u stacionarnoj fazi rasta u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina)

Proveden je uzgoj soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (3% (v/v) glicerola; 3% (v/v) glicerola i 0,0025% mio-inozitola; 0,0025 % mio-inozitola; 0,0025 % mio-inozitola; 0,005 % mio-inozitola; 0,0025 % mio-inozitola i 0,1 % kolina te 0,1 % kolina) kako bi se ispitao udio SAMe i udio ergosterola u biomasi kvasca u produženoj stacionarnoj fazi rasta. Uzgoj je proveden u volumenu od 100 mL na laboratorijskoj tresilici pri 200 $omin^{-1}$, temperaturi 30 °C i pH-vrijednosti 6. Uzorci su uzimani u 24., 27.i 30. satu, jer je kvasac u 24. satu potrošio svu glukozu i ušao u stacionarnu fazu rasta. Udio SAMe u biomasi kvasca je određen HPLC metodom, a udio ergosterola spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani na slikama 18-19.



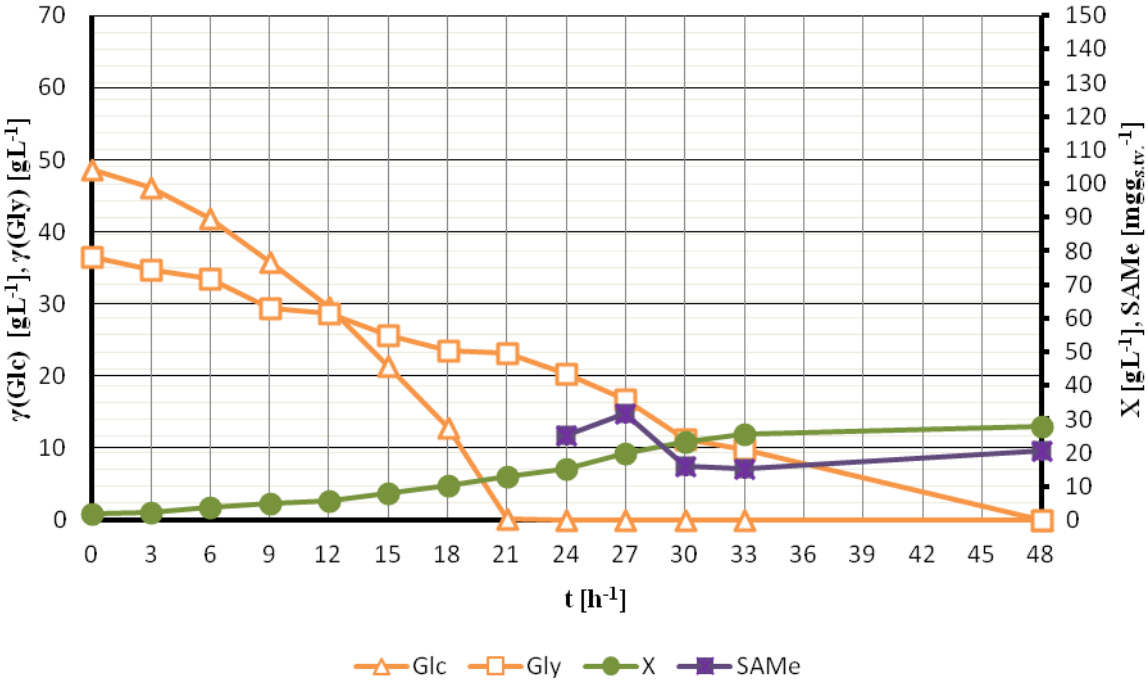

**Slika 18.** Udio SAMe u biomasi soja *S. stipitis* M12 (nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta) uzgojenog na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri temperaturi 30 °C u 100 mL O-podloge uz dodatak protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola odnosno kolina).



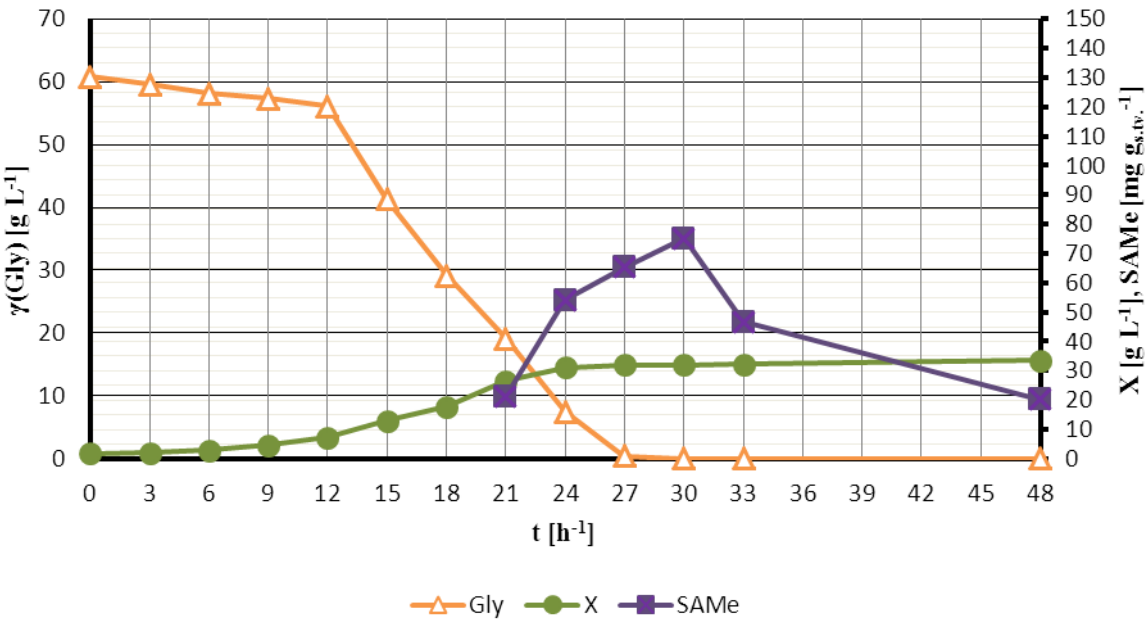

**Slika 19.** Udio ergosterola u biomasi soja *S. stipitis* M12 (nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta) uzgojenog na laboratorijskoj tresilici (200 $omin^{-1}$) pri temperaturi 30 °C u 100 mL O-podloge uz dodatak protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola odnosno kolina).

## 4.2. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe u laboratorijskom bioreaktoru

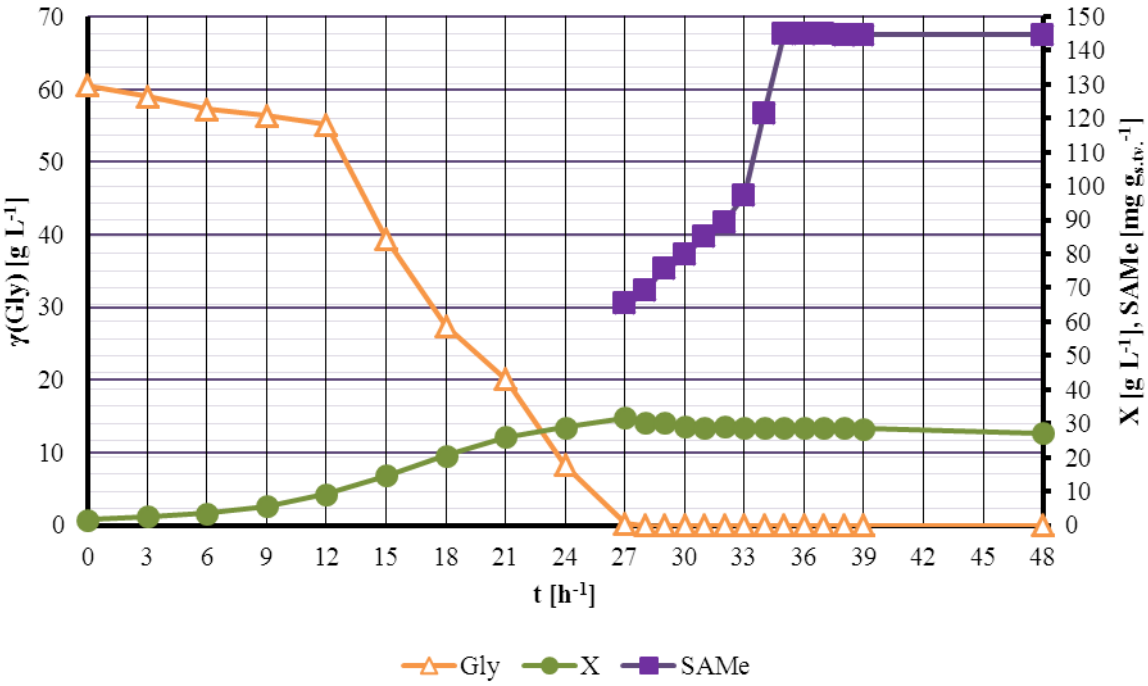
Nakon uzgoja na laboratorijskoj tresilici uzgoj soja M12 kvasca *S. stipitis* proveden je u laboratorijskom bioreaktoru (aeracija od 3,0 $vv^{-1}min^{-1}$) u O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola (slika 20) i u modificiranoj O-podlozi gdje je glicerol osnovni izvor ugljik (slike 21-23). Uzgoj soja M12 kvasca *S. stipitis* u O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola proveden je šaržno, a u modificiranoj O-podlozi proveden je šaržno i šaržno s pulsnim dodatkom metionina te uspoređen s uzgojem divljeg soja kvasca *S. stipitis*. Praćen je rast biomase i udio SAMe u biomasi kvasca te potrošnja glukoze odnosno potrošnja glicerola (slike 20-23). Rast biomase je praćen gravimetrijski, a udio SAMe u biomasi kvasca HPLC metodom. Potrošnja glukoze je praćena spektrofotometrijski, a potrošnja glicerola HPLC metodom.



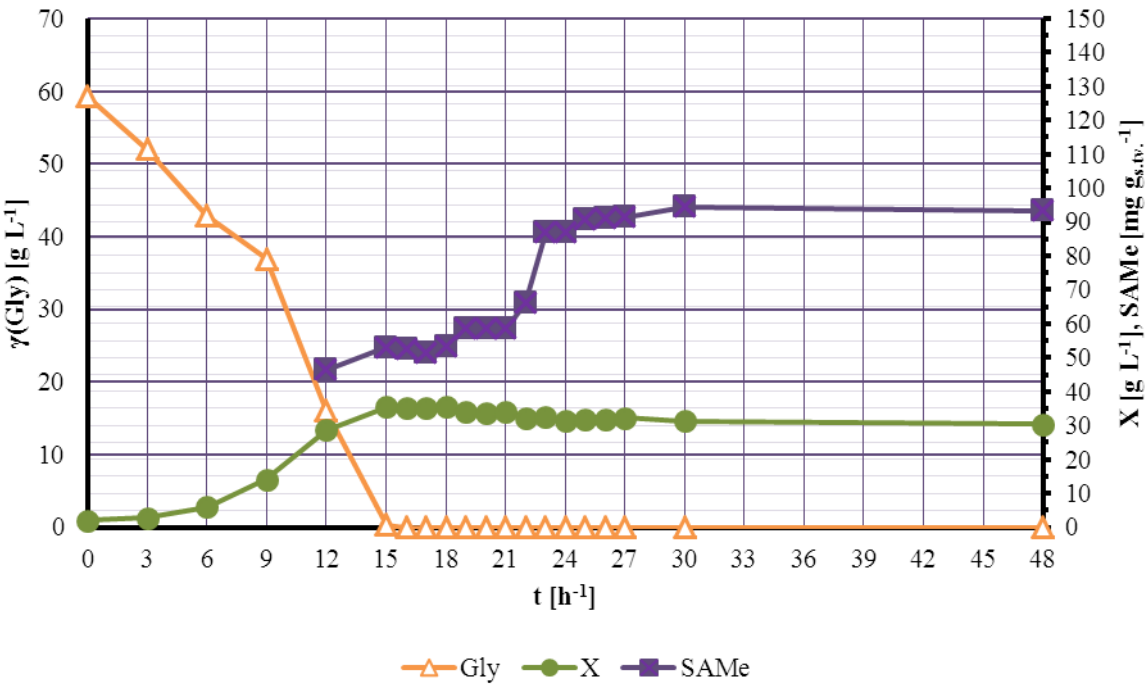

**Slika 20.** Promjena udjela SAMe i rast biomase soja *S. stipitis* M12 te brzina potrošnje glukoze odnosno glicerola tijekom uzgoja ovog soja u O-podlozi uz dodatak 3 % (v/v) glicerola u laboratorijskom bioreaktoru (pH 6 i temperatura 30 ˚C).




**Slika 21.** Promjena udjela SAMe u biomasi soja *S. stipitis* M12, koncentracije biomase soja M12 i brzina potrošnje glicerola u modificiranoj O-podlozi tijekom 48 sati u laboratorijskom bioreaktoru (pH 6 i temperatura 30 ˚C).




**Slika 22.** Promjena udjela SAMe u biomasi soja *S. stipitis* M12, koncentracije biomase soja M12 i brzine potrošnje glicerola u modificiranoj O-podlozi i uz pulsni dodatak 6 $gL^{-1}$ D,L-metionina u 27. satu uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru (pH 6 i temperatura 30 ˚C).




**Slika 23.** Promjena udjela SAMe u biomasi divljeg soja kvasca *S. stipitis*, koncentracije biomase divljeg soja i brzine potrošnje glicerola u modificiranoj O-podlozi i uz pulsni dodatak 6 $gL^{-1}$ D,L-metionina u 15. satu uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru (pH 6 i temperaturi 30 ˚C).

# 5. RASPRAVA

## 5.1. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe na laboratorijskoj tresilici

### 5.1.1. Kinetika rasta soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina)

Soj *S. stipitis* M12 selekcioniran je na osnovu rezistencije na nistatin te zbog poremećaja u biosintetskom putu ergosterola ima smanjen udio ergosterola u staničnoj membrani što bitno utječe na fluidnost stanične membrane te ga čini osjetljivijim na osmotski i oksidacijski stres. Budući da kod kvasaca postoji međusobna interakcija između metaboličkih puteva različitih lipidnih komponenata, promjenom sadržaja ergosterola utječe se na sadržaj ostalih lipidnih komponenata u membrani (fosfolipida i sfingolipida) (Villa-García i sur., 2011). U ovome radu istražen je utjecaj dodatka protektivnih spojeva glicerola, mio-inozitola i kolina na rast soja *S. stipitis* M12 i proizvodnju SAMe. U aerobnim uvjetima glicerol služi stanicama kvasca kao izvor ugljika i energije, no stanica može nakupljati ovaj trovalentni alkohol s ciljem smanjivanja osmotskog stresa. U stanju osmotskog stresa glicerol se može nakupljati u stanici zbog promjene permeabilnosti stanične membrane, povećanjem biosinteze glicerola ili unosom glicerola iz okoline aktivnim transportom (simport), što je najčešći slučaj kod kvasaca (Lages i sur., 1999). Mio-inozitol i kolin su prekursori za sintezu fosfolipida (fosfatidilinozitol, fosfatidilkolin), komponenti staničnih membrana koje značajno utječu na karakteristike membrana i stabilnost stanice u stresnim uvjetima (Carman i Henry, 1989).

Uzgoj soja *S. stipitis* M12 proveden je u O-podlozi i O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola, 0,0025 %; 0,005 % i 0,5 % mio-inozitola te 0,1 % kolina u volumenu od 100 mL na laboratorijskoj tresilici pri 200 $omin^{-1}$ (temperaturi 30°C i pH vrijednosti 6) tijekom 30 sati uzgoja, pri čemu je praćena kinetika rasta soja M12 u svim fazama rasta. U svim ispitivanim podlogama (O-podlozi i O-podlozi s dodatkom protektivnih spojeva) kvasac se tijekom prvih šest sati uzgoja biomase nalazio u fazi usporenog rasta (*lag faza* rasta; 0.-6. sat uzgoja), zatim u fazi intenzivnog rasta tijekom sljedećih osamnaest sati (*eksponencijalna faza rasta*, *lag faza*; 6.-24. sat uzgoja) te je u 24. satu ušao u fazu mirovanja (*stacionarna faza*; 24.-30. sat uzgoja) (slika 13 i slika 15). Prilikom ulaska u stacionarnu fazu rasta u 24. satu uzgoja uočena je najmanja koncentracija biomase od 8,06 $g_{s.tv.}L^{-1}$ u O-podlozi s dodatakom 0,005 % mio-inozitola, dok je najveća koncentracija od 9,86 $g_{s.tv.}L^{-1}$ zabilježena u O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola. Nastavkom uzgoja nakon ulaska u stacionarnu fazu dolazi do malog porasta koncentracije biomase kvasca zbog rasta stanica na peptonu i kvaščevom ekstraktu jer kvasac

*S. stipitis* ima sposobnost istovremenog korištenja aminokiselina kao izvora ugljika i dušika (Freese i sur., 2011). Praćenjem produžene stacionarne faze najveća koncentracija biomase postignuta je u O-podlozi s dodatkom 3% (v/v) glicerola (10,56 $g_{s.tv.}L^{-1}$) u 30. satu uzgoja. Dodatak glicerola u O-podlogu rezultirao je povećanjem prirasta biomase soja M12 za gotovo 2 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$ u odnosu na podlogu bez dodatka protektivnih spojeva, što potvrđuje pretpostavku da prisutnost glicerola u O-podlozi pozitivno utječe na svojstva membrane stanice soja M12 kvasca *S. stipitis* jer ga stanica može koristiti za sintezu fosfatidne kiseline iz koje se zatim sintetiziraju lipidne komponente membrana i na taj način smanjuje negativan utjecaj okoline na stanicu ovog kvasca. Osim protektivne uloge, glicerol je i dodatni izvor ugljika pa je u O-podlozi s dodatkom 3% (v/v) glicerola provjeren i sadržaj glicerola te je utvrđeno da se u ispitivanom vremenu uzgoja glicerol nije značajno mijenjao (podaci nisu prikazani). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjima Lees i sur. (1980) koji su dodatkom 3 % (v/v) glicerola u podlogu postigli zaštitno djelovanje na soj kvasca *S. cerevisiae* s poremećajem u biosintezi ergosterola te samim time i poremećajem u integritetu membrane. Papini i sur. (2012) su koristili mio-inozitol kao sastojak podloge za uzgoj kvasca *S. stipitis* CBS 6054 i kvasca *S. cerevisiae*. Također je kod kvasca *S. cerevisiae* uočena uloga inozitola u regulaciji lipidnog metabolizma i odgovora stanice na stresne uvjete (Villa-García i sur., 2011). Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) za O-podlogu s dodatkom 3% (v/v) glicerola iznosi 0,164 gX $g^{-1}$Glc, a specifična brzina rasta biomase (μ) 0,0517 $h^{-1}$.

Sukladno rastu biomase soja M12, zabilježena je potrošnja osnovnog izvora ugljika (glukoze) iz O-podloge, pri čemu je u 24. satu uzgoja došlo do potpunog iscrpljivanja glukoze u svim ispitivanim podlogama (slike 14 i 16).

### 5.1.2. Utjecaj stupnja aeracije na rast biomase soja *S. stipitis* M12 u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina)

Kako bi se ispitao utjecaj aeracije na rast biomase soja M12 kvasca *S. stipitis*, praćen je prirast biomase soja *S. stipitis* M12 u različitim volumenima (25 - 100 mL) O-podloge i O-podloga uz dodatak protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola i kolina) na laboratorijskoj tresilici s ciljem smanjivanja negativnog utjecaja kisika na stanice (oksidacijskog stresa). Rezultati su prikazani pod 4.1.2. na slici 17. Primjenom svih ispitivanih O-podloga (sa i bez dodatka protektivnih spojeva) prirast biomase soja *S. stipitis* M12 najveći je u najmanjem volumenu podloge (25 mL) te opada povećanjem volumena. Dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjima jer veći stupanj aeracije, kojeg omogućava manji volumen podloge u tikvicama za uzgoj, pospješuje rast biomase (He i sur., 2006). Najveći prirast biomase zabilježen je u O-

podlozi s dodatkom 3% (v/v) glicerola u svim ispitivanim volumenima. Pritom je prirast biomase obrnuto proporcionalan volumenu podloge, odnosno u najmanjem volumenu podloge (25 mL) zabilježen je najveći prirast biomase u navedenoj podlozi (10,36 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$). U O-podlozi bez dodatka protektivnih spojeva zabilježen je znatno manji prirast biomase u svim volumenima, nego u podlogama s dodatkom 3 % (v/v) glicerola te je neznatno manji od prirasta u O-podlogama s dodatkom mio-inozitola. Najmanji prirast biomase od 6,27 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$ zapažen je kod najvećeg volumena O-podloge (100 mL) s dodatkom 0,0025 % mio-inozitola. Dobiveni rezultati mogu se objasniti pozitivnim utjecajem glicerola na rast stanica kvasca koje imaju narušenu staničnu membranu, jer glicerol djeluje kao osmolit, doprinosi zadržavanju vode u stanici te kao osmoprotektor omogućava odvijanje mnogih staničnih procesa u uvjetima osmotskog stresa (Flores i sur., 2000). Osim toga, omogućuje održavanje redoks ravnoteže koja utječe na mitohondrijsku respiraciju, energetski naboj stanice i smanjenje proizvodnje kisikovih radikala u stanici (oksidacijski stres) (Shen i sur., 1999).

Međusobnom usporedbom prirasta u 25 mL ispitivanih podloga vidljivo je da je najviši prirast postignut u O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola (10,36 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$) kao i u O-podlozi s 3 % (v/v) glicerola i 0,0025 % mio-inozitola (10,37 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$). Nadalje, slijedi prirast u O-podlozi s 0,1 % kolina (10,01 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$), prirast u O-podlozi s 0,0025 % mio-inozitola i 0,1% kolina (9,82 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$) te prirast u O-podlogama s mio-inozitolom (9,0 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$), dok je najniži prirast u O-podlozi bez dodataka (8,31 $g_{s.tv.}$ $L^{-1}$). Rezultati su u skladu s očekivanjima, budući da soj *S. stipitis* M12, zbog poremećaja u biosintetskom putu ergosterola, ima promjenjen udio lipida u staničnoj membrani što ima veliki utjecaj na rast stanice u uvjetima povećane aeracije. Prema Villa-García i sur. (2011) dodatak mio-inozitola u podlogu za rast kvasca *S. cerevisiae* s poremećajem u biosintezi egosterola omogućuje sintezu fosfatidilinozitola i inozitol fosfata koji su važni za integritet membrane. Za razliku od uzgoja pri 30 °C tijekom uzgoja pri višim temperatura (37 °C) navedeni kvasac je auksotrofan za inozitol zbog nemogućnosti sinteze inozitola iz glukoze. Kod O-podloga s dodatkom 3 % (v/v) glicerola i 0,1 % kolina odnosno 0,0025 % mio-inozitola i 0,1 % kolina uočen je veći prirast biomase soja M12 nego kod O-podloge bez dodatka protektivnih spojeva što je očekivano, budući da prisutnost kolina u podlozi omogućava sintezu fosfatidilinozitola (PI) iz fosfatidne kiseline potrebnog stanici kvasca jer PI čini 20 % udjela svih fosfolipida koji su važni za integritet stanične membrane (Gaspar i sur., 2008).

### 5.1.3. Udio SAMe i ergosterola u biomasi soja *S. stipitis* M12 u stacionarnoj fazi rasta u O-podlozi bez i s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola, kolina)

Kako bi se ispitao utjecaj dodatka protektivnih spojeva na udio SAMe i udio ergosterola u biomasi kvasca *S. stipitis* u produženoj stacionarnoj fazi rasta, proveden je uzgoj soja *S. stipitis* M12 u 100 mL O-podloge i 100 mL O-podloge s dodatkom protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola i kolina) na laboratorijskoj tresilici. Rezultati su prikazani u poglavlju 4.1.3. na slikama 18 i 19. Nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta praćen je udio SAMe i ergosterola u stanici soja *S. stipitis* M12, pri čemu su uzorci izuzimani u 24. satu uzgoja kada je u svim podlogama došlo do potpune potrošnje glukoze kao osnovnog supstrata, te u 27. i 30. satu uzgoja. Ulaskom soja M12 u stacionarnu fazu rasta raste i udio SAMe u biomasi kvasca jer se prestankom intezivnog rasta stanica smanjuje potrošnja ATP za rast, a time se omogućuje veća sinteza SAMe (Shiozaki i sur., 1984).

U svim O-podlogama s dodatkom protektivnih spojeva udio SAMe u biomasi soja M12 najmanji je u 24. satu uzgoja, zatim je zabilježen porast udjela SAMe tijekom sljedeća 3 sata (27. sat uzgoja), a daljnjim uzgojem udio SAMe se smanjio (30. sat) (slika 18). Najveći udio SAMe (32,19 $mgg^{-1}_{s.tv.}$) zabilježen je u 27. satu uzgoja u biomasi soja M12 kvasca *S. stipitis* uzgojenoj u O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola te u O-podlozi bez dodataka u 30. satu uzgoja (30,26 $mgg^{-1}_{s.tv.}$). Utjecaj glicerola dodanog u O-podlogu na povećanje udjela SAMe u biomasi soja M12 može se objasniti na isti način kao i utjecaj glicerola na prirast biomase soja M12 koji je opisan u poglavlju 5.1.2., jer postoji međusobna povezanost glicerolskog puta i metaboličkih puteva različitih lipidnih komponenti stanice čime se utječe na fiziologiju stanice kvasca (Villa-García i sur., 2011). Udio SAMe u biomasi soja M12 uzgajanog u podlogama s dodatkom mio-inozitola u 27. satu uzgoja znatno je manji od udjela u biomasi uzgajanoj u O-podlozi i O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola te iznosi 11,02 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ za podlogu s dodatkom 0,0025 % mio-inozitola odnosno 16,67 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ za podlogu s dodatkom 0,005 % mio-inozitola i 18,27 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ za podlogu s 0,5 % mio-inozitola. U 27. satu uzgoja u biomasi uzgojenoj u O-podlozi s dodatkom 0,1% kolina i 0,0025 % mio-inozitola udio SAMe iznosi 23,09 $mgg^{-1}_{s.tv.}$, te 25,32 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ za biomasu uzgajanu u O-podlozi s dodatkom 0,1% kolina. Razlike u udjelu SAMe u biomasama M12 uzgajanim u ispitivanim podlogama mogu se objasniti djelovanjem protektivnih spojeva na stanicu kvasca i potrošnjom SAMe u biosintezi poliamina i glutationa (GSH) koji sudjeluju u neenzimskoj antioksidacijskoj zaštiti stanice kvasca (Lu i Mato, 2012). Dodatkom kolina odnosno inozitola u podlogu mijenja se

metabolički put fosfolipida, pri čemu se dodatkom kolina smanjuje potrošnja SAMe koji se koristi u posljednje tri reakcije nastajanja fosfatidilkolina (Van der Rest i sur.,1995). Inozitol i kolin, osim što sudjeluju u regulaciji gena ključnih za lipidni metabolizam, reguliraju i ekspresiju gena *SAH1* koji kodira za enzim *(S)*-adenozil-L-homocistein hidrolazu (Sah1) koja sudjeluje u ciklusu metionina. Sah1 hidrolizira *(S)*-adenozil-L-homocistein (SAH) (inhibitor SAMe-zavisnih metiltrasferaza) u homocistein zbog čega se ravnoteža pomiče na stranu SAH i potrošnje SAMe (slika 6). Inozitol u podlozi uzrokuje represiju *SAH1*, dok dodatak kolina uzrokuje značajniju represiju čime se smanjuje aktivnost SAMe-zavisnih metiltransferaza i povećava nakupljanje SAMe u stanici kvasca *S. cerevisiae* (Tehlivets i sur., 2004). Na osnovu dobivenih rezultata možemo zaključiti da odabrani protektivni spojevi različito utječu na udio SAMe u uzgojenoj biomasi soja M12 kvasca *S. stipitis*, te da dodatak glicerola u O-podlogu ima pozitivan učinak na udio SAMe u biomasi ispitivanog kvasca.

Udio ergosterola je podjednak u svim biomasama soja M12 uzgajanim u ispitivanim podlogama (od 1,1 do 1,3 $mgg^{-1}$s.tv.), pri čemu je najmanji udio zabilježen u 27. satu uzgoja biomase soja *S. stipitis* M12 u svim ispitivanim podlogama osim u O-podlogama s dodatkom mio-inozitola kod kojih je udio ergosterola najveći u 27. satu uzgoja (slika 19). Budući da soj *S. stipitis* M12 ima poremećaj u biosintezi ergosterola, niski udio ergosterola u uzgojenim biomasama u skladu je sa očekivanjima. Dobivene vrijednosti su za oko 2 puta manje u odnosu na vrijednosti koje su Križanović i sur. (2015) dobili za divlji soj kvasca *S. stipitis*. Za razliku od soja M12 u divljem soju kvasca *S. stipitis* odvija se nesmetana biosinteza ergosterola koja je važna za održavanje homeostaze sterola (Henneberry i Sturley, 2005). Udio ergosterola u biomasi uzgajanoj u čistoj O-podlozi i O-podlozi s dodatkom protektivnih spojeva je podjednak, pa možemo zaključiti da dodatak protektivnih spojeva u podlogu nema utjecaj na udio ergosterola u biomasi uzgajanoj u ispitivanim podlogama.

### 5.2. Rast kvasca *S. stipitis* i proizvodnja SAMe u laboratorijskom bioreaktoru

Nakon uzgoja soja *S. stipitis* M12 na laboratorijskoj tresilici proveden je šaržni uzgoj istog soja u laboratorijskom bioreaktoru (aeracija od 3,0 $vv^{-1}min^{-1}$) u 3 L korisnog volumena O-podloge uz dodatak 3 % (v/v) glicerola koji se u prethodnim ispitivanjima pokazao najboljim protektivnim spojem s najvećim utjecajem na povećanje prirasta biomase soja M12 i udio SAMe. Podloga je sadržavala 6 $gL^{-1}$ D,L-metionina (prekursora sinteze SAMe). Tijekom 48 sati uzgoja praćen je rast biomase soja M12, potrošnja osnovnog supstrata glukoze, protektivnog spoja glicerola te promjena udjela SAMe u biomasi. Soj M12 je u aerobnim uvjetima rasta (3,0 $vv^{-1}min^{-1}$) istovremeno koristio glukozu i glicerol (slika 20) pri

čemu je brzina potrošnje glukoze veća od brzine potrošnje glicerola. U 21. satu uzgoja došlo je do potpunog iscrpljivanja glukoze iz podloge pri čemu je postignuta koncentracija biomase od 12,78 $g_{s.tv.}L^{-1}$. U istom periodu iskorišteno je i 13,09 $gL^{-1}$ glicerola. Nakon iscrpljivanja glukoze soj M12 je nastavio s intenzivnim rastom sve do iscrpljivanja glicerola. U uvjetima intenzivne aeracije soj M12 kvasca *S. stipitis* koristi glicerol za svoj rast jer je glicerol oksidativni supstrat te je za njegovu potrošnju kvascu *S. stipitis* potrebna veća koncentracija kisika. Nakon 48 sati uzgoja postignuta je koncentracija biomase od 27,94 $g_{s.tv.}L^{-1}$ i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) od 0,32 $gg^{-1}$. Nakon iscrpljivanja glukoze u 21. satu uzgoja, došlo je do porasta udjela SAMe u biomasi soja M12 s maksimumom u 27. satu uzgoja koji je iznosio 31,82 $mgg^{-1}_{s.tv.}$. Nakon 27. sata uzgoja udio SAMe ponovno opada jer su stanice soja M12 prilagodile metabolizam kako bi nastavile rasti na glicerolu kao sekundarnom izvoru ugljika i koriste SAMe u vlastitom metabolizmu za rast (metilacija DNA i RNA) (Lin i sur., 2004). Ulaskom soja u stacionarnu fazu udio SAMe u biomasi ponovno raste i u 48. satu je iznosio 20,78 $mgg^{-1}_{s.tv.}$. Iz krivulja prikazanih na slici 20 možemo zaključiti da je udio SAMe veći prilikom rasta biomase soja M12 na glukozi, nego na glicerolu. Budući da sinteza SAMe ne ovisi samo o dostupnosti prekursora D,L-metionina, već i o količini dostupnog ATP za sintezu SAMe, veći sadržaj SAMe u biomasi tijekom rasta na glukozi možemo objasniti manjom količinom ATP potrebnom za rast stanica kvasca *S. stipitis* na glukozi (82,2 $mmol_{ATP}g^{-1}_{s.tv}$), nego na glicerolu (95,5 $mmol_{ATP}g^{-1}_{s.tv}$) (Caspeta i sur., 2012), uslijed čega je više ATP dostupno za reakciju sinteze SAMe.

Budući da je tijekom šaržnog uzgoja soja M12 kvasca *S. stipitis* u uvjetima intenzivne aeracije (aeracija od 3,0 $vv^{-1}min^{-}1$), nakon potpune potrošnje glukoze, uočen rast biomase na glicerolu kao sekundarnom izvoru ugljika, proveden je šaržni uzgoj biomase u modificiranoj O-podlozi s 5 % (v/v) glicerola, kako bi se ispitao rast soja M12 kvasca *S. stipitis* te proizvodnja SAMe na glicerolu kao osnovnom izvoru ugljika. Uzgoj je praćen kroz sve faze rasta biomase tijekom 48 sati, pri čemu je biomasa soja M12 prvih 12 sati rasla usporeno (*lag faza*), zatim je sljedećih 15 sati zabilježen eksponencijalni rast (*log faza*) sve do 27. sata kada je došlo do potpune potrošnje osnovnog supstrata (glicerola) i ulaska biomase soja M12 u fazu mirovanja, odnosno stacionarnu fazu (slika 21). Na ulasku u stacionarnu fazu rasta postignuta je koncentracija biomase od 32,08 $g_{s.tv.}L^{-1}$ te se tijekom produžene stacionarne faze rasta do 48. sata nije znatno mijenjala (u 48. satu koncentracija biomase iznosi 33,05 $g_{s.tv.}L^{-1}$), koeficijent konverzije glicerola u biomasu ($Y_{X/Gly}$) je 0,52 $gXg^{-1}Gly$, što je očekivano za Crabtree negativan kvasac, a specifična brzina rasta biomase soja M12 na glicerolu (μ) je 0,1

$h^{-1}$, što je dvostruko više od specifične brzine rasta divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* na glicerolu koja prema Ochoa-Estopier i sur. (2011) iznosi 0,05 $h^{-1}$. Na osnovu dobivenih rezultata možemo zaključiti da je primjena glicerola kao osnovnog supstrata imala pozitivan učinak na rast soja M12 kvasca *S. stipitis* jer je trajanje *lag* faze skraćeno sa 21 sat na 12 sati, a koeficijent pretvorbe glicerola u biomasu je 2,4 puta veći nego koeficijent pretvorbe tijekom rasta na glukozi i glicerolu. U periodu od 21. do 48. sata uzgoja biomase soja M12 u modificiranoj O-podlozi s glicerolom kao osnovnim izvorom ugljika praćen je udio SAMe u biomasi. Zabilježen je porast udjela SAMe nakon 27. sata uzgoja, odnosno nakon potpune potrošnje glicerola iz podloge, pri čemu je maksimum postignut u 30. satu uzgoja i iznosi 75,08 $mgg^{-1}_{s.tv.}$. Tijekom produžene stacionarne faze rasta (30.-48. sat) zabilježen je pad sadržaja SAMe do 20,17 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ (48. sat) što znači da se uzgoj treba prekinuti kod najvećeg udjela SAMe u biomasi kvasca. Pri manjoj specifičnoj brzini rasta stanica, ATP se više troši na stvaranje SAMe nego za sintezu biomase što rezultira nastankom više SAMe (Shiozaki i sur., 1989). Iz navedenog možemo zaključiti da je sadržaj SAMe 3,6 puta veći u biomasi uzgajanoj u modificiranoj O-podlozi s glicerolom kao osnovnim izvorom ugljika, nego u O-podlozi uz dodatak 3 % (v/v) glicerola gdje je glukoza osnovni izvor ugljika.

Nakon što se utvrdilo da glicerol pozitivno djeluje na rast biomase soja M12 kvasca *S. stipitis* i na udio SAMe u njegovoj biomasi, provedeni su dodatni uzgoji kako bi se ispitao utjecaj dodatka prekursora za sintezu SAMe, D,L-metionina, u trenutku ulaska soja M12 u stacionarnu fazu rasta s ciljem povećanja udjela SAMe u biomasi kvasca. Uzgoj soja M12 kvasca *S. stipitis* proveden je u laboratorijskom bioreaktoru u 3 L modificirane O-podloge koja sadrži 5 % (v/v) glicerola kao osnovnog izvora ugljika. Praćen je rast biomase soja M12 tijekom 48 sati kroz sve faze rasta biomase i udio SAMe nakon pulsnog dodatka D,L-metionina na početku stacionarne faze. Kao i u prethodnom uzgoju, biomasa soja M12 prvih 12 sati rasla je usporeno (*lag* faza), zatim od 12. sata raste eksponencijalno (*log* faza) do 27. sata kada ulazi u stacionarnu fazu rasta (slika 22). Nakon pulsnog dodatka D,L-metionina uočen je postupni porast sadržaja SAMe u biomasi soja M12 od 27. do 33. sata (sa 65,56 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ na 97,29 $mgg^{-1}_{s.tv.}$). Daljnjim praćenjem sadržaja SAMe u biomasi soja M12 uočen je intenzivni porast sadržaja SAMe od 33. do 35. sata pri čemu je u 35. satu uzgoja postignut maksimalni udio SAMe od 145 $mgg^{-1}_{s.tv.}$. Pulsnim dodatakom D,L-metionina 1,93 puta se povećao sadržaj SAMe u biomasi soja M12 (uspoređeno sa sadržajem SAMe u kvascu soja M12 uzgajanog u modificiranoj O-podlozi bez pulsnog dodatka D,L-metionina pri čemu je postignuta koncetracija od 75,08 $mgg^{-1}_{s.tv.}$), na osnovu čega možemo zaključiti da je pulsni

dodatak D,L-metionina u podlogu u stacionarnoj fazi pozitivno djelovao na sadržaj SAMe u stanicama te da stanice dodani D,L-metionin koriste za sintezu SAMe.

Na posljetku je proveden šaržni uzgoj divljeg soja *S. stipitis* u modificiranoj O-podlozi s 5 % (v/v) glicerola kao osnovnog izvora ugljika i s pulsnim dodatkom D,L-metionina u trenutku ulaska biomase u stacionarnu fazu rasta, kako bi usporedili dobivene rezultate sa sojem M12 kvasca *S. stipitis*. Uzgoj je proveden u istim uvjetima kao i prethodni uzgoj soja M12 te je praćen tijekom 48 sati u svim fazama rasta biomase. Divlji soj kvasca *S. stipitis* prvih 6 sati uzgoja rastao je usporeno (*lag* faza), zatim je idućih 9 sati rastao intenzivno (*log* faza; 6.-15. sat) te je u 15. satu ušao u stacionarnu fazu (slika 23). U trenutku ulaska u stacionarnu fazu koncentracija biomase iznosila je 35,42 $g_{s.tv.}L^{-1}$, glicerol je potpuno potrošen te je u istom trenutku pulsno dodan D,L-metionin. Stupanj pretvorbe glicerola u biomasu ($Y_{X/Gly}$) je 0,49 $gXg^{-1}Gly$ što se gotovo ne razlikuje od koeficijenta konverzije glicerola u biomasu dobivenog prilikom uzgoja soja M12 pri istim uvjetima ($Y_{X/Gly}$=0,52 $gXg^{-1}Gly$). Divlji soj kvasca *S. stipitis* ušao je u stacionarnu fazu u 15. satu uzgoja što je 12 sati ranije od soja M12 (27. sat), pulsni dodatak D,L-metionina na početku stacionarne faze rasta imao je podjednako djelovanje na udio SAMe u biomasi divljeg soja kao i kod soja M12, no povećanje udjela SAMe odvijalo se znatno sporije kod divljeg soja *S. stipitis* nego kod soja M12. Od 15. do 22. sata uzgoja (7 sati nakon pulsnog dodatka metionina) povećanje udjela SAMe bilo je manjeg intenziteta te je u 22. satu udio SAMe iznosio 66,02 $mgg^{-1}_{s.tv.}$, nakon toga se udio SAMe povećao te u 30. satu dostigao svoj maksimum od 94,41 $mgg^{-1}_{s.tv.}$ (15 sati nakon pulsnog dodatka D,L-metionina). Udio SAMe u biomasi divljeg soja je 1,5 puta manji od udjela u soju M12. Daljnjim praćenjem udjela SAMe u biomasi divljeg soja nije uočen značajan pad udjela SAMe. Usporedbom rezultata možemo zaključiti da je pulsni dodatak D,L-metionina imao pozitivni utjecaj na sadržaj SAMe u biomasi oba soja kvasca *S. stipitis*, no soj M12 nakupio je veći udio SAMe (145 $mgg^{-1}_{s.tv.}$) i u kraćem vremenu od divljeg soja kvasca (94,41 $mgg^{-1}_{s.tv.}$). Soj M12 kvasca *S. stipitis* je za osam sati nakon pulsnog dodatka D,L-metionina postigao najviši udio SAMe dok je divljem soju bilo potrebno petnaest sati. Dobiveni rezultat je posljedica poremećaja u biosintetskom putu ergosterola kod soja M12 uslijed kojeg ovaj soj ima povećanu sposobnost nakupljanja SAMe.

# 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata eksperimentalnog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

1. Soj *S. stipitis* M12 podjednako raste u O-podlozi sa i bez dodatka protektivnih spojeva (glicerola, mio-inozitola i kolina) na laboratorijskoj tresilici. Dodatak 3 % (v/v) glicerola u O-podlogu rezultirao je najvećim povećanjem koncentracije biomase soja M12 na laboratorijskoj tresilici.

2. Prirast biomase soja *S. stipitis* M12 najveći je u uvjetima najveće aeracije, odnosno u najmanjem volumenu podloge te opada povećanjem volumena. U svim ispitivanim volumenima podloge najveći prirast biomase soja M12 je u O- podlozi s dodatkom 3 % glicerola.

3. Dodatak 3 % (v/v) glicerola u O-podlogu za uzgoj soja *S. stipitis* M12 ima pozitivan učinak na sadržaj SAMe u biomasi. Najveći udio SAMe u biomasi postignut je 3 sata ranije nego u biomasi uzgajanoj u O-podlozi bez dodatka glicerola.

4. Dodatak protektivnih spojeva ne utječe značajno na sadržaj ergosterola u stanicama soja M12 kvasca *S. stipitis*.

5. Uzgojem soja M12 kvasca *S. stipitis* u uvjetima intenzivne aeracije u modificiranoj O-podlozi s 5 % (v/v) glicerola kao osnovnog izvora ugljika skraćeno je trajanje faze usporenog rasta (*lag*), koeficijent pretvorbe glicerola u biomasu je 2,4 puta veći, a sadržaj SAMe 3,6 puta veći nego tijekom rasta u O-podlozi s dodatkom 3 % (v/v) glicerola.

6. Soj M12 uzgajan u modificiranoj O-podlozi uz pulsni dodatak D,L-metionina na početku stacionarne faze nakuplja veću količinu SAMe nego soj M12 uzgajan bez pulsnog dodatka D,L-metionina.

7. Divlji soj kvasca *S. stipitis* uzgajan u modificiranoj O-podlozi s pulsnim dodatkom D,L-metionina ulazi u stacionarnu fazu rasta u kraćem periodu nego soj M12, ali sporije nakuplja SAMe u stacionarnoj fazi.

# 7. LITERATURA

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

**A**nstee, Q.M., Day, C.P. (2012) S-Adenosylmethionine (SAMe) Therapy in Liver Disease: A Review of Current Evidence and Clinical Utility. *J. Hepatol*. **57** (5), 1097-1109. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.041

**A**rthington-Skaggs, B. A., Jradi, H., Desal, T., Morrison, C. J. (1999) Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans. J. Clin. Microbiol.* **37** (10), 3332-3337.

**B**arra, J.L., Mautino, M.R., Rosa, A.L. (1996) A dominant negative of effect of eth-1r, a mutant allele of the *Neurospora crassa* S-adenosy-l-methionine synthetase-encoding gene conferring resistance to the methionine toxic analogue ehtionine. *Genetics* **144,** 1455–1462.

**B**ottiglieri, T. (2002) S-adenosyl-L-methionine (SAMe): from the bench to the bedside-molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 1151-1157.

**C**antoni, G. L. (1975) Biological methylation: selected aspects. *Annu. Rev. Biochem*. **44** (1), 435-451.

**C**antoni, G.L. (1952) The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *J. Am. Chem. Soc*.**74**, 2942–2943.

**C**ao, X., Yang, M., Xia, Y., Dou, J., Chen, K., Wang, H., Zhou, C. (2012) Strain improvement for enhanced production of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae* based on ethionine-resistance and SAM synthetase activity. *Ann. Microbiol*. **62** (4), 1395-1402.

**C**arman, G. M., Henry, S. A. (1989) Phospholipid biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **58,** 635-669.

**C**aspeta, L., Shoaie, S., Agren, R., Nookaew, I., Nielsen, J. (2012) Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and *in silico* evaluation of their potentials. *BMC Syst. Biol.* **6**, 24.

**C**hiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., McCann, P. P. (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *Faseb. J*. **10** (4), 471-480.

**C**hu, J., Qian, J., Zhuang, Y., Zhang, S., Li, Y. (2013) Progress in the research of S-adenosyl-L-methionine production. *Appl. Microbiol. Biot.*, **97** (1), 41-49.

**C**rabtree, H. G. ( 1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem. J*. **23**, 536.

**D**a Silva, G. P., Mack, M., Contiero, J. (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv*. ***27*** (1), 30-39.

**D**e Deken, R. H. (1966) "The Crabtree effect: A regulatory system in yeast". *Microbiology*. **44** (2), 149-156.

**D**elgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M. (1988) The ethanol tolerance of *Pichia stipitis* Y 7124 grown on a D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture. *J. Ferment. Technol*. **66** (4), 417–422.

**D**ellomonaco, C., Fava, F., Gonzalez, R. (2010) The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb. Cell Fact*. **9** (1), 1.

**D**en Haan, R., Van Zyl, W. H. (2003) Enhanced xylan degradation and utilisation by *Pichia stipitis* overproducing fungal xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol*. **33** (5), 620-628.

**D**ickson, R.C., Lester R.L., (2002) Sphingolipid fuctions in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA-Mol. Cell Biol. L*. **1583** (1), 13-25.

**d**u Preez, J.C., Bosch, M., Prior, B.A. (1985) Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microb. Technol*. **8** (6), 360–364.

**D**upont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., Beney, L. (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?. *Evolution* **66** (9), 2961-2968.

**E**isenkolb, M., Zenzmaier, C., Leitner, E., Schneiter, R. (2002) A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol. Biol. Cell*. **13** (12), 4414-4428.

**F**eng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Marks, A. R. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell. Biol.* **5** (9), 781-792.

**F**lores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C. (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **24** (4), 507-529.

**F**reese, S., Vogts, T., Speer, F., Schäfer, B., Passoth, V. and Klinner, U. (2011) C-and N-catabolic utilization of tricarboxylic acid cycle-related amino acids by *Scheffersomyces stipitis* and other yeasts. *Yeast*, **28** (5), 375-390.

**F**ukuhara, H. (2003) The Kluyver effect revisited, *FEMS Yeast Res.* **3**, 327-331.

**G**ancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. R*. **62,** 334–361.

**G**aspar, M.L., Jesch, S.A., Viswanatha, R., Antosh, A.L., Brown, W.J., Kohlwein, S.D., Henry, S.A. (2008) A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. *J. Biol. Chem.* **283** (37), 25735-25751.

**G**ibbons, W., Hughes, S. (2011) Integrated biorefineries with engineered microbes and high-value co-products for profitable biofuels production. **U**: *Biofuels* (Tomes, D., Lakshmanan, P., Songstad, D., ured.), Springer, New York, str. 265-283.

**G**rba, S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Plejada, Zagreb.

**G**rillo, M.A., Colombatto, S. (2008) S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids* **34** (2), 187–193.

**H**ahn-Hägerdal, B., Pamment, N. (2004) Microbial pentose metabolism. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **116** (1), 1207–1209.

**H**e, J., Deng, J., Zheng, Y. , Gu, J. (2006) A synergistic effect on the production of S-adenosyl-l-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of *S*-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine-*β* synthase. *J. Biotechnol.* **126** (4), 519-527.

**H**enneberry, A.L., Sturley, S. L. (2005) Sterol homeostasis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Seminars Cell Develop. Biol.* **16**, 155 -161.

**H**ensing, M.C.M., Rouwenhorst, R.J., Heijnen, J.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1995) Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **67** (3), 261–279.

**H**uang, E.L., Lefsrud, M.G. (2012) Temporal analysis of xylose fermentation by *Scheffersomyces stipitis* using shotgun proteomics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39** (10), 1507-1514.

**I**zu, H., Shobayashi, M., Manabe, Y., Goto, K., Iefuji, H. (2006) S-adenosylmethionine (SAM)-accumulating sake yeast suppresses acute alcohol-induced liver injury in mice. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **70** (12), 2982-2989.

**J**effries, T. W., VanVleet, J. V. (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics and gene cluster. *FEMS Yeast Res*. **9**, 793-807.

**J**eppsson, H., Alexander, N.J., Hahn-Hägerdal, B. (1995) Existence of cyanide-insensitive respiration in the yeast *Pichia stipitis* and its possible influence on product formation during xylose utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2596–2600.

**J**eppsson, M., Johansson, B., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F. (2002) Reduced oxidative pentose pathway flux in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1604–1609.

**J**ohnson, E. A., Echavarri-Erasun, C. (2011) Yeast biotechnology. **U**: The Yeasts-A Taxonomic Study, 5. izd, (Kurtzman,C., Fell, J.W., Boekhout, T., ured.), Elsevier, **1**, str. 21.-44.

**K**linner, U., Fluthgraf, S., Freese, S., Passoth, V. (2005) Aerobic induction of respirofermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*.**67**, str. 247–253.

**K**rižanović, S., Butorac, A., Mrvčić, J., Krpan, M., Cindrić, M., Bačun-Družina, V., Stanzer, D. (2015) Characterization of a *S*-adenosyl-L-methionine (SAM)-accumulating strain of *Scheffersomyces stipitis*. *Int. Microbiol.* **18** (2), 117-125.

**K**uhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P., Singh, A., Zhang, Y. H. P. (2011) Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renew. Sust. EnerG. Rev.*, **15** (9), 4950-4962.

**K**urtzman, C. P. (1990) *Candida shehatae* - genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **57**, 215-222.

**K**urtzman, C.P., Suzuki, M., (2010) Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* **51**, 2-14.

**L**ages, F., Silva-Graça, M., Lucas, C. (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* **145** (9), 2577-2585.

**L**auruengtana, V., Yanagita, A., Neoh, T. L., Furuta, T., Kanai, M., Iefuji, H., Yoshii, H. (2010) Formation of spray-dried powder of *S*-adenosyl-L-methionine. *Biotechnol. J.* **5** (5), 470-476.

**L**eber, R., Zinser, E., Zellnig, G., Paltauf, F., Daum, G. (1994) Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10** (11), 1421-1428.

**L**ees, N. D., Bard, M. (2004) Sterol biochemistry and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **U**: Lipid metabolism and membrane biogenesis (Daum, G., ured.). Springer, Berlin/Heidelberg, str. 213-240.

**L**ees, N. D., Lofton, S. L., Woods, R. A., Bard, M. (1980) The effects of varied energy source and detergent on the growth of sterol mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **118** (1), 209-214.

**L**efebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., Fontagne-Faucher, C. (2002) Simultaneous HPLC Determination of Sugars, Organic Acid and Ethanol in Sourdongh Process. *Lebeusm. Wiss.Technol.* **35**, 407-414.

**L**i, W., Ye, S., Luo, K., Ge, F., Du, L., Wu, K., Ding, C. (2007) Isolation and characterisation of *Candida* sp. mutants enriched in *S*-adenosylmethionine (SAM). *Ann. Microbiol.* **57** (3), 383-387.

**L**ieber, C.S., Packer, L. (2002) *S*-Adenosylmethionina: molecular, biological, and clinical aspect-an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 1148-1150.

**L**in, J. P., Tian J., You, J. F, Jin, Z. H., Xu, Z. N, Cen, P. L. (2004) An effective strategy for co-production of *S*-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. *Biochem. Eng. J.* **21**, 19-25.

**L**inder, T. (2012) Genomics of alternative sulfur utilization in ascomycetous yeasts. *Microbiology*, **158** (10), 2585-2597.

**L**u, S. C., Mato, J. M. (2012) *S*-adenosyl-L-methionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol. Rev.* **92** (4), 1515-1542.

**L**u, S.C. (2000) *S*-adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 391–5.

**M**arić, V. (2000) Biotehnologija i sirovine, Inter Nos d.o.o., Zagreb, str. 57-138.

**M**artínez-López, N., Varela-Rey, M., Ariz, U., Embade, N., Vazquez-Chantada, M., Fernandez-Ramos, D., Martinez-Chantar, M. L. (2008) S-adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets. *Biochem. Soc. T.* **36** (5), 848-852.

**M**eyrial, V., Delgenes, J. P., Romieu, C., Moletta, R., Gounot, A. M. (1995) Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. *Enzyme Microb. Technol.* **17** (6), 535-540.

**M**incheva, K., Kamburova, V., Balutzov, V. (2002) Production of *S*-adenosyl-L-methionine by a mutant strain of *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Lett.* **24** (12), 985-988.

**M**odugu, P. (2013). Fermentative production of ethanol fuel from domestic waste by *Pichia stipitis*. *Int. J. Pharm. Biosci. Technol*. **1**, 50-53.

**M**udd, S.H., Poole, J.R. (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* **24**, 721–735.

**N**igam, J.N. (2002) Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J. Biotechnol*. **97** (2), 107–116.

**O**choa-Estopier, A., Lesage, J., Gorret, N., Guillouet, S. E. (2011) Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. *Bioresource. Technol.* **102** (2), 1521-1527.

**P**assoth, V., Hahn–Hägerdal, B. (2000) Production of a heterologous endo-1, 4-β-xylanase in the yeast *Pichia stipitis* with an O 2-regulated promoter. *Enzyme. Microb. Tech.* **26** (9), 781-784.

**P**ichler, H., Riezman, H. (2004) Where sterols are required for endocytosis. *BBA-Biomembranes,* **1666** (1), 51-61.

**S**hen, B., Hohmann, S., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol.* **121** (1), 45-52.

**S**hiozaki, S., Shimizu, S., Yamada, H. (1984) Unusual intracellular accumulation of *S*-adenosyl-L-methionine by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2293-2300.

**S**hiozaki, S., Shimizu, S., Yamada, H. (1989) *S*-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces sake*: Optimization of the culture conditions for the production of cells with a high S-adenosyl-Lmethionine content. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3269-3274.

**S**lavica, A. (2016) Predavanja iz predmeta Fiziologija industrijskih mikroorganizama. Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, PBF - Prehrambeno-biotehnološki fakultet, <http://www.pbf.unizg.hr/content/download/28775/111800/version/1/file/FIM_predavanja_III_dio.pdf Pristupljeno 20.05.2016>.

**S**lininger, P. J., Dien, B. S., Gorsich, S. W., Liu, Z. L. (2006) Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Appl.Microbiol. Biot.* **72** (6), 1285-1296.

**S**uh, S.O., Marshall, C.J., McHugh, J.V., Blackwell, M. (2003) Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylosefermenting gut yeasts. *Mol. Ecol*. **12**, 3137–3145.

**S**vetec, I.K., Zgaga, Z. (2010) Genetika kvasaca i primjena genetičkih istraživanja u oplemenjivanju industrijskih kvasaca. **U**: Kvasci u biotehnologiji ( Grba, S., ured.), Plejada d.o.o., Zagreb, str. 19-41.

**S**vihla, G., Schlenk, F. (1959) *S*-adenosylmethionine in the vacuole of *Candida utilis. J. Bacteriol.* **76**, 841-848.

**T**ehlivets, O., Hasslacher, M., Kohlwein, S.D. (2004) *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis. *FEBS Lett.* **577** (3), 501-506.

**T**oman, P.D., Chisholm, G., McMullin, H., Giere, L.M., Olsen, D.R., Kovach, R.J., Leigh, S.D., Fong, B.E., Chang, R., Daniels, G.A., Berg, R.A. and Hitzeman, R.A. (2000) Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. **275**, 23303–23309.

**T**rinder, P. (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*. **6**, 24-27.

**U**scanga, M. A., Delia, M. L., Strehaiano, P. (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biot.* **61** (2), 157-162.

**V**alko, K., Snyder, L.R., Glajch, J.L. (1993) Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. *Jour. Chrom.* **656**, 501-520.

**V**an der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W. N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. rev.* **59** (2), 304-322.

**V**illa-García, M.J., Choi, M.S., Hinz, F.I., Gaspar, M.L., Jesch, S.A., Henry, S.A. (2011) Genome-wide screen for inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* implicates lipid metabolism in stress response signaling. *Mol. Genet. Genomics **285*** (2), 125-149.

**W**alker, G. M. (2009) Yeasts. **U**: Desk Encyclopedia of Microbiology, 2. izd., (Schaechter, M., ured.) Elsevier Inc., Dundee, str. 1174-1189.

**W**ang, Z.X., Zhuge, J., Fang, H., Prior, B.A. (2001) Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv*. **19**, 201–223.

**Y**u, P., Shen, X. (2012) Enhancing the production of *S*-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* GS115 by metabolic engineering. *AMB Express* **2** (1), 1-7.