

# Robiotički i postbiotički potencijal kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12

---

**Agičić, Valerija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:512702>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

Valerija Agičić

**PROBIOTIČKI I POSTBIOTIČKI  
POTENCIJAL KVASCA**

***Kluyveromyces marxianus* DS12**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jadranke Frece, te uz pomoć dr. sc. Denija Kostelca.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jadranki Frece na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem asistentu dr. sc. Deniju Kostelcu na nesebičnoj pomoći, ukazanom povjerenju te mnogim vrijednim savjetima kojima mi je olakšao izvođenje i pisanje ovog diplomskog rada. Vaše stručno vođenje, strpljenje i neprocjenjivi savjeti bili su temelj za realizaciju ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se na svakom satu koji ste odvojili da mi pomognete, na konstruktivnim kritikama koje su me poticale da budem bolja i na neprestanoj podršci koju ste mi pružali tijekom cijelog procesa istraživanja i pisanja. Hvala vam što ste bili uzor, vodič i pouzdan oslonac u ovom važnom segmentu mog obrazovanja.*

*Također želim iskazati svoju duboku zahvalnost dvjema izvanrednim tehničarkama, Ines Kuk i Vesni Jurišević. Vaša stručna pomoć, savjeti i podrška bili su ključni u izradi ovog diplomskog rada. Osim profesionalne pomoći, zahvaljujem vam se i na dragocjenom prijateljstvu, osjećaju zajedništva i brojnim razgovorima koji su obogatili moje studentske dane. Vaša predanost poslu, entuzijazam i iskrenost ostavili su dubok trag na mom akademskom putovanju. Hvala vam što ste bili moj oslonac i inspiracija tijekom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i svojim roditeljima Diani i Zvonku koji su uvijek vjerovali u mene i bili mi najveća potpora kako u životu tako i tijekom mojih studentskih dana. Zajedno smo prošli kroz mnoge izazove, radosti i teškoće, a vaša vjera u mene nikada nije posustajala. Ova diploma je i rezultat vašeg odricanja, mudrih savjeta i poticaja. Bez vas, ovaj put ne bi bio isti. Hvala vam što ste mi uvijek bili najčvršći oslonac i što ste vjerovali u mene čak i onda kada sam sumnjala u sebe. Volim vas i zauvijek ću biti zahvalna na svemu što ste učinili za mene.*

*Hvala i mojoj baki Milki na svim trenucima kada si bila moje utočište, na svakom savjetu koji si mi dala i na bezuvjetnoj ljubavi kojom si me obasipala.*

*Na kraju, ali nikako po važnosti posljednje, želim se zahvaliti svojim dragim prijateljima. Hvala vam što ste bili moj oslonac, smijeh i utočište u najtežim trenucima tijekom studiranja. Zajedno smo se borili, učili, proslavljali male i velike pobjede, a vaša podrška i razumijevanje učinili su ovaj put nezaboravnim. Hvala vam što ste uvijek bili tu, za duge razgovore, kavice, učenje u noćnim satima i sve one trenutke koji su činili studiranje posebnim. Bez vas, ovaj put ne bi bio isti. Ova diploma nije samo moj uspjeh, već i odraz vaše neizmjerne podrške i vjere u mene.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PROBIOTIČKI I POSTBIOTIČKI POTENCIJAL KVASCA *Kluyveromyces marxianus* DS12

Valerija Agičić, univ. bacc. nutr. 0058213499

**Sažetak:** U nastojanju da se proširi spektar istraženih i dokumentiranih probiotičkih sojeva, istraživanja probiotičkog potencijala u poboljšanju zdravlja crijevne mikrobiote i jačanju imunskog sustava temelj su boljeg razumijevanja probiotičkog koncepta i razvoja novih probiotičkih proizvoda. Ovaj diplomski rad istražuje probiotički i postbiotički potencijal soja *Kluyveromyces marxianus* DS12, evaluirajući niz funkcionalnih parametara važnih za njegovu primjenu u probiotičkim formulacijama. Antimikrobna svojstva soja ispitana su protiv širokog spektra patogena, a analizirana je i sposobnost formiranja biofilмова, ključna za preživljavanje i kolonizaciju u crijevnim uvjetima. Autoagregacijske i koagregacijske karakteristike ocijenjene su kako bi se utvrdila interakcija soja s crijevnom mikrobiotom, a antioksidacijski potencijal ispitivan je kroz sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala. Utvrđena je i hemolitička aktivnost te reakcija na oksidacijski stres, kao i sposobnost soja da održi vitalnost u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Rezultati ovih sveobuhvatnih analiza pružaju temelj za daljnju primjenu soja *K. marxianus* DS12 kao probiotičkog agensa u funkcionalnoj hrani i terapiji. Rezultati provedenih eksperimenata potvrđuju da soj *Kluyveromyces marxianus* DS12 posjeduje obećavajuće karakteristike potrebne za kvalitetnog probiotičkog kandidata, a uz daljnje temeljite analize, ističe se i potencijal za postbiotičke aplikacije.

**Ključne riječi:** *probiotici, postbiotici, kvasci, Kluyveromyces marxianus, mikrobiota*

**Rad sadrži:** 60 stranica, 20 slika, 2 tablice, 78 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Deni Kostelac

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jadranka Frece (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 29. studenog 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**  
**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular biotechnology

PROBIOTIC AND POSTBIOTIC POTENTIAL OF THE YEAST *Kluyveromyces marxianus* DS12

*Valerija Agičić, univ. bacc. nutr. 0058213499*

**Abstract:** In the effort to expand the spectrum of probiotic strains, the investigation of probiotic potential in enhancing gut microbiota health and strengthening the immune system is foundational for a better understanding of the probiotic concept and the development of new probiotic products. This thesis investigates the probiotic and postbiotic potential of the *Kluyveromyces marxianus* DS12 strain, evaluating a range of functional parameters important for its application in probiotic formulations. The antimicrobial properties of the strain were tested against a broad spectrum of pathogens, and its ability to form biofilms, crucial for survival and colonization in the gut conditions, was analyzed. Auto-aggregation and co-aggregation characteristics were assessed to determine the strain's interaction with the gut microbiota, and antioxidant potential was examined through the ability to neutralize DPPH free radicals. Hemolytic activity and response to oxidative stress were also determined, as well as the strain's ability to maintain viability in simulated gastrointestinal conditions. The results of these comprehensive analyses provide a basis for the further application of the *K. marxianus* DS12 strain as a probiotic agent in functional foods and therapy. The outcomes of the conducted experiments confirm that the *Kluyveromyces marxianus* DS12 strain possesses promising characteristics needed for a quality probiotic candidate, and with further in-depth analyses, its potential for postbiotic applications is also highlighted.

**Keywords:** *probiotics, postbiotics, yeasts, Kluyveromyces marxianus, microbiota*

**Thesis contains:** 60 pages, 20 figures, 2 tables, 78 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *Jadranka Frece, PhD, Full professor*

**Technical support and assistance:** *Deni Kostelac, PhD, Research Associate*

### Reviewers:

1. Ksenija, Markov, PhD, Full professor (president)
2. Jadranka, Frece, PhD, Full professor (mentor)
3. Jasna, Mrvčić, PhD, Full professor (member)
4. Andreja, Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** November 29<sup>th</sup>, 2023

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....  | 2  |
| <b>2.1. KVASAC <i>Kluyveromyces marxianus</i></b> .....  | 2  |
| <b>2.2. TAKSONOMIJA I FIZIOLOGIJA <i>Kluyveromyces marxianus</i></b> .....                                   | 3  |
| <b>2.3. UPOTREBA <i>Kluyveromyces marxianus</i> U BIOTEHNOLOGIJI I<br/>    PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI</b> ..... | 4  |
| 2.3.1. Proizvodnja etanola uz pomoć <i>K. marxianus</i> .....  | 5  |
| 2.3.2. Upotreba <i>K. marxianus</i> u mliječnoj industriji.....  | 7  |
| 2.3.3. Proizvodnja enzima uz pomoć <i>K. marxianus</i> .....   | 8  |
| 2.3.3.1. Inulinaze .....   | 8  |
| 2.3.3.2. $\beta$ -galaktozidaze .....  | 10 |
| 2.3.3.3. Lipaze .....  | 11 |
| 2.3.4. Proizvodnja jednostaničnih proteina uz pomoć <i>K. marxianus</i> .....                                | 13 |
| 2.3.5. Probiotička uloga <i>K. marxianus</i> .....   | 14 |
| 2.3.6. Prednosti kvasaca kao probiotika u odnosu na bakterijske probiotičke sojeve .....                     | 16 |
| 2.3.7. Postbiotici i njihova primjena .....  | 18 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....  | 22 |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....   | 22 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizmi .....  | 22 |
| 3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije .....   | 22 |
| 3.1.2.1. Hranjive podloge.....   | 22 |
| 3.1.2.2. Kemikalije .....  | 23 |
| 3.1.3. Uređaji .....   | 24 |
| 3.1.4. Pribor .....  | 25 |
| <b>3.2. METODE</b> .....   | 25 |
| 3.2.1. Uzgoj mikroorganizma i frakcioniranje metabolita .....  | 25 |
| 3.2.2. Antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenima .....   | 26 |
| 3.2.3. Određivanje autoagregacijske sposobnosti kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                  | 27 |
| 3.2.4. Određivanje koagregacijske sposobnosti kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                    | 28 |
| 3.2.5. Ispitivanje preživljavanja kvasca u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta<br>.....          | 28 |
| 3.2.5.2. Priprava simuliranog soka tankog crijeva .....  | 29 |
| 3.2.6. Sposobnost formiranja biofilmova .....  | 29 |
| 3.2.7. Određivanje rasta stanica u uvjetima oksidacijskog stresa .....                                       | 30 |



|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.8. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala .....                       | 31        |
| 3.2.9. Određivanje hemolitičke aktivnosti.....                                   | 32        |
| 3.2.10. Obrada podataka.....   | 32        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST <i>Kluyveromyces marxianus</i> DS12.....</b>      | <b>34</b> |
| <b>4.2. ODREĐIVANJE HEMOLITIČKE AKTIVNOSTI.....</b>                              | <b>38</b> |
| <b>4.3. SPOSOBNOST <i>Kluyveromyces marxianus</i> DS12 DA FORMIRA BIOFILMOVE</b> | <b>39</b> |
| <b>4.4. SPOSOBNOST AUTOAGREGACIJE I KOAGREGACIJE</b> 4.4.1.                      |           |
| Autoagregacijske sposobnosti kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....         | 41        |
| 4.4.2. Koagregacijske sposobnosti kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....    | 42        |
| <b>4.5. ODREĐIVANJE RASTA <i>Kluyveromyces marxianus</i> U UVJETIMA</b>          |           |
| <b>OKSIDACIJSKOG STRESA.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.6. ODREĐIVANJE STUPNJA PREŽIVLJENJA U SIMULIRANIM UVJETIMA</b>              |           |
| <b>PROBAVNOG TRAKTA.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>4.7. SPOSOBNOST UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA .....</b>                  | <b>49</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>   | <b>53</b> |

# 1. UVOD

Kvasci su jednostanični mikroorganizmi koji su tijekom stoljeća postali neophodni saveznici čovječanstva u različitim industrijskim procesima. Pripadajući carstvu Fungi, kvasci su odigrali ključnu ulogu u proizvodnji hrane i pića, uključujući pivo, vino, kruh i mnoge druge proizvode. Osim svojih tradicionalnih uloga, kvasci su postali ključni alati u biotehnološkim istraživanjima i primjenama, bilo da je riječ o proizvodnji bioetanol, farmaceutskih proizvoda ili genetičkom inženjerstvu.

*Kluyveromyces marxianus* jedinstvena je vrsta kvasca koja pokazuje niz atraktivnih osobina za industrijsku upotrebu. Njegova sposobnost da fermentira laktozu te njegova termostabilnost čine ga posebno zanimljivim za različite sektore, od mliječne industrije do proizvodnje biogoriva.

U doba kada se sve veći naglasak stavlja na traženje održivih alternativa u proizvodnji i potrošnji energije, biotehnološka svojstva kvasaca poput *K. marxianus* postaju sve relevantnija. Njegova sposobnost da iskoristi nusproizvode iz drugih industrijskih procesa, poput sirutke u mliječnoj industriji, čini ga ključnim igračem u cirkularnoj ekonomiji. Uz to, prilagodljivost i otpornost *K. marxianus* na širok raspon uvjeta stresa čine ga idealnim kandidatom za istraživanje unaprjeđenja postojećih fermentacijskih procesa (Karim i sur., 2020).

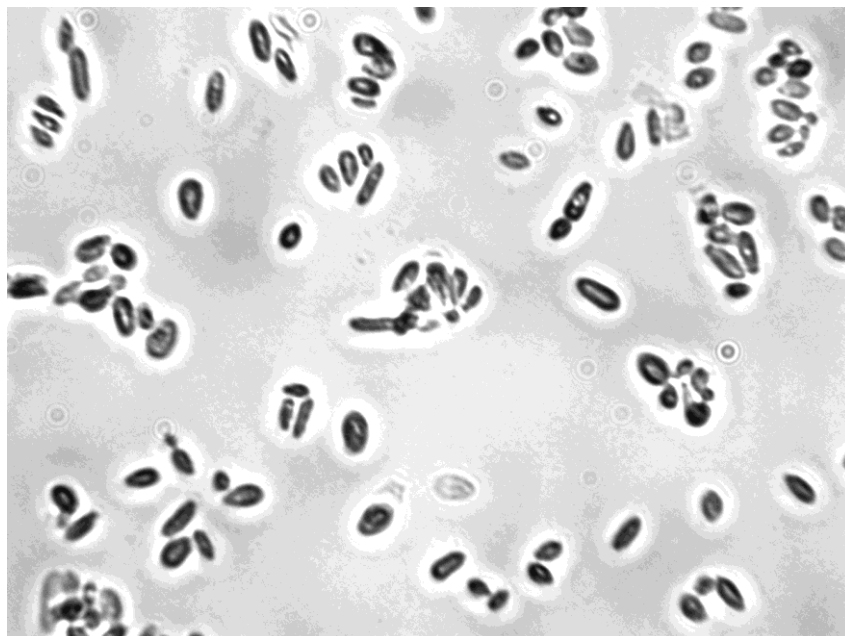
Kroz ovaj rad, osim razmatranja specifičnih svojstava *K. marxianus*, važno je također naglasiti važnost kvasaca u širem kontekstu biotehnologije i njihovu ključnu ulogu u budućim znanstvenim i industrijskim inovacijama proučavajući njihove biološke karakteristike te potencijalne primjene. Kroz detaljnu analizu, nastojalo se istražiti kako ova jedinstvena vrsta kvasca može doprinijeti održivijem i učinkovitijem društvu, istovremeno pružajući dublje razumijevanje njegovih bioloških svojstava.

Cilj ovog rada bio je utvrditi u kojoj mjeri i na koji način odabrane karakteristike doprinose profiliranju soja *Kluyveromyces marxianus* DS12 kao potencijalno povoljnog kandidata za probiotičku i postbiotičku upotrebu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KVASAC *Kluyveromyces marxianus*

Kvasci iz roda *Kluyveromyces* imaju GRAS status koji ih čini sigurnim mikroorganizmima (Generally Regarded As Safe) pa se stoga oni široko primjenjuju u raznim industrijama i mnogim biotehnološkim procesima (Grba, 2010). Sojevi koji pripadaju vrsti kvasca *Kluyveromyces marxianus* izolirani su iz velikog broja staništa, što rezultira velikom metaboličkom raznolikošću i značajnim stupnjem intraspecijskog polimorfizma. Kao posljedica toga, istraženo je nekoliko različitih biotehnoloških primjena tog kvasca: proizvodnja enzima ( $\beta$  galaktozidaza,  $\beta$ -glukozidaza, inulinaza, poligalakturonaza), jednostaničnih proteina, aromatskih spojeva i etanola (fermentacija). Također je pokazao potencijal u smanjivanju sadržaja laktoze u prehrambenim proizvodima, proizvodnji bioloških molekula, bioremedijaciji te je pogodan domaćin za proizvodnju heterolognih proteina. U usporedbi s njegovim srodnikom i modelnim organizmom, *Kluyveromyces lactis*, akumulirano znanje o *Kluyveromyces marxianus* je značajno manje. Predviđa mu se velika biotehnološka budućnost zbog njegovih kvaliteta kao što su širok raspon supstrata, termorezistencija, visoka stopa rasta i manja sklonost fermentaciji, u odnosu na *Kluyveromyces lactis*, kada je izložen velikim količinama šećera (Fonseca i sur., 2008). Izgled stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* prikazan je na slici 1.



**Slika 1.** Izgled stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* (UC Davis, 2018)

## 2.2. TAKSONOMIJA I FIZIOLOGIJA *Kluyveromyces marxianus*

*K. marxianus* je prvi put identificiran kao kvasac koji pripada rodu *Saccharomyces* i bio je imenovan kao *S. marxianus*. Ovaj mikroorganizam je izoliran iz sladovine, piva i grožđa. Vrsta je potom preimenovana u rod *Kluyveromyces* i od tada je u ovaj rod klasificirano čak 45 vrsta. Najbliži srodnik *K. marxianus* je kvasac *Kluyveromyces lactis*, koji se koristi u mliječnoj industriji za proizvodnju fermentiranog mlijeka poput kefira i kumisa. Osim toga, i *Kluyveromyces* i *Saccharomyces* smatraju se dijelom *Sacchromyces* kompleksa, podskupine *Saccharomycetes*.

*K. marxianus* je poznat zbog toga što ga se često povezuje s tradicionalnim mliječnim proizvodima kao što su fermentirano mlijeko, kefir, jogurt, sir i slično. To je mliječni kvasac koji je također prethodno opisivao sinonimima u znanstvenoj literaturi, posebno *K. fragilis* i *S. keyfr*. *Kluyveromyces* je rod unutar *Hemiascomycetous* kvasaca i sadrži šest opisanih vrsta koje se pridržavaju preklasifikacije u monofiletske rodove na temelju sekvence 26S rDNA, od kojih su dvije vrste, *K. lactis* i *K. marxianus*, vrlo istaknute. Glavna popularna obilježja *K. marxianus* i *K. lactis* su njihova sposobnost asimilacije laktoze i korištenja ovog šećera kao izvora ugljika. Ovo je jedna od najvažnijih značajki koja ih razlikuje od *S. cerevisiae*, koja nema ovaj fenotip. Kao rezultat toga, smatraju se kvascima pozitivnima za laktozu i nose par gena *LAC12-LAC4* koji je odgovoran za unos i naknadno cijepanje laktoze u galaktozu i glukozu (Lane i Morrissey, 2010).

Iskorištavanje laktoze kao izvora ugljika je jedno od dugo razmatranih obilježja *K. marxianus*, zanimljivo je da većina, ali ne svi, sojevi *K. marxianus* efikasno metaboliziraju laktozu. To je zbog polimorfizama u *lac12* genu, koji je odgovoran za kodiranje permeaze za transport molekula laktoze u stanicu. Općenito, *lac12* kodira permeazu za laktozu koja je neophodna za unos laktoze u stanicu, dok *lac4* kodira  $\beta$ -galaktozidazu, koja je odgovorna za hidrolizu laktoze u monomere, galaktozu i glukozu. Iako evolucijska povijest para gena *lac12-lac4* nije dovoljno jasna, njihova regulacija je dobro ugrađena u Gal4p/Gal80p sustav, koji je sveobuhvatno istražen u *S. cerevisiae* (Lane i Morrissey, 2010).

*K. marxianus* je kvasac čiji je metabolizam respiratorno-fermentativnog tipa, sličan onome *S. cerevisiae* koji se široko koristi u pivarstvu i proizvodnji kruha. Dakle, *K. marxianus* proizvodi energiju putem TCA ciklusa i oksidativne fosforilacije, kao i fermentacijom šećera u etanol.

U odnosu na *S. cerevisiae*, snažno slijedi put prema fermentaciji pri visokoj koncentraciji šećera čak i u aerobnim uvjetima, što ukazuje na to da stanica preferencijalno usmjerava piruvat prema

proizvodnji etanola. Ovaj fenomen se naziva Crabtree efekt. Zbog snažnih Crabtree-pozitivnih karakteristika *S. cerevisiae*, obično mu je potrebna regulirana opskrba izvorom ugljika kako bi izbjegao fermentativni metabolizam, što je izrazito nepoželjno pri proizvodnji kvašćeve biomase. Nasuprot tome, *K. marxianus* i *K. lactis* tradicionalno se kategoriziraju kao Crabtree-negativni, što bi upućivalo na nesposobnost za efikasnu fermentaciju šećera u etanol (Karim i sur., 2020).

No u ovom kontekstu vrijedi spomenuti da postoje neka proturječna izvješća u literaturi o "Crabtree statusu" *K. marxianus* i *K. lactis*. Prevladavajuća izvješća o primjeni u proizvodnji etanola sugeriraju da obje vrste nose gene potrebne za proizvodnju etanola i mogu fermentirati pod određenim uvjetima. Međutim, u nekim istraživanjima je ipak pokazano da *K. marxianus* pokazuje snažnu Crabtree-negativnu svojstvenost i to je podržano činjenicom da ne proizvodi etanol, za razliku od onoga što je uglavnom zapaženo u slučaju *S. cerevisiae* koji je poznat kao veliki proizvođač etanola ili *K. lactis* u manjoj mjeri (Karim i sur., 2020).

Ovo očigledno proturječno stajalište vjerojatno je posljedica varijabilnosti sojeva, budući da su većina komparativnih studija kvasaca koristila samo jedan reprezentativni soj svake vrste, a razina fiziološke varijacije unutar vrste nije ocijenjena. Može se zaključiti da postoji visoki stupanj razlika unutar vrsta ovog kvasca, ne samo u pogledu genetike, već i njegove fiziologije (Lane i Morrissey, 2010).

### **2.3. UPOTREBA *Kluyveromyces marxianus* U BIOTEHNOLOGIJI I PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI**

*Kluyveromyces marxianus* je termotolerantni kvasac te se kao takav koristi u različitim industrijskim i biotehnološkim procesima:

- Proizvodnja etanola: Zbog svoje sposobnosti fermentacije širokog spektra šećera na povišenim temperaturama, *K. marxianus* se često istražuje kao kandidat za proizvodnju bioetanola, posebno u procesima koji koriste lignocelulozne sirovine.
- Mliječnoj industriji: *K. marxianus* se tradicionalno povezuje s fermentiranim mliječnim proizvodima, gdje može doprinijeti specifičnom okusu i teksturi proizvoda poput kefira.

- Proizvodnja enzima: *K. marxianus* se koristi za proizvodnju različitih industrijski važnih enzima, poput invertaze,  $\beta$ -galaktozidaze i fitaze.
- Sinteza bioaktivnih spojeva: *K. marxianus* može se koristiti za proizvodnju bioaktivnih spojeva poput poliola, vitamina i peptida.
- Bioremedijacija: Postoji interes za korištenje *K. marxianus* u bioremedijacijskim procesima, posebno za tretiranje industrijskih otpadnih voda koje sadrže visoke koncentracije šećera ili drugih organskih spojeva.
- Proizvodnji jednostaničnih proteina (engl. *single-cell proteina, SCP*): *K. marxianus* se također može koristiti za proizvodnju jednostaničnih proteina kada se uzgaja na otpadnim produktima ili nusproizvodima iz različitih industrija.
- Proizvodnji bioplastike: Postoji potencijal za korištenje *K. marxianus* u biosintezi polihidroksialkanoata (PHA), skupine bioplastika.

### 2.3.1. Proizvodnja etanola uz pomoć *K. marxianus*

Etanol, poznat i kao etil alkohol, je industrijski alkohol čija je primjena rasprostranjena široko diljem svijeta. S obzirom na očekivane nedostatke fosilnih goriva i ekološke izazove povezane s njihovom upotrebom, postoji velika potražnja za održivim izvorima biogoriva gdje bi svoj potencijal upravo mogao pokazati bioetanol (slika 2).

Bioetanol je etanol koji se proizvodi od biomase i/ili nekog biorazgradivog (celuloznog) otpada najčešće fermentacijom šećera iz biljnih izvora koristeći kvasce ili bakterije. Organski materijali iz kojih se proizvodi bioetanol su šećerna trska, kukuruz, ječam, pšenica, šećerna repa te druge biljke bogate šećerom ili škrobom.

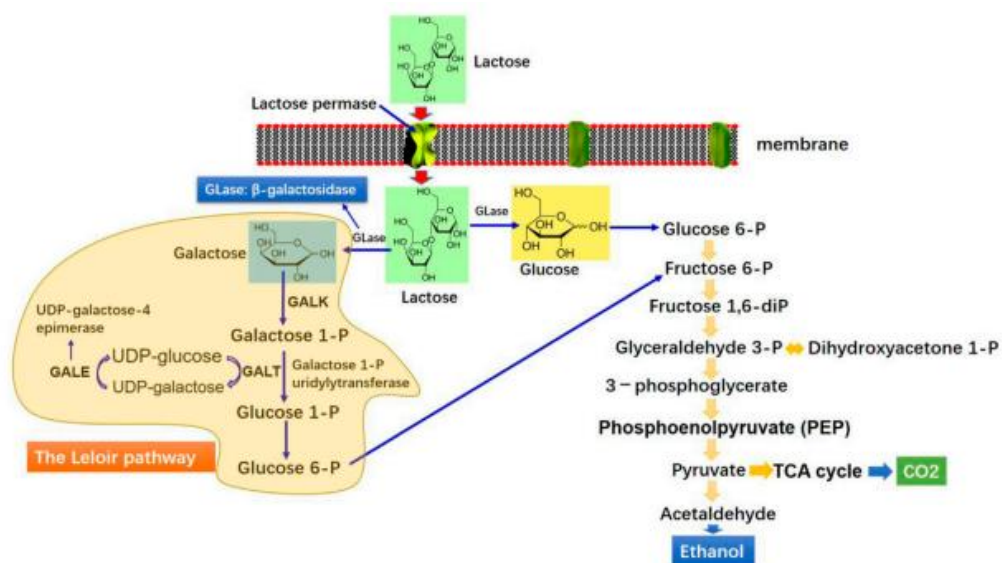
Prema Hahn-Hägerdal i sur. (2006) upravo neki sojevi *K. marxianus* pokazuju veliki potencijal kod proizvodnje bioetanola zbog svojih svojstava poput:

- Termotolerancije: Jedna od ključnih prednosti upotrebe *K. marxianus* je njegova termotolerantnost. Većina kvasaca optimalno fermentira na temperaturama između 20

°C i 30 °C. Međutim, *K. marxianus* može fermentirati na temperaturama i do 45 °C ili više. Ova svojstva smanjuju rizik od kontaminacije drugim mikroorganizmima koji ne mogu preživjeti na tim temperaturama te smanjuju potrebu za hlađenjem tijekom fermentacije, što može smanjiti troškove proizvodnje.

- Fermentacije šećera: *K. marxianus* ima sposobnost fermentirati širok spektar šećera, uključujući one prisutne u lignoceluloznim biomaterijalima, kao što su poljoprivredni ostaci. Ovo je ključno za iskorištavanje neiskorištenih ili otpadnih izvora biomase za proizvodnju etanola.
- Brzine rasta: U usporedbi s nekim drugim kvascima, *K. marxianus* često pokazuje brži rast, što može skratiti vrijeme potrebno za fermentacijske cikluse i na taj način ubrzati procese proizvodnje te smanjiti troškove iste.
- Lignoceluloznih materijala: Mnoge su studije istraživale upotrebu *K. marxianus* za fermentaciju lignoceluloznih materijala, kao što su slama, kukuruzne stajljike i drugi poljoprivredni ostaci. Ovi materijali obično zahtijevaju prethodnu obradu kako bi se šećeri oslobodili za fermentaciju, ali kombinacija termotolerantnosti i širokog spektra fermentacije šećera čini *K. marxianus* posebno pogodnim za ovu primjenu.
- Održivost: Korištenjem otpadnih materijala, poput poljoprivrednih ostataka, za proizvodnju bioetanola, proces postaje održiviji.

Uz ove prednosti, postoji i niz tehničkih i ekonomskih izazova koje treba riješiti kako bi proizvodnja bioetanola s *K. marxianus* postala komercijalno održiva. Međutim, s obzirom na njegove jedinstvene prednosti, *K. marxianus* nastavlja privlačiti pažnju istraživača i industrije u potrazi za održivim metodama proizvodnje bioetanola (Hahn-Hägerdal i sur., 2006), no kao što je i ranije navedeno, postoje literaturne kontradikcije oko sposobnosti proizvodnje etanola što upućuje kako su potrebna daljnja istraživanja pojedinačnih sojeva s ciljem procjene sposobnosti *K. marxianus* u proizvodnji etanola.



**Slika 2.** Shematski prikaz kataboličkog puta laktoze i proizvodnje etanola kod *K. marxianus* (Hahn-Hägerdal i sur., 2006)

### 2.3.2. Upotreba *K. marxianus* u mliječnoj industriji

*K. marxianus* je tradicionalno povezan s fermentiranim mliječnim proizvodima poput kefira. Tijekom vremena, ovaj kvasac pridonio je karakterističnom okusu, teksturi i zdravstvenim prednostima mnogih fermentiranih mliječnih proizvoda širom svijeta. Jedna od ključnih prednosti *K. marxianus* u mliječnoj industriji je njegova sposobnost fermentacije laktoze. Mnogi ljudi imaju intoleranciju na laktozu ili je ne mogu potpuno probaviti. Kada *K. marxianus* fermentira laktozu, on je prevodi do etanola i ugljikovog dioksida, što može pomoći u smanjenju sadržaja laktoze u konačnom proizvodu. Tijekom te fermentacije, *K. marxianus* proizvodi različite metabolite koji doprinose jedinstvenim aromatskim profilima fermentiranih mliječnih proizvoda. To uključuje estere, alkohole i kiseline koje obogaćuju okus i aromu proizvoda.

Uz bakterije mliječne kiseline koje često sudjeluju u fermentaciji mliječnih proizvoda, *K. marxianus* može pomoći u razvoju željene teksture u nekim proizvodima, poput kefira. Proizvodnja ugljikovog dioksida tijekom fermentacije može dovesti do stvaranja karakterističnih mjehurića ili kremaste teksture. *K. marxianus*, poput mnogih drugih kvasaca i bakterija koji se koriste u fermentaciji, može imati probiotičke značajke. Iako istraživanja još uvijek traju, neki podaci sugeriraju da ovaj kvasac može imati povoljne učinke na crijevnu mikrobiotu i opće zdravlje (Karim i sur., 2020).



### 2.3.3. Proizvodnja enzima uz pomoć *K. marxianus*

*Kluyveromyces marxianus* smatra se sve popularnijim domaćinom za sintezu izvanstaničnih proteina zahvaljujući svojoj sposobnosti rasta na raznim jeftinim sirovinama, uključujući sirutku, melasu i nusproizvode proizvodnje lignoceluloznih sirovina (Fonseca i sur., 2008). Također je sposoban rasti na različitim polisaharidima, poput inulina i pektina (Hensing i sur., 1994). *K. marxianus* prirodno ima sposobnost proizvoditi enzime jer se svi složeni spojevi poput polisaharida mogu izvanstanično hidrolizirati u monomere. Rast *K. marxianus* na inulinu i saharozi događa se putem katalitičkog djelovanja izvanstaničnih enzima, uglavnom inulinaze (Rouwenhorst i sur., 1988). Razgradnja laktoze putem izlučivanja  $\beta$ -galaktozidaza obećavajuća je zbog istodobne sinteze biološki aktivnih sastojaka, biomase i industrijski važnih enzimskih biokatalizatora (Fonseca i sur., 2008).

#### 2.3.3.1. Inulinaze

Inulinaza se intenzivno koristi za hidrolizu inulina kod proizvodnje fruktoze, frukto-oligosaharida i bioetanola, koji su ključni sastojci u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Različiti mikrobnj sojevi, poput kvasca *K. marxianus*, filamentoznih fungi poput *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.* i bakterija poput *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas* koriste se za proizvodnju inulinaze. Ipak, *K. marxianus* se smatra najproduktivnijim domaćinom za proizvodnju inulinaze na komercijalnoj razini među svim sojevima mikroba koji proizvode inulinazu.

Nedavno je istražena biosinteza izvanstaničnih proteina *K. marxianus* koristeći medije koji sadrže razne šećere, poput ksiloze, glukoze i galaktoze. Inaktivacija *inu1* gena u DMKU3-1042 dovela je do usporenog rasta u mediju s inulinom upućujući da je u pitanju izvanstanični protein inulinaza. Među 16 analiziranih sojeva *K. marxianus*, šest sojeva proizvelo je višu razinu inulinaze u ksiloznom nego u mediju na bazi glukoze. Međutim, niža aktivnost promotora *inu1* u mediju s ksilozom nego u mediju s glukozom sugerira kontrolu povećane proizvodnje inulinaze na posttranskripcijski način. Kulture s više miješanja također su dovele do proizvodnje visokog titra inulinaze, što ukazuje na to da bi dopuna kisikom mogla utjecati na proizvodnju inulinaze. Sve u svemu, i ksilozna i opskrba kisikom poboljšavaju titar izvanstanične inulinaze.

Gen za inulinazu (*inul* gen) bio je prekomjerno izražen odnosno eksprimiran u *K. marxianus* kako bi se postigla hiperprodukcija inulinaze. Prekomjerno izražavanje postignuto je optimizacijom kodona nakon odabira odgovarajućeg promotora, a enzim inulinaza sintetiziran je načinom fermentacije visoke gustoće stanica.

Rezultati su pokazali da optimizacija kodona izvornog *inul* gena stvara genetički modificirani soj KM-N70 (koji sadrži optimizirani *inuln* gen) koji je bio sposoban sintetizirati visok titar inulinaze (251,4 Uml<sup>-1</sup>). Aktivnost inulinaze dosegla je 338,5 Uml<sup>-1</sup> pomoću rekonstrukcijskog soja KM-KN16 koji nosi optimizirani *inuln* gen s izvornim *tps1* promotorom iz *K. marxianus* KM-0. Soj KM-KN16 proizveo je 374,3 Uml<sup>-1</sup> inulinaze unutar 24 sata uzgoja, dok je titar inulinaze dosegao 896,1 Uml<sup>-1</sup> kod rekonstrukcijskog soja KM-KN16 tijekom fermentacije visoke gustoće stanica. Štoviše, preko 90 % inulina bilo je razgrađeno na glukozu i fruktozu u gomoljima ekstrakta Jeruzalemske artičoke djelovanjem inulinaze u roku od 8 sati. Ukupno, rezultati pokazuju da je rekonstrukcijski KM-KN16 najveći proizvođač inulinaze u odnosu na druge bakterijske, gljivične i kvasčeve sojeve.

Povećanjem koncentracije glukoze s 10 na 20 gL<sup>-1</sup>, aktivnost inulinaze kod *K. marxianus* KM-0 znatno je poboljšana; međutim, daljnje povećanje glukoze na 80 gL<sup>-1</sup> smanjilo je aktivnost inulinaze što bi moglo biti zbog represivnog učinka glukoze na biosintezu enzima. Transkripcijski represor Mig1 vjerojatno igra glavnu ulogu u represiji glukoze. Međutim, genetički modificirani *K. marxianus* KM-69 (s inaktiviranim *mig1* genom) dao je veći titar inulinaze (101,7 Uml<sup>-1</sup>) od ne-modificiranog soja *K. marxianus* KM-0 (84,3 Uml<sup>-1</sup>). Zbog pojačane ekspresije izvornog gena inulinaze iz KM-0 u KM-69 dodatno je poboljšalo titar inulinaze na 119,3 Uml<sup>-1</sup>. Za daljnje povećanje proizvodnje inulinaze kod kvasca, važno je ukidanje represije glukoze i prekomjerno izražavanje izvornog gena inulinaze. Nakon ometanja *mig1* gena u *K. marxianus* KM-0, genetički modificirani mutant koji ne reprimira glukozu (KM-69) dao je 94,6 Uml<sup>-1</sup> inulinaze u mediju na bazi inulina unutar 36 sati. Nakon toga, prekomjerno izražavanje izvornog gena inulinaze u mutantu KM-69 dodatno je povećalo razinu inulinaze (Bilal i sur., 2022).

Tijekom uzgoja u bioreaktoru od 10 L, modificirani soj KM-526 proizveo je 133,5 Uml<sup>-1</sup> u kratkom vremenskom razdoblju od 24 sata. Inulinaza koju izlučuje modificirani KM-526 učinkovito je katalizirala transformaciju inulina u monosaharide u usporedbi s derivatom *K. marxianus* KM-0. Stoga, ometanje *mig1* gena zajedno s prekomjernim izražavanjem izvornog *inul* gena ima smisla za povećanje prinosa inulinaze u *K. marxianus* KM-0 u kratkom

vremenskom razdoblju, što ukazuje na njegovu korisnost u prehrambenoj industriji (Bilal i sur., 2022).

### 2.3.3.2. $\beta$ -galaktozidaze

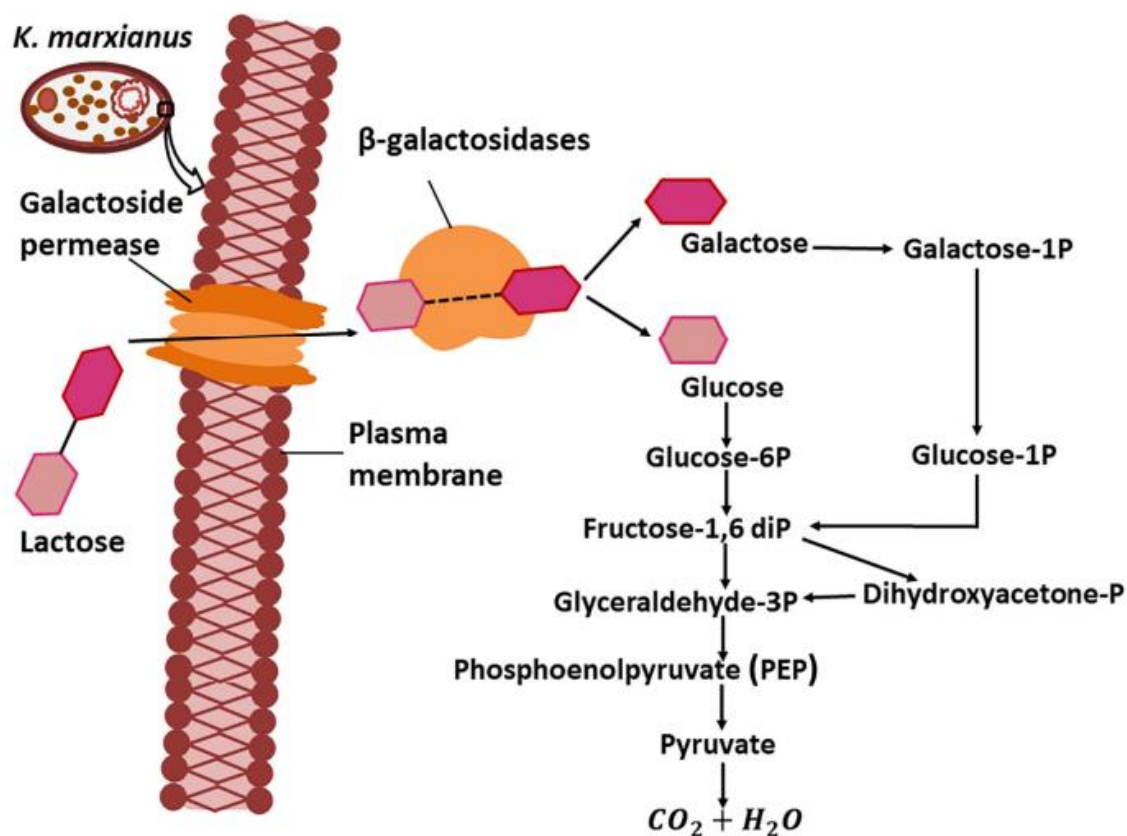
$\beta$ -galaktozidaze su među najšire korišteni biokatalizatori u prehrambenoj industriji. Također se nazivaju i laktazama koje sudjeluju u hidrolizi laktoze na monosaharide glukozu i galaktozu. Ovi enzimi imaju rasprostranjene primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i mogu se koristiti za saharifikaciju sirutke te tretiranje mlijeka s ciljem smanjenje količine laktoze u mlijeku (Singh i sur., 2016). Smanjenje laktoze prvenstveno je korisno za osobe s nasljednim poremećajima razgradnje laktoze, kao što su crnci u Srednjoj Africi, Brazilu i Sjedinjenim Američkim Državama (Bayless i sur., 2017).

Brojni različiti pristupi koji uključuju raznovrsne strategije uzgoja primijenjeni su za biosintezu  $\beta$ -galaktozidaza iz proteina sira i melase. Procesi povezani s preradom hrane poput hidrolitičke i transgalaktozne aktivnosti općenito se izvode upotrebom komercijalnih  $\beta$ -galaktozidaza (Pivarnik i sur., 1995). Enzimski posredovana hidroliza implicira se s ciljem smanjenja laktoze u mlijeku u prehrambenom sektoru, dok se transgalaktosilacija provodi za sintezu proizvoda koji sadrže galaktozu i galakto-oligosaharide (Oliveira i sur., 2011). Padilla i suradnici (2015) izvijestili su o uspješnoj proizvodnji laktuloznih oligosaharida putem izomerizacije transgalaktosilirane sirutke koristeći  $\beta$ -galaktozidaze iz *K. marxianus* i *K. lactis*.

Izražavanje  $\beta$ -galaktozidaza u *K. marxianus* regulirano je njegovim prirodnim induktorima, laktozom i galaktozom (slika 3). Unatoč tome, proizvodnja  $\beta$ -galaktozidaza ovisi o koncentraciji supstrata. Represivni mehanizam nametnut je učincima indukcije supstrata kada je soj izložen povećanoj razini D-glukoze ili laktoze, što je rezultiralo smanjenom aktivnošću  $\beta$ -galaktozidaza. To se može pripisati nakupljanju intermediarnog metabolita glikolize kada mikrobne stanice asimiliraju D-glukozu ili laktozu visokom brzinom (Martins i sur., 2002). Zhou i sur. (2013) primijetili su suzbijenu biosintezu  $\beta$ -galaktozidaze u prisutnosti glukoze; međutim, razina proizvodnje obnovljena je eliminacijom *mig1* gena. Nakon ometanja *mig1* gena, rezultirajući soj *K. marxianus* KM-15 akumulirao je visoku titraciju  $\beta$ -galaktozidaze u usporedbi s izvornim sojem. Pod optimiziranim uvjetima obrade, aktivnost galaktosidaze disruptanta KM-15 dosegla je  $121 \text{ Uml}^{-1}$  unutar 60 h. Fermentativni potencijal okare (sojinog ostataka) istražen je za proizvodnju  $\beta$ -glukozidaze od *K. marxianus*. Okara ili sojino meso je ostatak dobiven pri

proizvodnji sojinog mlijeka ili tofua. Utvrđeno je zatim da okara značajno inducira sintezu  $\beta$ -glukozidaze dostižući  $4,5 \text{ U mg}^{-1}$  pod optimalnim uvjetima fermentacije okare  $30 \text{ g L}^{-1}$ , temperatura  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , veličina inokuluma  $10 \%$  i trajanje uzgoja  $98 \text{ h}$ . Enzim je bio dimer od  $66 \text{ kDa}$  s dvije različite podjedinice ( $44$  i  $22 \text{ kDa}$ ). Pokazao je visoku otpornost na kiseline i lužine, toplinsku stabilnost i toleranciju na inhibiciju DMSO-u ( $10\text{-}50 \%$ ) (Su i sur., 2021).

Genetske modifikacije *K. marxianus* omogućile su povećanu produkciju beta-galaktozidaza, čime se dodatno pojačava njegoa industrijska primjenjivost.



**Slika 3.** Shematski prikaz kataboličkog puta laktoze i galaktoze kod *K. marxianus* (Hahn-Hägerdal i sur., 2006)

### 2.3.3.3. Lipaze

Lipaze ili triacilglicerol acil hidrolaze su visoko primjenjiva klasa hidrolitičkih enzima koji su posrednici hidrolize, ali sudjeluju i u sintezi estera. Općenito, one kataliziraju razgradnju acil glicerida koji su nužni za bio-konverziju lipida (triacilglicerola). Lipaze posjeduju niz jedinstvenih svojstava uključujući regiospecifičnost, stereospecifičnost, specifičnost prema

supstratu i sposobnost izvođenja reakcija na sučelju u vodi topivih i netopivih sustava (Sharma i sur., 2002).

Slično proteazama ili karbohidrazama, lipaze mikrobnog podrijetla imaju ogromnu industrijsku važnost zbog veće stabilnosti u usporedbi s životinjskim ili biljnim pandanima te masovne proizvodnje po niskoj cijeni. Štoviše, lipaze iz mikrobnih izvora nude širok spektar biokatalitičkih aktivnosti, brz mikrobní rast na jeftinim medijima, jednostavne genetske izmjene i odsutnost sezonskih fluktuacija (Šiekštelė i sur., 2015).

Među bakterijskim i gljivičnim sojevima, gljivične lipaze su široko proučavane zahvaljujući njihovim jedinstvenim osobinama, kao što su učinkovit postupak ekstrakcije, specifičnost prema supstratu, toplinska i pH tolerancija te očuvanje aktivnosti u organskim medijima. Iako je proizvodnja lipaze prevladavajuća među kvascima, samo nekoliko vrsta je sposobno izlučiti lipaze s željenim karakteristikama i u dovoljnoj količini za industrijsku eksploataciju. *Y. lipolytica*, *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Candida antarctica*, *Saccharomyces* i *K. marxianus* prepoznati su kao kvasci s visokim sposobnostima sintetiziranja lipaza (Sarmah i sur., 2018).

Deive i sur. (2003) procijenili su sposobnost *K. marxianus* za proizvodnju lipaza i evaluirali utjecaj surfaktanata (tvari koje smanjuju površinsku napetost) i raznih lipidnih spojeva na sintezu i izlučivanje enzima. Kompleksni tekući medij koji sadrži različite induktore, poput masnih kiselina i triacilglicerola, poticao je maksimalnu proizvodnju lipaza od strane *K. marxianus*. Najveći titar enzima ( $80 \text{ U ml}^{-1}$  u 3 dana) zabilježen je u mediju s dodatkom tributirina ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) i uree ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ). Međutim, dodavanje surfaktanata nije imalo povoljan učinak na proizvodnju.

Osim fizičko-kemijskih parametara poput temperature, pH-a i otopljenog kisika, sastav medija također može značajno utjecati na proizvodnju lipaze iz *K. marxianus*. Na primjer, Stergiou i sur. (2012) procijenili su optimizaciju raznih procesnih faktora koji utječu na proizvodnju izvanstanične lipaze od strane *K. marxianus* IFO 0288. Rezultati su pokazali da je proizvodnja bila 18 puta veća koristeći optimalne uvjete uzgoja ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,5, 150 okretaja u minuti) i nutrijente (0,5 % maslinovog ulja) nakon 65-satne fermentacije maslinovog ulja kao rastućeg supstrata.

U drugoj studiji, *K. marxianus* 83F pokazao je veću aktivnost proizvodnje lipaze u Serro Minas siru, ukazujući na to kao obećavajuću starter kulturu za proizvodnju sira zbog željenih senzornih karakteristika (Cardoso i sur., 2015). Zbog prisutnosti visokog sadržaja masnih kiselina, avokadovo ulje testirano je kao indikator za sintezu lipolitičkih enzima iz *K. marxianus* L-2029. Da bi se odredila najbolja razina avokadovog ulja u kvascu, indukcija je izvedena kroz 24 sata

koristeći različite koncentracije. *K. marxianus* L-2029 akumulirao je najveću produktivnost izvanstanične lipaze na 3,5 % v/v avokadovog ulja, pH 6 i 36 °C (Martinez-Corona i sur., 2019).

Zapravo, mikrobne lipaze su zanimljiva klasa biokatalizatora s potencijalnim primjenama u medicinskoj i farmaceutskoj industriji, industriji deterdženata, prehrambenoj industriji, pekarstvu, mliječnoj industriji, organskoj sintezi, proizvodnji papira, proizvodnji parfema i kozmetike, kožnoj industriji, proizvodnji biosurfaktanata, agrokemijskoj industriji, oleokemijskoj industriji, bioremedijaciji te industriji povezanoj s biosenzorima (Bilal i sur., 2022).

#### 2.3.4. Proizvodnja jednostaničnih proteina uz pomoć *K. marxianus*

Jednostanični proteini (engl. *single-cell proteins, SCP*) su proteini koji su izolirani iz mješovitih ili čistih bakterijskih kultura, kvasaca, gljiva ili mikroalgi. Ovi mikroorganizmi mogu se koristiti kao sastavni dio hrane, prehrambeni dodaci ili visokoproteinska hrana za životinje ili ljude (Ritala i sur., 2017). Proizvodnja mikrobne biomase i izdvajanje proizvedenih proteina može biti korisna zamjena za proteine dobivene od životinja ili biljaka zbog brzine mikrobnog rasta i sposobnosti korištenja različitih otpadnih materijala kao supstrata (Karimi i sur., 2018).

S obzirom na kraći životni ciklus mikroba, SCP mogu se proizvesti brže nego proteini proizvedeni iz poljoprivrednih izvora. Među proizvođačima SCP, kvasci su se pojavili kao nove stanične tvornice zbog male veličine čestica, velikog sadržaja proteina, jednostavnog rukovanja i relativno niskih troškova proizvodnje. *K. marxianus* ima veliki potencijal za biosintezu SCP i stoga se široko koristi u prehrani odnosno namirnicama diljem zemalja. U usporedbi s *S. cerevisiae*, *K. marxianus* pokazuje visoku specifičnu učinkovitost rasta i najveći prinos biomase kod aerobnog kontinuiranog uzgoja.

Yadav i suradnici (2014a) koristili su *K. marxianus* GQ 506972 za proizvodnju SCP uz simultanu redukciju kemijske potrošnje kisika (engl. *Chemical oxygen demand, COD*) iz sirutke koja nastaje kao nusproizvod prilikom izrade sira. Postigli su 6 gL<sup>-1</sup> biomase uz više od 50 % uklanjanja COD-a na pH 3,5 i 40 °C nakon 36 sati uzgoja. Povećanje količine inokuluma dovelo je do povećane produkcije biomase na 15 gL<sup>-1</sup> i čak do 80 % uklanjanja COD-a. Isti autori također su procijenili učinkovitost sustava mješovite kulture za dobivanje visokokvalitetnih SCP i poboljšanje uklanjanja COD-a u kontinuiranim uzgojima sirutke pod uvjetima uzgoja pH 3,5 i 40 °C (Yadav i sur., 2014b). Yadav i suradnici (2016) proizveli su SCP namijenjene za prehranu

na pH 6,5 i 30 °C koristeći kokulturni sustav koji čine *S. cerevisiae* i *K. marxianus*. U usporedbi s čistom kulturom, mješovita kultura se pokazala produktivnijom s čak 8 % više proizvedenih proteina sirutke pri istoj količini biomase, pri istim uvjetima (Yadav i sur., 2016).

Mnogi mikroorganizmi, uključujući *K. marxianus*, *C. kefir* i *S. cerevisiae*, uzgajani su u otpadu hrane, međutim dokazano je da *K. marxianus* sadrži najveću koncentraciju masti i proteina, te bi stoga mogao biti iskorišten za obogaćivanje stočne hrane (Bilal i sur., 2022).

U ovom kontekstu, Cernak i sur. (2018) uspješno su osmislili termotolerantni modificirani kvasac *Kluyveromyces marxianus* kao novu platformu za mikrobni inženjering i sintetsku biologiju. Koristili su tehniku CRISPR-Cas9 i pokazali da se divlji sojevi *K. marxianus* mogu učiniti heterotaličnima za seksualno križanje. Odabirom dva soja za modificiranje *K. marxianus*, ovi autori su bili u stanju kombinirati tri složene karakteristike: termotoleranciju, proizvodnju lipida i jednostavnu transformaciju egzogenom DNK u jednog domaćina. To je omogućilo korištenje *K. marxianus* kao stanične tvornice za proizvodnju lipida na višim temperaturama od onih koje mogu podnijeti druge gljive, otvarajući vrlo potencijalne mogućnosti za industrijske primjene u velikim razmjerima.

Istraživanje Cernak i suradnici (2018) pokazalo je da se *K. marxianus* može koristiti kao zamjena za *S. cerevisiae*, jer pokazuje snažnije metaboličke karakteristike s potencijalom za industrijsku proizvodnju sastojaka visoke nutritivne i funkcionalne vrijednosti, poput masnih kiselina i antimikrobnih peptida. Osim toga, za razliku od *S. cerevisiae*, ovi autori zaključuju da kvasac *K. marxianus* lako raste na visokim temperaturama i pri tome je sposoban koristiti širok raspon izvora ugljika, čineći ga obećavajućim mikroorganizmom za industrijsku biotehnologiju i proizvodnju specifičnih metabolita iz obnovljivih sirovina poput biljne biomase (Cernak i sur., 2018).

### 2.3.5. Probiotička uloga *K. marxianus*

Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se unesu u odgovarajućim količinama, donose zdravstvene koristi domaćinu. Najčešći probiotički sojevi su: *Lactobacillus*, *Clostridia*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Faecalibacterium* i *Propionibacterium* (Altieri, 2016). Iako se *S. cerevisiae* već mnogo godina smatra probiotikom, posljednjih je godina sve veći interes usmjeren na istraživanje probiotičkog potencijala nekonvencionalnih kvasaca.

*K. marxianus* se smatra obećavajućim probiotikom zbog svoje sposobnosti modifikacije u adheziji, staničnom imunitetu i mikrobioti ljudskih crijeva. Osim toga, također posjeduje antiupalna, antioksidacijska i hipokolesterolemijska svojstva (Cho i sur., 2018). Smatra se kako je sposoban preživjeti u probavnom traktu, pogotovo u predjelu crijeva, kako bi služio kao prebiotik zbog prisutnosti tolerancije na kiselinu i žuč u gastrointestinalnom okruženju (Saber i sur., 2017).

*K. marxianus* izoliran iz kefira pokazao je sposobnost snižavanja kolesterola u krvi, smanjujući količinu kolesterola za čak 30 %, što je više od *K. lactis* ATCC 34440 i *S. cerevisiae* ATCC 6037 (Cho i sur., 2018). *K. marxianus* AS4, dobiven iz mliječnih proizvoda, odnosno sira i jogurta, pokazao je izvrsnu otpornost na kiseli pH, visoke koncentracije žučnih soli i superiornu antimikrobnu aktivnost. Također je pokazao izvanrednu antikancerogenu aktivnost protiv tumora gastrointestinalnih stanica zbog izlučivanja biološki aktivnih metabolita, smanjenja ekspresije gena *Bcl-2* (regulatora apoptoze), povećane ekspresije pro-apoptotskog proteina, te pojačane ekspresije gena *bad* i *casp9* (Saber i sur., 2017).

Među različitim sojevima kvasaca s probiotičkom učinkovitošću, *K. marxianus* JYC2614 pokazao je najbolju toleranciju na žučnu sol i kiselinu, kao i dobru površinsku hidrofobnost stanica te značajan stupanj autoagregacije (Hsiung i sur., 2021).

Nedavno su Goktas i suradnici (2021) odredili probiotička svojstva vrsta kvasaca izoliranih iz uzoraka kefira i usporedili ih s komercijalnim probiotičkim kvascem *S. boulardii*. Za razliku od *S. boulardii*, izolati iz kefira, *K. marxianus* i *S. cerevisiae*, pokazali su hidrofobnost, visoku stopu autoagregacije i antioksidacijske sposobnosti. Također su pokazali snažnu antifungalnu aktivnost protiv nekih vrsta plijesni.

Motey i suradnici (2020) procijenili su probiotičke karakteristike *K. marxianus* i *S. cerevisiae*, koje su izolirane i identificirane iz zapadnoafričkih mliječnih proizvoda *nunu*, *lait caillé* i žitarice na bazi proizvoda *mawè*. Izolati su bili sposobni rasti u žučnim solima s najvećom specifičnom stopom rasta ( $\mu_{max}$ ) od 0,58 – 1,50 sat<sup>-1</sup>. Adhezija kvasca na Caco-2 stanice (besmrtna stanična linija stanica ljudskog kolorektalnog adenokarcinoma) bila je specifična za soj i varirala je između 8,0 i 36,2 %. U gastrointestinalnom pH okruženju, *S. cerevisiae* i *K. marxianus* također su održavali željenu pH homeostazu te povećavali transepitelni električni otpor preko Caco-2 monoslojeva, ukazujući na njihovu cijenjenu probiotičku učinkovitost u zapadnoafričkim fermentiranim proizvodima.



U drugom radu, *K. marxianus* PTCC = 5189 korišten je za proizvodnju probiotičkog jogurta, koji je zatim kontaminiran s *Penicillium notatum* PTCC = 5074 i *Aspergillus parasiticus* PTCC = 5018. Kontaminanti i promjene u broju probiotičkih kvasaca tijekom čuvanja na 4 °C kroz 28 dana su procijenjeni i uspoređeni s kontrolom. Zbog *K. marxianus*, broj plijesni koje onečišćuju jogurt značajno je smanjen. Populacija *K. marxianus* bila je zadovoljavajuća nakon 28 dana skladištenja, pružajući probiotički proizvod s  $7,35 \log \text{CFUgr}^{-1}$  ( $p < 0,01$ ), ukazujući na njegovu korisnost za proizvodnju probiotičkog jogurta na industrijskoj razini (Bilal i sur., 2022).

### 2.3.6. Prednosti kvasaca kao probiotika u odnosu na bakterijske probiotičke sojeve

Iako su bakterijski sojevi poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* tradicionalno dominirali svijetom probiotika, sve je veći interes za probiotičke kvasce. Kvasci kao probiotici nude niz jedinstvenih prednosti i mogu djelovati kao važna dopuna ili alternativa bakterijskim probioticima u različitim primjenama. Sudjeluju u mnogim interakcijama s drugim mikroorganizmima, uključujući simbiozu, mutualizam, parazitizam i konkurenciju.

Neke od ključnih prednosti kvasca kao probiotika sumiranih u Hatoum i suradnici (2012):

- ✓ Otpornost na antibiotike: za razliku od mnogih bakterijskih probiotika, kvasci su prirodno otporni na antibiotike, što ih čini posebno korisnima u situacijama kada osoba mora uzimati antibiotike (Gut i sur., 2018).

U dvostruko slijepoj studiji provedenoj 1976. godine primijećeno je značajno smanjenje simptoma AAD (dijareje povezane s antibioticima) u skupini koja je primila 200 mg *S. boulardii* ( $10^9$  CFU u dnevnoj dozi) tijekom 7 dana. Samo 4,5 % te skupine razvilo je dijareju povezanu s antibioticima, u usporedbi s 17,5 % placebo skupine (Adam i sur., 1977).

U studiji koja je uključivala 193 hospitalizirana pacijenta koji su primali  $\beta$ -laktamske antibiotike, jedna skupina primila je 1 g *S. boulardii* dok je druga dobila placebo 3 dana nakon terapije antibioticima. AAD se pojavio u 7,2 % skupine s *S. boulardii* u usporedbi s 14,6 % ( $P < 0,05$ ) placebo skupine (Mcfarland i sur., 1994).

U studiji o učinku 200 mg *S. boulardii* ( $10^9$  CFU u dnevnoj dozi) tijekom 2 tjedna nakon terapije antibioticima, izviješteno je o AAD u 9,5 % skupine tretirane probiotikom naspram 21,8 % ( $P < 0,05$ ) u placebo skupini (Surawicz i sur., 1990).

- ✓ Antimikrobna aktivnost: Neki sojevi kvasaca proizvode spojeve koje inhibiraju rast patogenih bakterija. Ovo može biti posebno korisno za kontrolu prekomjernog rasta štetnih mikroorganizama u crijevima.
- ✓ Adhezija i kolonizacija: Neke vrste kvasaca mogu se privremeno vezati za stanične površine crijevne sluznice, što pomaže u sprječavanju vezanja i kolonizacije patogena.
- ✓ Imunomodulacija: Kvasci mogu modulirati imunološki odgovor domaćina, potičući proizvodnju imunoglobulina, citokina ili drugih imunomodulatornih molekula koje mogu pomoći u borbi protiv infekcija.
- ✓ Komplementarnost s bakterijskim probioticima: Kvasci mogu djelovati u sinergiji s bakterijskim probioticima, često pružajući komplementarne koristi. Na primjer, kvasac može stvarati okruženje koje je pogodnije za rast određenih korisnih bakterija.

Budući da probiotički kvasci i bakterije imaju različite mehanizme djelovanja, može se očekivati sinergijski učinak i veća održivost kombiniranjem oba tipa probiotika (Hill i sur., 2014). Neke studije su pokazale da kvasci mogu pozitivno djelovati u sinergiji s probiotičkim bakterijama potičući njihov opstanak i stimulirajući njihov rast. Ova pozitivna interakcija između kvasaca i bakterija može biti povezana s proizvodnjom nutrijenata poput peptida, aminokiselina i/ili vitamina.

Stanična stijenka kvasaca je sastavljena od glukana, manana i hitina, koji mogu igrati ulogu u koagregaciji i fenomenima kohezije koji igraju glavnu ulogu u preživljavanju probiotičkih bakterija. Agregacijom se može oblikovati kapsularna strukturu u kojoj se bakterije mogu povezivati sa šećerima putem lektinu sličnih tvari (de Vrese i Schrezenmeir, 2008).

Identificirani su proteini na površini *Lactococcus lactis* IL1403 koji prepoznaju manan kvasaca koji sudjeluje u adheziji mliječno-kiselih bakterija na kvasac. Također, u studiji o interakcijama između mikroorganizama prisutnih u zrnima kefira, pokazano je da termolabilni nekovalentno povezani lektin-slični površinski proteini nekoliko sojeva *Lactobacillus kefir* mogu posredovati u agregaciji s *S. lipolytica* CIDCA 812 stanicama kvasca (Hatoum i sur., 2012).

- ✓ Otpornost na uvjete niskog pH: Kvasci su često robusniji i otporniji na kisele uvjete prisutne u želucu, što omogućuje većem broju stanica da preživi prolazak kroz želudac i dospije u crijeva gdje mogu ispoljiti korisne učinke.
- ✓ Diversifikacija mikrobiote: Uvođenjem kvasaca kao probiotika, postoji prilika za diversifikaciju crijevne mikrobiote, što može pridonijeti ukupnom zdravlju crijeva. Diversificirana mikrobiota obično se smatra znakom dobrog zdravlja jer veća raznolikost mikroorganizama može pomoći u održavanju ravnoteže i funkcionalnosti ekosustava mikrobioma. U kontekstu ljudskog zdravlja, diversificirana crijevna mikrobiota može doprinijeti jačanju imunološkog sustava, poboljšanju probave i metabolizma, održavanju ravnoteže mikrobioma (visoka raznolikost može pomoći u sprječavanju dominacije patogenih mikroorganizama koji mogu uzrokovati bolesti) i smanjenju rizika od kroničnih bolesti (neka istraživanja sugeriraju da veća raznolikost crijevne mikrobiote može smanjiti rizik od određenih kroničnih stanja, uključujući pretilost, dijabetes tipa 2 i neke oblike raka) (Winston i Theriot, 2020; Frece i sur., 2011).

Diversifikacija mikrobiote može se postići različitim metodama, uključujući prehranu bogatu različitim vrstama dijetalnih vlakana, fermentiranim hranama koje sadrže probiotike, te izbjegavanjem pretjerane upotrebe antibiotika koji mogu narušiti mikrobiotu smanjenjem njezine raznolikosti.

U kontekstu postojanja mnogih bakterijskih sojeva probiotika, kvasci mogu pružiti jedinstvene koristi koje bakterijski probiotici ne nude nužno. Kombiniranje kvasaca s bakterijskim probioticima može također pružiti širu paletu koristi za domaćina (Hatoum i sur., 2012).

### 2.3.7. Postbiotici i njihova primjena

Iako još nije postignut konsenzus oko konačnog definiranja postbiotika, neke definicije postbiotika uključuju nevijabilne mikrobne stanice probiotika i/ili njihove dijelove pa se tako definicija postbiotika prema Međunarodnoj znanstvenoj udruzi za probiotike i prebiotike (engl. *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP*) fokusira na korisnu ulogu neživih mikroba i/ili njihovih komponenti, kategoriju koja do sada nije imala jasnu definiciju. Postbiotici su jednostavno jedna kategorija tvari koje pružaju zdravstvene beneficije

povezane s mikrobima. U smislu semantike, rječnici definiraju prefiks 'post' kao značenje „poslije“, a riječ „bios“ kao značenje „živa bića“, te je tako postbiotik u tom kontekstu nešto što je bilo živo i sada je „poslije života“, odnosno neživo. Metaboliti su izvedeni iz živih bića, ali nikada nisu imali svoj neovisan 'život'. Postbiotici su produkti metaboličkih procesa probiotičkih mikroorganizama koji pokazuju visok potencijal u promicanju zdravlja (Vinderola i sur., 2022). Također, u literaturi se pronalazi izdvojena definicija paraprotiotika koje su Taverniti i Guglielmetti (2011) definirali kao nežive mikrobne stanice (u cijelosti ili razbijene) ili sirove ekstrakte stanica (tj. sa složenim kemijskim sastavom), koji, kada se primjenjuju (oralno ili topički) u odgovarajućim količinama, donose korist ljudskom ili životinjskom konzumentu.

Postbiotici uključuju različite tvari kao što su: kratki lanci masnih kiselina (engl. *short-chain fatty acids*, *SCFAs*) poput acetata, propionata i butirata, koji su ključni za održavanje zdravlja crijevne sluznice i imaju antiupalni učinak, eksopolisaharidi, koji mogu djelovati kao prebiotici te poticati rast korisnih bakterija, bakteriocine (proteini s antibakterijskim djelovanjem i mogu inhibirati rast patogenih bakterija) te enzime, vitamine i aminokiseline koje proizvode probiotički mikroorganizmi.

Jedna od ključnih prednosti postbiotika je to što oni ne uključuju žive mikroorganizme, što ih čini sigurnijima za osobe s kompromitiranim imunološkim sustavima. Oni također mogu imati stabilniju formu i duži rok trajanja u odnosu na žive probiotičke kulture (Cosme i sur., 2022).

Smatra se kako postbiotici imaju imunomodulatorni učinak. Primjerice, butirir potiče diferencijaciju regulatornih T stanica u crijevima. Osim toga, propionat pojačava formiranje perifernih T stanica. Različite frakcije probiotika izolirane iz *Bacillus coagulans* kulture također potiču produkciju antiupalnih citokina i potiču Th2 stanice, a time i stanični odgovor. Ova svojstva mogu biti odgovorna za ograničavanje Th1-posredovanih odgovora i pojačavanje Th2-posredovanih odgovora, što je često primijećeno kod osoba sklonih atopijskim bolestima. U modelu miša, postbiotici dobiveni od *Streptococcus thermophilus* pokazali su pojačanje Th1 limfocitnog odgovora u mezenteričkim limfnim čvorovima u usporedbi s datim kontrolama (Żółkiewicz i sur., 2020).

Budući da je upala neraskidivo povezana s karcinogenezom, svaka tvar koja inhibira upalu također može imati potencijal protiv raka. Propionat (proizveden od *Propionibacterium freudenreichii*) je pokazao da selektivno inducira apoptozu u stanicama želučanog raka (Cousin i sur., 2012). SCFA odnosno kratkolančane masne kiseline također utječu na regulaciju onkogenih i supresorskih gena kroz epigenetske modifikacije što također pruža širok spektar potencijalne primjene pa tako i dobiti za ljudsko zdravlje.

U znanstvenoj literaturi, postbiotici se sve više istražuju zbog njihovih potencijalnih zdravstvenih koristi. Primjerice, istraživanje objavljeno u časopisu "Frontiers in Nutrition" (Životinjski probiotici i postbiotici u ribljoj prehrani i akvakulturi: Trenutni znanje i buduće perspektive) istražuje ulogu postbiotika u nutricionizmu i njihov potencijal u akvakulturi (Żółkiewicz i sur., 2020).

Budućnost probiotika i postbiotika uvelike se orijentira prema prilagođenom pristupu svakom pojedincu. Sve veći naglasak stavlja se na razumijevanje individualne mikrobiote ljudi kako bi se razvile personalizirane formulacije koje odgovaraju specifičnim potrebama svake osobe. Uz to, s razvojem preciznih probiotika, postoji tendencija kreiranja sojeva koji su specifično dizajnirani da ciljaju određene patogene mikroorganizme ili da pomažu u određenim zdravstvenim stanjima.

Istraživanje postbiotika brzo napreduje i očekuje se identifikacija novih postbiotičkih spojeva s potencijalnim terapijske učincima. U skladu s time, sve se više pažnje posvećuje kombiniranju probiotika s prebioticima, poznatim kao sinbiotici. Tehnološki napredak također igra ključnu ulogu, s fokusom na razvoju naprednih tehnika pakiranja i dostave koje osiguravaju stabilnost i očuvanje korisnih svojstava probiotika i postbiotika do ciljane lokacije u gastrointestinalnom traktu.

Kako se prepoznaju zdravstvene koristi probiotika i postbiotika, industrija će vjerojatno doživjeti strožu regulaciju, naglašavajući potrebu za sveobuhvatnim kliničkim ispitivanjima koja osiguravaju sigurnost i učinkovitost. Osim toga, sve veće razumijevanje veze između mikrobioma i kroničnih bolesti može otvoriti put ciljanim probiotičkim i postbiotičkim terapijama. S rastom tržišta probiotika i postbiotika, postaje neophodno razmatrati održive metode proizvodnje kako bi se zadovoljile globalne potrebe.

U svjetlu ovih trendova i potencijalnih pravaca razvoja probiotika, neosporna je potreba dodatnih istraživanja na području probiotika i postbiotika proizašlih od kvasaca, fokusirajući se na njihovu ulogu i značaj za ljudsko zdravlje. Kako dosadašnja istraživanja upućuju na značajan zdravstveni potencijal kvasaca primijenjenih u domeni probiotika, potrebno je prilagoditi istraživanja novim trendovima te pojačati napore u istraživanju na područjima postbiotika i paraprobiotika.

Obzirom na navedeno, cilj ovog rada bila je potpuna probiotička karakterizacija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12, procjena postbiotičkog potencijala vijabilnih stanica, inaktiviranih stanica te proizvedenih metabolita. Ovo istraživanje po prvi put objedinjuje

probiotičku i postbiotičku karakterizaciju kvasca uz naglasak na procjenu antioksidacijske aktivnosti u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu provedena je probiotička karakterizacija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 preuzetog iz zbirke Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Iz komercijalnih zbirki mikroorganizama (The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH i American Type Culture Collection) pribavljeni su standardni sojevi test-mikroorganizama korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti i koagregacije. Test-mikroorganizmi korišteni u ovom istraživanju su: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™.

#### 3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije

##### 3.1.2.1. Hranjive podloge

###### a) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj kvasca

- ❖ RPMI - 1640 (Merck, SAD) sastava:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  0,1 g L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4$  0,048 g L<sup>-1</sup>; KCl 0,4 g L<sup>-1</sup>;  $\text{NaHCO}_3$  2,0 g L<sup>-1</sup>; NaCl 6,0 g L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  g L<sup>-1</sup>; glukoza 2,0 g L<sup>-1</sup>; reducirani glutation 0,001 g L<sup>-1</sup>; fenol crveno 0,005 g L<sup>-1</sup>; glicin 0,01 g L<sup>-1</sup>; L-arginin 0,241 g L<sup>-1</sup>; L- asparagin 0,056 g L<sup>-1</sup>; L-aspartat 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-glutamat 0,020 g L<sup>-1</sup>; L- glutamin 0,292 g L<sup>-1</sup>; L-histidin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-hidroksiprolin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-izoleucin 0,050 g L<sup>-1</sup>; L-leucin 0,050 g L<sup>-1</sup>; L-lizin hidroklorid 0,040 g L<sup>-1</sup>; L-metionin 0,015 g L<sup>-1</sup>; L-fenilalanin 0,015 g L<sup>-1</sup>; L-prolin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-serin 0,030 g L<sup>-1</sup>; L-treonin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-triptofan 0,005 g L<sup>-1</sup>; L-tirozin dinatrijev dihidrat 0,029 g L<sup>-1</sup>; L-valin 0,020 g L<sup>-1</sup>; biotin 0,0002 g L<sup>-1</sup>; kolin klorid 0,003 g L<sup>-1</sup>; kalcijev pantoteat 0,000253 g L<sup>-1</sup>; folna kiselina 0,001 g L<sup>-1</sup>; niacin amid 0,001 g L<sup>-1</sup>; para- aminobenzojeva kiselina 0,001 g L<sup>-1</sup>; piridoksin hidroklorid 0,001 g L<sup>-1</sup>; riboflavin 0,0002 g L<sup>-1</sup>; tiamin hidroklorid 0,001 g L<sup>-1</sup>; vitamin B12  $5 \cdot 10^{-6}$  g L<sup>-1</sup>; i-inozitol 0,0035 g L<sup>-1</sup>.

- ❖ Sladni agar - sladni ekstrakt (praškasti) 20 g L<sup>-1</sup>; pepton 6 g L<sup>-1</sup>; glukoza 20 g L<sup>-1</sup>; agar 15 g L<sup>-1</sup>; voda (destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- ❖ Sladni bujon - sladni ekstrakt (praškasti) 20 g L<sup>-1</sup>; pepton 6 g L<sup>-1</sup>; glukoza 20 g L<sup>-1</sup>; voda (destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 mL u epruvete s čepom.

b) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj test mikroorganizama

- ❖ HA (hranjivi agar) sastava: pepton 15,0 gL<sup>-1</sup>; mesni ekstrakt 3,0 gL<sup>-1</sup>; Na Cl 5,0 gL<sup>-1</sup>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 gL<sup>-1</sup>; agar 18,0 gL<sup>-1</sup>; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- ❖ HB (hranjivi bujon): istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 mL u epruvete s čepom.

c) Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti

- ❖ Columbia krvni agar (Biolife, Italija) sastava: pepto-kompleks 10 gL<sup>-1</sup>; triptoza 10 gL<sup>-1</sup>; pepton 3 gL<sup>-1</sup>; kukuruzni škrob 1 gL<sup>-1</sup>; natrijev klorid 5 gL<sup>-1</sup>; agar 12 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 7,3. Podloga sadrži 5 % defibrirane ovčje krvi.

3.1.2.2. *Kemikalije*

- etanol, 70 %, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fetalni teleći serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- kalcijev klorid (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- kalijev klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- koncentrirana kloridna kiselina (Carlo Erba Reagents, Španjolska)
- metanol (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- mononatrijev fosfat, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)



- NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev alginat (Sigma, St. Louis, SAD)
- natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- pankreatin, (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- pepsin, (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- urea, (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- žučne soli, (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)

### 3.1.3. Uređaji

- ❖ Analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ Autoklav ( Sutjeska, Beograd, Srbija)
- ❖ Centrifuga, Centric 150 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ❖ Centrifuga, Z 206 A (Hermlle Labortechnik gmbh, Wehingen, Njemačka)
- ❖ Čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- ❖ Hladnjak sa zamrzivačem, cuef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- ❖ Inkubator, MEMMERT BE 600 (Memmert gmbh + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- ❖ Liofilizator, model Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Osterode am Harz, Njemačka
- ❖ pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ Spektrofotometar, Helios  $\beta$  UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- ❖ Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ Vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)

#### 3.1.4. Pribor

- ❖ Automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) Eppendorf tubice (2 ml)
- ❖ Erlenmeyerove tikvice
- ❖ Filteri za šprice „minisart“, PTFE, 0,22 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ Kivete (50 ml)
- ❖ Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- ❖ Laboratorijske čaše
- ❖ Laboratorijske epruvete
- ❖ Laboratorijski stalci
- ❖ Lijevak za odjeljivanje
- ❖ Menzure (10, 50, 100 i 1000 mL)
- ❖ Mikrobiološka ušica
- ❖ Mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- ❖ Mikrotitarske pločice (12 jažica, 96 jažica)
- ❖ Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- ❖ Plamenik
- ❖ Plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- ❖ Štapići po drigalskom

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Uzgoj mikroorganizma i frakcioniranje metabolita

Nakon prekonoćnog uzgoja u sladnom bujonu, stanice kvasca odvojene su od podloge centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 10 min, isprane dva puta sterilnom fiziološkom otopinom (0,5 %) te su prebačene u 5 mL RPMI 1640 medija koji sadrži 5 % telećeg fetalnog seruma te inkubirane 48 sati na 28 °C (slika 4). Nakon inkubacije, stanice kvasca odvojene su od podloge centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 20 min pri 4 °C. Supernatanti su prebačeni u sterilne kivete, filtrirani na 0,22 µm membranama i prebačeni u VIVACON 2 [propuštanje molekula (engl. *cut-off*) manjih od 2000 Daltona] i MWCO (10 000) membranski separator te centrifugirani na 2500 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 20 min na 4 °C. Frakcije s metabolitima manjim od 2000 Daltona koje su prošle kroz membranu, prebačene su u sterilne kivete i zamrznute na -80 °C do korištenja.



**Slika 4.** Kultura kvasca *Kluyveromyces marxianus* uzgojena u RPMI mediju

### 3.2.2. Antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenima

Nakon prekonoćnog uzgoja stanica kvasca u sladnom bujonu, stanice su centrifugirane 10 minuta pri brzini od 6000 okretaja u minuti kako bi se odvojile od medija. Supernatanti su zatim odvojeni i sterilizirani kroz 0,22  $\mu\text{m}$  filtere.

Antimikrobna aktivnost dobivenog supernatanta određena je koristeći polistirenske mikrotitarske pločice (96 jažica), prema prilagođenoj metodi objavljenoj u Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Ciljni mikroorganizmi za testiranje antimikrobne aktivnosti bili su: *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup>25922<sup>™</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup>25923<sup>™</sup>, *Salmonella* Typhimurium ATCC<sup>®</sup>29631<sup>™</sup>, *Listeria monocytogenes* ATCC<sup>®</sup>23074<sup>™</sup> i *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup>10231<sup>™</sup>.

U svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano je 240  $\mu\text{L}$  analiziranog supernatanta kvasca, 30  $\mu\text{L}$  medija za patogene (hranjivi bujon za bakterije ili sladni bujon ako je u pitanju *Candida albicans*) te 10  $\mu\text{L}$  prethodno uzgojenih testnih mikroorganizma. Inkubacija se odvijala na 37

°C 24 i 48 sati. U određenim razmacima mjerena je apsorbancija na 620 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica. Praćen je rast te je izračunata inhibicija prema sljedećem izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

$A_t$  = apsorbancija u vremenu  $t$

$A_0$  = apsorbancija u vremenu 0

Za kontrolne uzorke korišten je neinokulirani, odnosno sterilni sladni bujon koji je podvrgnut istom tretmanu kao i ostali uzorci, dok su u slučaju slijepih proba korišteni uzorci koji nisu sadržavali dodane patogene mikroorganizme.

### 3.2.3. Određivanje autoagregacijske sposobnosti kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Kvaščeve su stanice nakon prekonoćnog uzgoja u sladnom bujonu izdvojene centrifugiranjem te je pripravljena suspenzija stanica u sterinoj vodi pH 7 volumena 8 mL te je određen stupanj autoagregacije prilagođenom metodom opisanoj u Kos i sur. (2003) i Frece (2007). Iz uzorka suspenzije koji je mirovao, 24 h se u intervalima od 20, 40, 60, 90, 120 minuta te 3, 4 i 24 sata uklanjao gornji sloj suspenzije (200  $\mu$ L) te je izmjerena apsorbancija pri 600 nm uz pomoć spektrofotometra. Slijepa proba bila je sterilna deionizirana voda. Stopa autoagregacije je izračunata prema izrazu:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [2]$$

gdje je:

$A_t$  – apsorbancija u vremenu  $t$

$A_0$  – apsorbancija u vremenu 0

#### 3.2.4. Određivanje koagregacijske sposobnosti kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Nakon prekonocnog uzgoja u sladnom bujonu, stanice kvasca su centrifugirane i pripremljene kao 5 mL suspenzija u fosfatnom puferu s pH 7,2. Da bi se odredio stupanj koagregacije, jednaki volumeni suspenzije kvasca kombinirani su sa suspenzijama odabranih test-mikroorganizama. U ispitivanju su korišteni sljedeći test-mikroorganizmi: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™. Tijekom 24-satne inkubacije na 37 °C, uzorci su pažljivo izuzimani s vrha stabilnih suspenzija, a mjerenje apsorbancije izvedeno je sukladno metodi za autoagregaciju koja je ranije opisana.

#### 3.2.5. Ispitivanje preživljavanja kvasca u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Određen je kontinuirani stupanj preživljavanja izolata kvasca *Kluyveromyces marxianus* u simuliranim uvjetima želuca i crijeva. Pripremljene su otopine raznih soli koje predstavljaju simulirane uvjete želuca i tankog crijeva po izmijenjenoj metodi opisanoj u Kostelac (2022). Nakon prekonocnog uzgoja u sladnom bujonu, stanice kvasca odvojene su od podloge centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 15 minuta te su resuspendirane u fiziološkoj otopini. Dio suspenzije je korišten za određivanje jedinica koje tvore kolonije (engl. *Colony forming unit, CFU*), a dio korišten za ispitivanje preživljavanja kvasca u simuliranim uvjetima probavnog trakta.

##### 3.2.5.1. Priprava simuliranog želučanog soka

Simulirani želučani sok pripravljen je suspendiranjem i otapanjem pepsina (3 gL<sup>-1</sup>) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 gL<sup>-1</sup>), KCl (0,8946 gL<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8878 gL<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,680 gL<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (1,680 gL<sup>-1</sup>), CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,1981 gL<sup>-1</sup>) kojoj je pH podešen na 3,0 uz dodatak koncentrirane kloridne kiseline.

### 3.2.5.2. Priprava simuliranog soka tankog crijeva

Simulirani sok tankoga crijeva pripravljen je suspendiranjem i otapanjem pankreatina ( $1 \text{ gL}^{-1}$ ) i žučnih soli ( $3,0 \text{ gL}^{-1}$ ) u otopini sljedećih soli: NaCl ( $9 \text{ gL}^{-1}$ ), KCl ( $0,8946 \text{ gL}^{-1}$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}$  ( $0,8878 \text{ gL}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $1,680 \text{ gL}^{-1}$ ),  $\text{NaHCO}_3$  ( $1,680 \text{ gL}^{-1}$ ),  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  ( $0,1981 \text{ gL}^{-1}$ ) kojoj je pH podešen na 7,0 uz dodatak koncentrirane kloridne kiseline.

### 3.2.5.3. Određivanje stupnja preživljenja

Nakon uzgoja kvasca u sladnom bujonu, kulture kvasca koje su porasle su ponovno resuspendirane u sterilnoj fiziološkoj otopini. Broj stanica u suspenzijama kvasca standardiziran je na  $10^7$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Zatim su stanice kvasca odvojene centrifugiranjem pri 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 6 minuta, potom resuspendirane u otopini koja simulira uvjete želuca i inkubirane na  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 2 sata. Nakon tog koraka, slijedio je proces resuspenzije u uvjetima koji simuliraju tanko crijevo, gdje su stanice inkubirane još 4 sata.

Nakon svake faze, broj preživjelih stanica kvasca određen je indirektnom metodom nacjepljivanjem na sladni agar. Uspoređujući s početnim brojem stanica, određen je postotak preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

### 3.2.6. Sposobnost formiranja biofilmova

Promatrana je sposobnost formiranja biofilmova kvašćevih izolata prema metodi opisanoj u radu Kostelac (2022) uz manje izmjene:

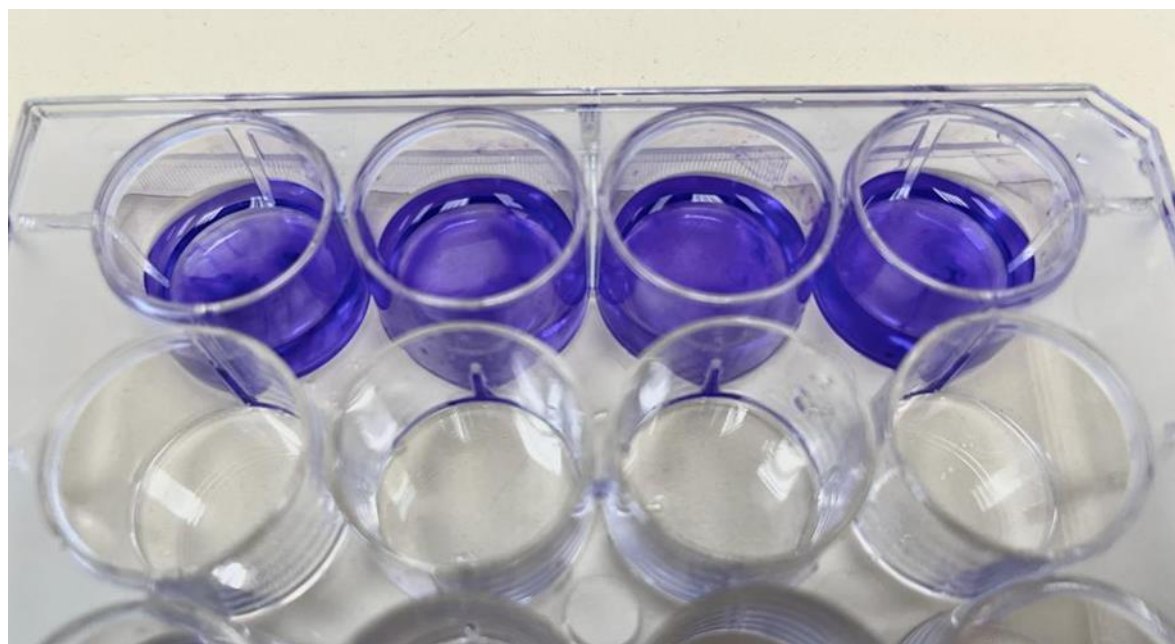
U polistirenske mikrotitarske pločice s 12 jažica dodano je po 3 mL sladnog bujona. Uzorci su nacijepljeni sa 100  $\mu\text{L}$  suspenzije prethodno uzgojenih kultura kvasca zatim su pločice inkubirane na  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 24 i 48 sati. Nakon inkubacije je sadržaj jažica ispražnjen pipetiranjem pazeći da ne dođe do grebanja dna jažice. Talog stanica je zatim ispran s 2 mL sterilne vode uz kontrolirano resuspendiranje. Stanice koje su ostale adhezirane u biofilm su fiksirane dodatkom 2 mL metanola te tako inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta. Metanol je zatim uklonjen pipetiranjem, a pločice su osušene na zraku. Nakon što se sadržaj jažica potpuno osušio, u njih je dodano po 1 mL 1 %-tnog kristal violeta. Nakon 5 minuta je višak boje uklonjen temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom. Boja koja se vezala se zatim otpustila

dodatkom 2 mL 33 %-tne octene kiseline (slika 5). Uslijedilo je mjerenje optičke gustoće (OD) pri 595 nm uz pomoć spektrofotometra. Neinkulirani uzorci su korišteni za negativnu kontrolu.

Vrijednosti optičke gustoće su uspoređene s optičkom gustoćom negativne kontrole (ODC) te su klasificirani prema Borges i sur. (2012). Klasifikacije su prikazane u tablici broj 1.

**Tablica 1.** Klasifikacija formacije biofilмова usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole prema Borges i sur. (2012)

| Usporedba OD i ODC vrijednosti        | Klasifikacija proizvodnje biofilma |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| $OD < ODC$                            | nema formacije biofilma            |
| $ODC < OD < 2 \times ODC$             | slaba formacija biofilma           |
| $2 \times ODC < OD \leq 4 \times ODC$ | umjerena formacija biofilma        |
| $4 \times ODC < OD$                   | jaka formacija biofilma            |

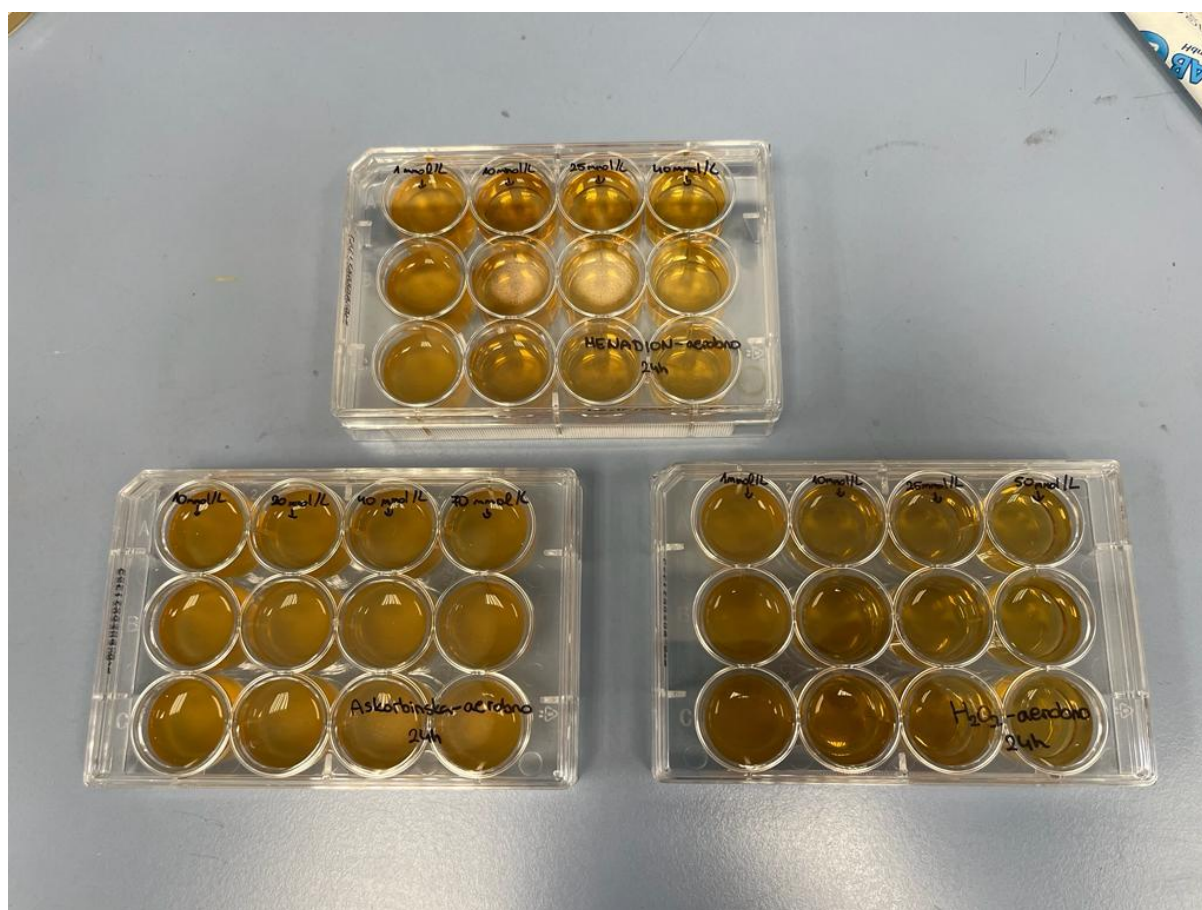


**Slika 5.** Polistirenske mikrotitarske pločice s 12 jažica u kojima se nalaze obojane stanice kvasca koje su stvorile biofilm i octena kiselina koja služi za ispiranje stanica

### 3.2.7. Određivanje rasta stanica u uvjetima oksidacijskog stresa

Rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u prisutnosti vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona određen je prema prilagođenoj metodi Zotta i sur. (2014). Kvasac je uzgojen u mikrotitarskoj ploči s 12 jažica u sladnom bujonu u semiaerobnim (s ograničenom količinom kisika) i anaerobnim uvjetima uz prisutnost različitih koncentracija vodikovog

peroksida (1 – 50 mM), askorbinske kiseline (10 – 70 mM) i menadiona (1 – 40 mM). Mikrotitarske ploče inokulirane su s 100  $\mu$ L prethodno uzgojenog kvašćevog soja te su inkubirane 24 i 48 sati na 28 °C. Kontrolni uzorci su uzgojeni bez dodatka spojeva koji generiraju reaktivne kisikove spojeve (vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona), a slijepe probe bili su neinokulirani uzorci (slika 6). Nakon inkubacije, izmjerena je optička gustoća na 620 nm i izračunat je postotak inhibicije rasta u prisutnosti vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona te je izmjerena pH vrijednost podloge pomoću pH metra u četverostrukim paralelama.



**Slika 6.** Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u uvjetima oksidacijskog stresa (odnosno s dodatkom vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona) na polistirenskim mikrotitarskim pločicama

### 3.2.8. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

Ukupna antioksidacijska aktivnost, određena kroz sposobnost eliminacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala, izmjerena je prema metodologiji prilagođenoj prema Son i Lewis (2002). Nakon uzgoja kvasaca na sladnoj podlozi, stanice kvasca su odvojene od medija centrifugiranjem pri 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 15 minuta, a zatim resuspendirane u



sterilnoj demineraliziranoj vodi. Suspenzije izolata su podešene tako da imaju koncentraciju od otprilike  $10^8$  stanica po mililitru kako bi se postigla konzistentnost u usporedbi aktivnosti. Stanice kvasca su tretirane na 70, 80 i 100 °C te im je izmjerena sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala isto kao i netretiranim stanicama.

Zatim je dodano 1 mL suspenzije kvasca u 2 mL etanolne otopine DPPH radikala s koncentracijom od 0,07 mM. Nakon brze homogenizacije, uzorak je inkubiran u tamnom okruženju 30 minuta. Smjesa je zatim centrifugirana na 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 5 minuta i izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm koristeći spektrofotometar. Uzorci slijepe probe sadržavali su samo etanol i kvašćeve stanice, dok su kontrolni uzorci uključivali etanolnu otopinu DPPH i sterilnu demineraliziranu vodu bez prisustva stanica. Izračunat je postotak uklanjanja DPPH slobodnih radikala koristeći formulu:

$$\text{Uklanjanje radikala (\%)} = [1 - (A - A_{bl}) / A_c] \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je:

A - apsorbancija uzorka

$A_{bl}$  - apsorbancija slijepe probe

$A_c$  - apsorbancija kontrolnog uzorka.

### 3.2.9. Određivanje hemolitičke aktivnosti

Hemolitička aktivnost kvasca *K. marxianus* procijenjena je koristeći metodu Haldera i sur. (2017). Kultura kvasca rasla je preko noći u sladnom bujonu, a zatim nacijepljena na Columbia krvni agar. Inkubacija se provodila 24 do 48 sati na temperaturi od 28 °C. Nakon tog perioda, kolonije na krvnom agaru su analizirane radi identifikacije hemolitičkih zona. Prozirne zone oko kolonija označavaju  $\beta$ -hemolizu, dok zelene zone upućuju na  $\alpha$ -hemolizu. Ako zona oko kolonija nije vidljiva, to sugerira  $\gamma$ -hemolizu ili odsutnost hemolitičke aktivnosti.

### 3.2.10. Obrada podataka

Rezultati dobiveni u istraživanju pripremljeni su i uređeni pomoću programa Microsoft Office Excel 2013. Statistička obrada podataka provedena je u programu STATISTICA v.7.1. za Windows 10 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

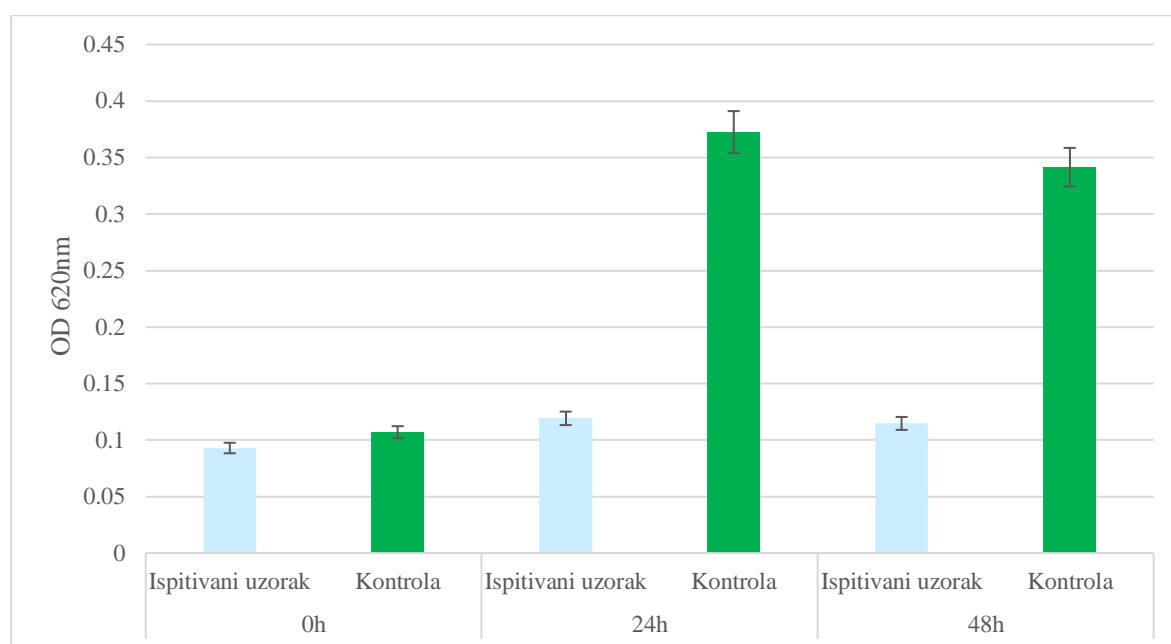
Da bi se neki mikroorganizam odnosno soj smatrao potencijalnim probiotikom, trebao bi zadovoljiti niz kriterija koji osiguravaju njegovu sigurnost, funkcionalnost i učinkovitost. Probiotik bi prije svega trebao biti siguran za konzumaciju, probiotik ne smije biti patogen, uzrokovati infekcije ili sadržavati transfereze koji prenose genetski materijal koji pridonosi antibiotskoj rezistenciji. Vrlo je važno da probiotički soj pokazuje otpornost na gastrointestinalne uvjete odnosno da je sposoban preživjeti i prolaziti kroz kisele uvjete želuca i tankog crijeva te da njegovu učinkovitost ne ometaju žučnih soli. Da bi kolonizirao crijeva i pružio koristi, probiotički soj treba pokazati sposobnost adhezije na crijevne stanice.

Mnogi probiotici imaju sposobnost inhibiranja patogenih mikroorganizama, bilo izravno kroz produkciju antimikrobnih tvari ili kompeticijom za nutrijente te mjesta za adheziju u gastrointestinalnom sustavu. Osim direktnog inhibiranja patogena, probiotički sojevi mogu modulirati imunološki odgovor domaćina, poticanjem sekrecije protuupalnih citokina ili pojačavanjem barijerne funkcije crijeva. Jedan od važnih kriterija za probiotike je i sposobnost autoagregacije i koagregacije. Ovi fenomeni pomažu probioticima da formiraju kolonije u gastrointestinalnom traktu, poboljšavajući njihovu učinkovitost i omogućujući im da se bolje natječu s patogenima (Jäger i sur., 2019).

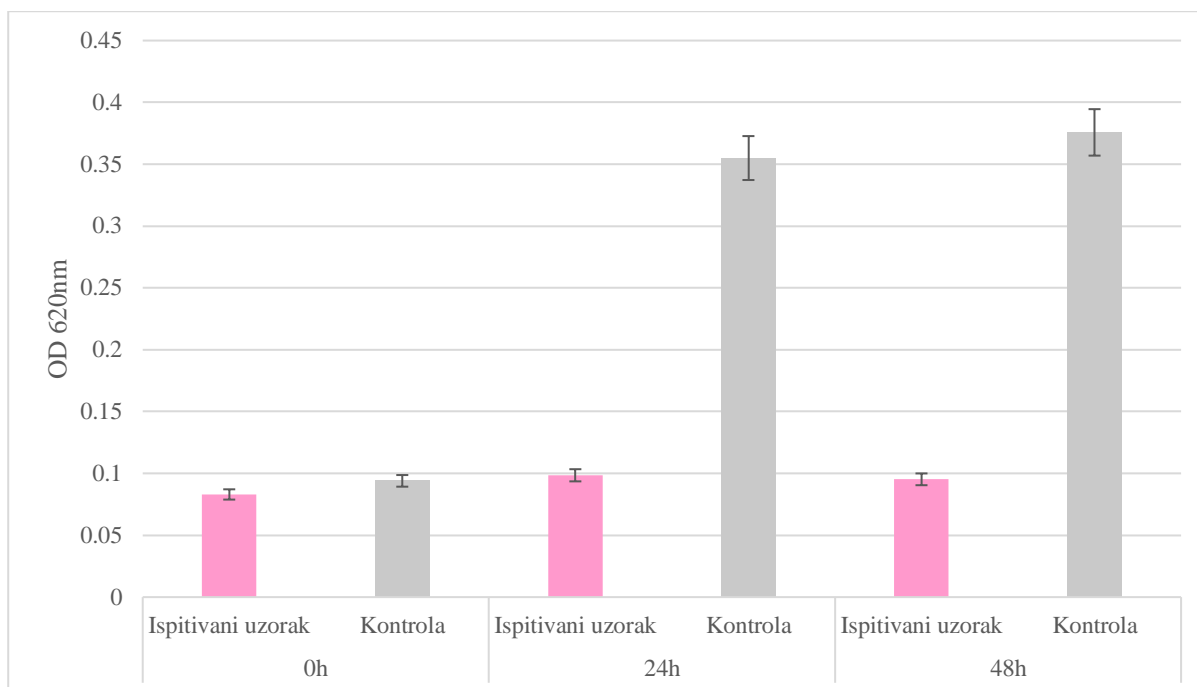
Cilj ovog diplomskog rada bio je razjasniti probiotički i postbiotički potencijal soja *Kluyveromyces marxianus* DS12 kroz sveobuhvatne analize njegovih antimikrobnih svojstava, sposobnosti formiranja biofilma, autoagregacije, koagregacije, antioksidacijske aktivnosti te ocjenjivanje njegove hemolitičke aktivnosti, reakcije na oksidacijski stres i sposobnosti održavanja vitalnosti u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Cilj je također bio procijeniti kako navedene karakteristike pridonose definiranju *Kluyveromyces marxianus* DS12 kao potencijalno korisnog probiotičkog soja.

#### 4.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST *Kluyveromyces marxianus* DS12

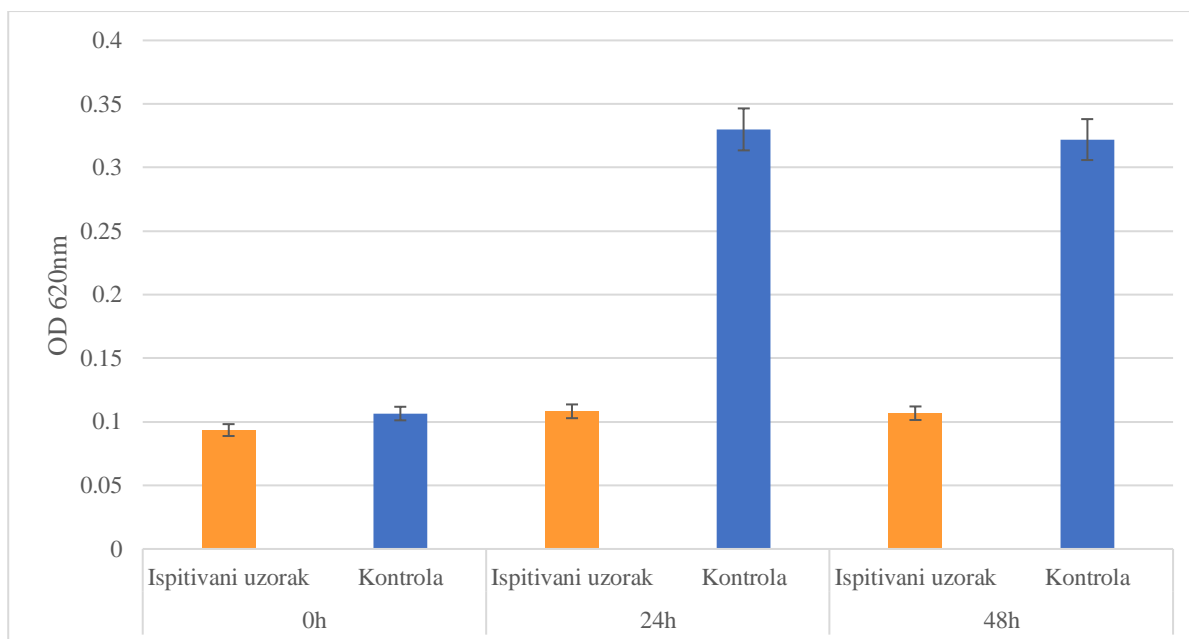
Antimikrobni potencijal je mjera učinkovitosti tvari ili organizma u suzbijanju mikrobiološkog rasta i aktivnosti, a to je od ključne važnosti u kontekstu probiotičkih istraživanja i primjena radi osiguranja zdravstvenih koristi domaćinu. Rast patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanta analiziran je pomoću turbidimetrijske metode kako bi se procijenila antimikrobna aktivnost tog supernatanta. Prikaz i interpretacija rezultata dati su na slikama 7 do 12. Uzorci su uspoređeni s kontrolom koja je pripravljena bez dodatka supernatanta odnosno bez *Kluyveromyces marxianus* DS12.



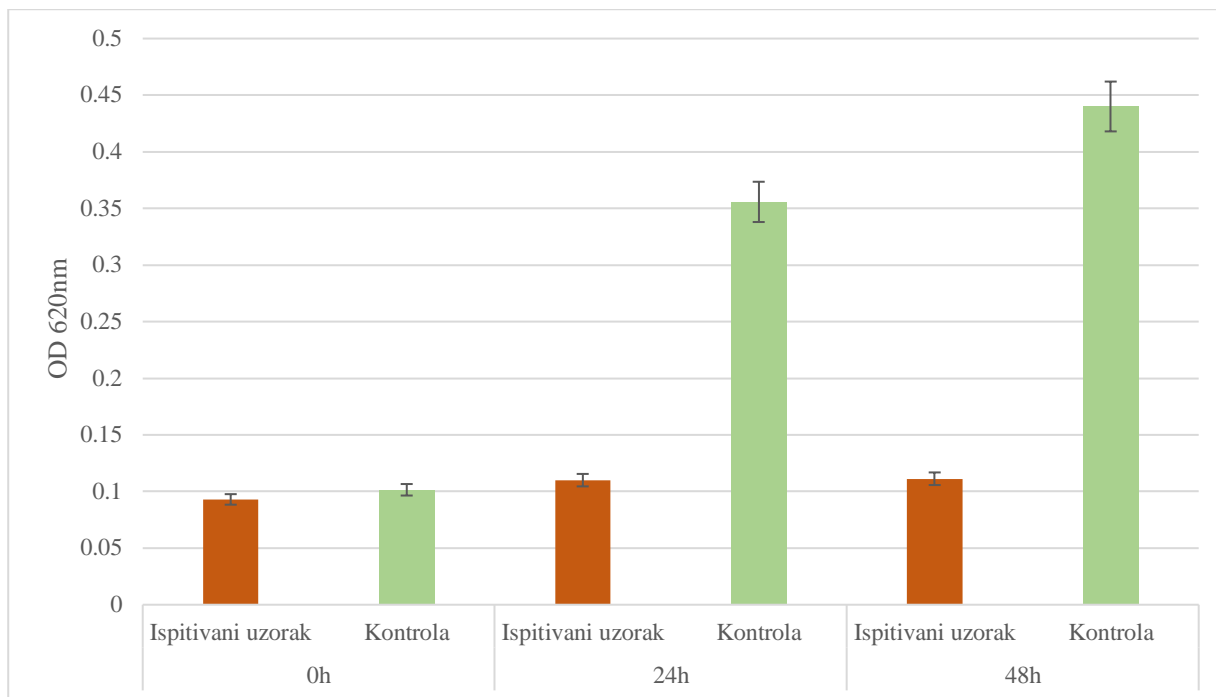
**Slika 7.** Rast test mikroorganizma *E. coli* ATCC®25922™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620 nm ± standardna devijacija trostruke paralele



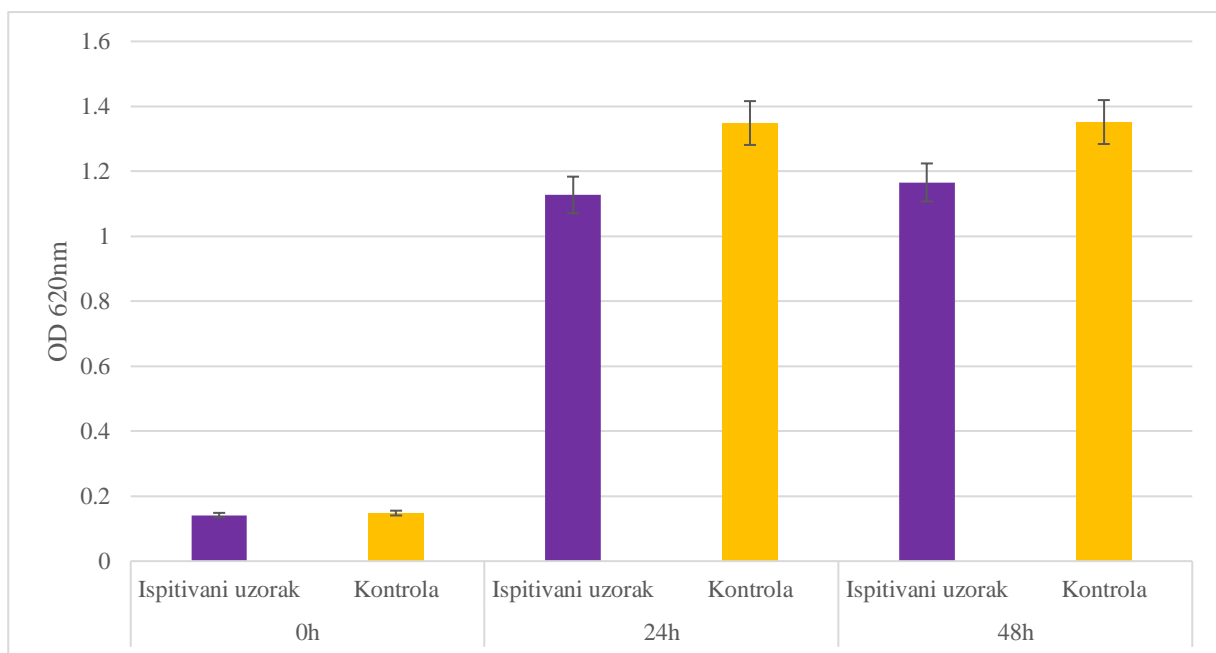
**Slika 8.** Rast test mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC®23074™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620nm ± standardna devijacija trostruke paralele



**Slika 9.** Rast test mikroorganizma *S. Typhimurium* ATCC®29631™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620nm ± standardna devijacija trostruke paralele

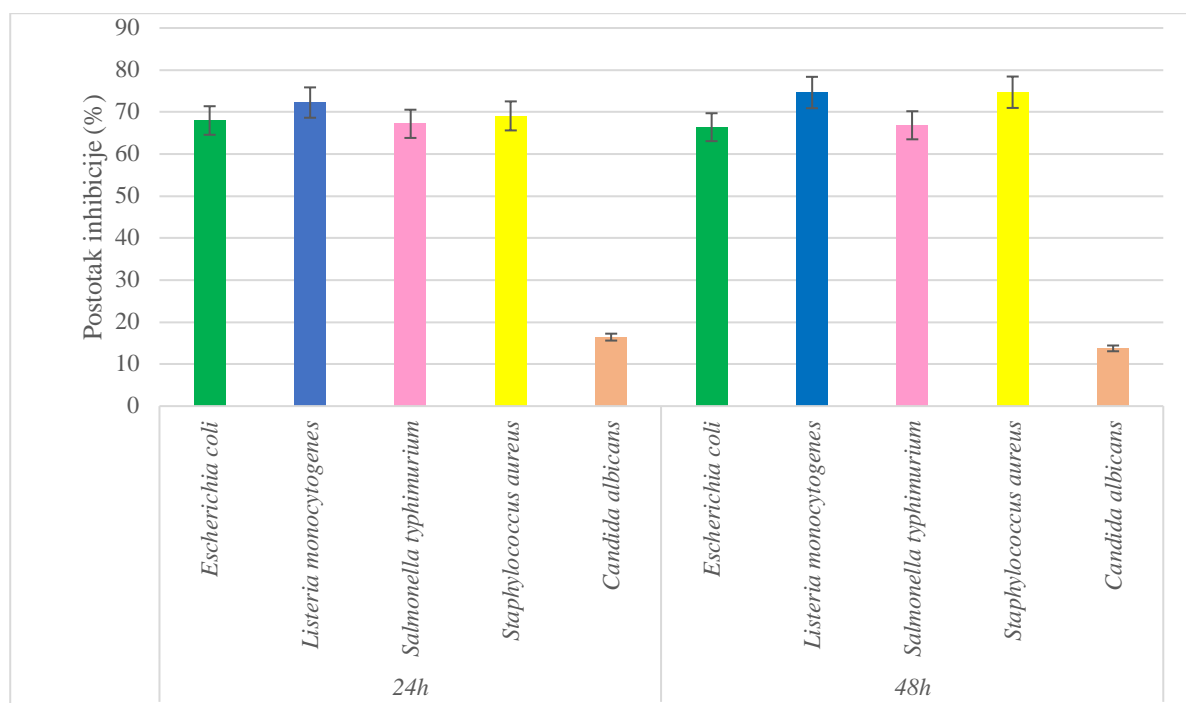


**Slika 10.** Rast test mikroorganizma *S. aureus* ATCC®25923™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620nm ± standardna devijacija trostruke paralele



**Slika 11.** Rast test mikroorganizma *C. albicans* ATCC®10231™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620nm ± standardna devijacija trostruke paralele

Obzirom na prikazane rezultate rasta patogenih mikroorganizama, izračunat je postotak inhibicije te su rezultati sumarno prikazani na slici 12.



**Slika 12.** Antimikrobna aktivnost soja *Kluyveromyces marxianus* DS12 prema odabranim patogenima izražena kao postotak inhibicije rasta  $\pm$  SD

Prema rezultatima dobivanim u istraživanju, čiji su rezultati prikazani na slikama 7 – 12, kvasac *Kluyveromyces marxianus* DS12 pokazao je iznimno visok stupanj inhibicije rasta većine istraživanih patogena. Za *E. coli* stupanj inhibicije nakon 24 sata inkubacije iznosio je 68 % dok je nakon 48 sati inkubacije iznosio 66 % što upućuje na vrlo dobra antimikrobna svojstva kvasca *Kluyveromyces marxianus* prema *E. coli*. Jače antimikrobno djelovanje primijećeno je kod *L. monocytogenes* kod koje je stupanj inhibicije nakon 24 sata inkubacije iznosio 72 %, a nakon 48 sati čak 75 %. Rast *S. Typhimurium* je nakon 24 i 48 sati inkubacije inhibiran za 67 % u usporedbi sa kontrolom. Inhibicija rasta *S. aureus* nakon 24 sata iznosila je 69 % te se nakon 48 sati inhibicija povećala na 75 %.

Također je uočeno kako kvasac *Kluyveromyces marxianus* DS12 nije pokazao velik postotak inhibicije rasta kod *C. albicans* što ukazuje na bolju antimikrobnu specifičnost prema bakterijama nego prema kvascima.

Antimikrobnom djelovanju različitih sojeva *Kluyveromyces marxianus* svjedoče rezultati istraživanja Mirzaei i sur. (2016) gdje su razine inhibicije za *Bacillus cereus* (PTCC 1015), *Listeria monocytogenes* (PTCC 1306), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *Escherichia coli* (PTCC 1330) i *Micrococcus luteus* (PTCC 1110) iznosile između 17 i 40 %. Razlika u postotku

inhibicije se može pripisati razlici u soju *Kluyveromyces marxianus* koji je korišten za ovo istraživanje.

Njegova robustna antimikrobna svojstva ukazuju na to da bi *K. marxianus* mogao pružiti značajne zdravstvene koristi kada se koristi kao probiotički dodatak. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se u potpunosti razumjela i optimizirala njegova primjena u probiotičkim formulacijama, ali trenutačni podaci pružaju snažan temelj za razmatranje ovog soja kao ključne komponente u budućim probiotičkim pripravcima ako promatramo njegov antimikrobni potencijal.

## 4.2. ODREĐIVANJE HEMOLITIČKE AKTIVNOSTI

Hemolizin je supstanca koja uzrokuje hemolizu, odnosno raspadanje eritrocita (crvenih krvnih stanica) i oslobađanje njihovog sadržaja u okolno tkivo ili tekućinu. Hemolizini su često enzimi koje proizvode neki bakterijski sojevi i koriste ih kao virulentne faktore, omogućavajući im da oštete tkivo domaćina, oslobode nutrijente iz crvenih krvnih stanica i potpomognu širenju infekcije (Ristow i Welch, 2016). U kontekstu bakterioloških ispitivanja, sposobnost bakterije da proizvodi hemolizin može se testirati na krvnom agaru. Ako bakterija proizvodi hemolizin, eritrociti u agaru će se razgraditi, stvarajući hemolitičke zone oko bakterijskih kolonija. Različite vrste hemolize ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) mogu ukazivati na različite vrste hemolizina ili različite stupnjeve hemolitičke aktivnosti (Bhakdi i sur., 1988).

U ovom istraživanju ispitivani kvasac nije pokazao hemolitičku aktivnost jer oko poraslih kultura nije bilo vidljivih hemolitičkih zona (nedostatak zona klasificira se kao  $\gamma$ -hemoliza), stoga se on smatra sigurnim za upotrebu kod ljudi.

Dobiveni rezultat je očekivan obzirom da je i ranije dokumentirano kako kvasci roda *Kluyveromyces marxianus* ne iskazuju hemolitičku aktivnost (Youn i sur., 2023).

### 4.3. SPOSOBNOST *Kluyveromyces marxianus* DS12 DA FORMIRA BIOFILMOVE

Kada govorimo o probiotičkoj karakterizaciji važno je i ispitati kakva je sposobnost pojedinog potencijalno probiotičkog soja da formira biofilmove. U ovom je istraživanju stoga ispitivana sposobnost stanica *Kluyveromyces marxianus* soja DS12 da stvaraju biofilmove te je ona zatim klasificirana na slabu, umjerenu ili jaku. Rezultati formiranih biofilmova nakon 24 h i 48 h za ispitane izolate prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Sposobnost formiranja biofilmova kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 izražena kao srednja vrijednost OD pri 595 nm ± SD

|                               |                                     | 24 h          |                         | 48 h          |                         |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
|                               |                                     | OD            | Klasifikacija           | OD            | Klasifikacija           |
| <b>Referentne vrijednosti</b> | ODK                                 | 0,115 ± 0,01  | /                       | 0,063 ± 0,01  | /                       |
|                               | 2×ODK                               | 0,23 ± 0,01   |                         | 0,126 ± 0,01  |                         |
|                               | 4×ODK                               | 0,46 ± 0,01   |                         | 0,252 ± 0,01  |                         |
| <b>Ispitivani soj</b>         | <i>Kluyveromyces marxianus</i> DS12 | 1,602 ± 0,048 | Jaka formacija biofilma | 1,714 ± 0,019 | Jaka formacija biofilma |

OD-optička gustoća; ODK-optička gustoća kontrole

Na temelju rezultata iz tablice 2 vidljivo je da ispitivani kvasac ima izvrsnu sposobnost formiranja biofilmova. Već u prvih 24 sata uočena je snažna formacija biofilma, koja je postala još izraženija nakon 48 sati uzgoja. Razlika u optičkoj gustoći između 24 i 48 sati upućuje na zaključak da vrijeme inkubacije značajno utječe na formaciju biofilmova.

Sposobnost kvasaca da formiraju biofilme, što proizlazi iz izlučivanja specifičnih metabolita koji potiču ovu formaciju, može imati značajan utjecaj na funkcionalnost probiotičkih sojeva. Ovo povećava njihovu sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnom okruženju i kolonizaciju gastrointestinalnog trakta. Također, pozitivno utječe na sposobnost natjecanja s patogenim vrstama, dok u isto vrijeme može poticati proizvodnju i oslobađanje novih i većih količina aktivnih molekula bitnih za zdravlje domaćina, u usporedbi s pojedinačnim stanicama. Formiranje biofilma je izravno povezano s adhezijskom sposobnošću, koja je ključna za kompetitivno isključivanje patogenih mikroorganizama. Povezanost sposobnosti formacije biofilma i probiotičke adhezije dobro je istražena i dokumentirana kod bakterija (Ruhel i Kataria, 2021).



Većina studija o adheziji kvasaca uglavnom se fokusirala na *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* sojeve. Svojstva adhezije uglavnom su opisana djelovanjem glikoproteina stanične stijenke. Međutim, nedavno se povećava interes za neke non-*Saccharomyces* vrste koje se mogu koristiti u proizvodnji hrane zbog njihovih tehnoloških svojstava. Izvještava se da je *K. marxianus* bila glavna vrsta u sirevima Pecorino di Farindola i Parmigiano Reggiano, pokazujući genotipski i fenotipski polimorfizam (kinetiku rasta u sirutki, produkciju i razgradnju organskih kiselina, potrošnju aminokiselina, proizvodnju aromatičnih metabolita). Štoviše, nedavna studija pokazala je razlike među izolatima *K. marxianus* iz fermentiranog kozjeg mlijeka Yaghnob doline na temelju formiranja biofilma i svojstava adhezije (Perpetuini i sur., 2019; Coloretti i sur., 2017).

U istraživanju Fasoli i sur. (2016) odabrana su 33 soja *K. marxianus* od ukupno 83 sojeva na temelju genotipskog tipiziranja i karakterizacije iz prethodnih studija. Testirana je njihova sposobnost proizvodnje biofilma na polistirenskim pločama te sposobnost stvaranja „mat“ strukture. U mikrobiološkim istraživanjima, „mat“ struktura ili struktura matrice odnosi se na specifičnu vrstu biofilma koja se formira kada kvasci stvaraju guste, višeslojne kolonije koje su dobro organizirane i funkcionalno različite od slobodno plivajućih ili planktonskih stanica. Formiranje mat struktura može biti indikator visoke adhezijske sposobnosti i potencijala za formiranje biofilma, što može imati različite implikacije u prehrambenoj industriji, medicini i istraživanjima mikrobioma. Samo 8 od njih 33 (6M2, LM142, M135, 1SC4, CBS834T, FM09, M83 i VG4) formiralo je „mat“ strukture i pokazalo stabilan, dimorfičan obrazac rasta na polistirenu u YPD i sirutki, s planktonskim stanicama i stanicama koje formiraju biofilm. Ostala 24 soja nisu mogla prijanjati na polistirenske ploče niti proizvesti strukturu matrice, što je bilo slično negativnoj kontroli. Stoga, daljnje analize nisu provedene.

Kako je navedeni parametar od iznimne važnosti u probiotičkoj karakterizaciji, uistinu je neizostavan za sve mikrobne vrste s potencijalom probiotičke primjene.

Osim sposobnosti formiranja biofilmova, dodatni probiotički kriteriji povezani sa sposobnosti kolonizacije gastrointestinalnog trakta su autoagregacija i koagregacija s čestim patogenim mikroorganizmima.

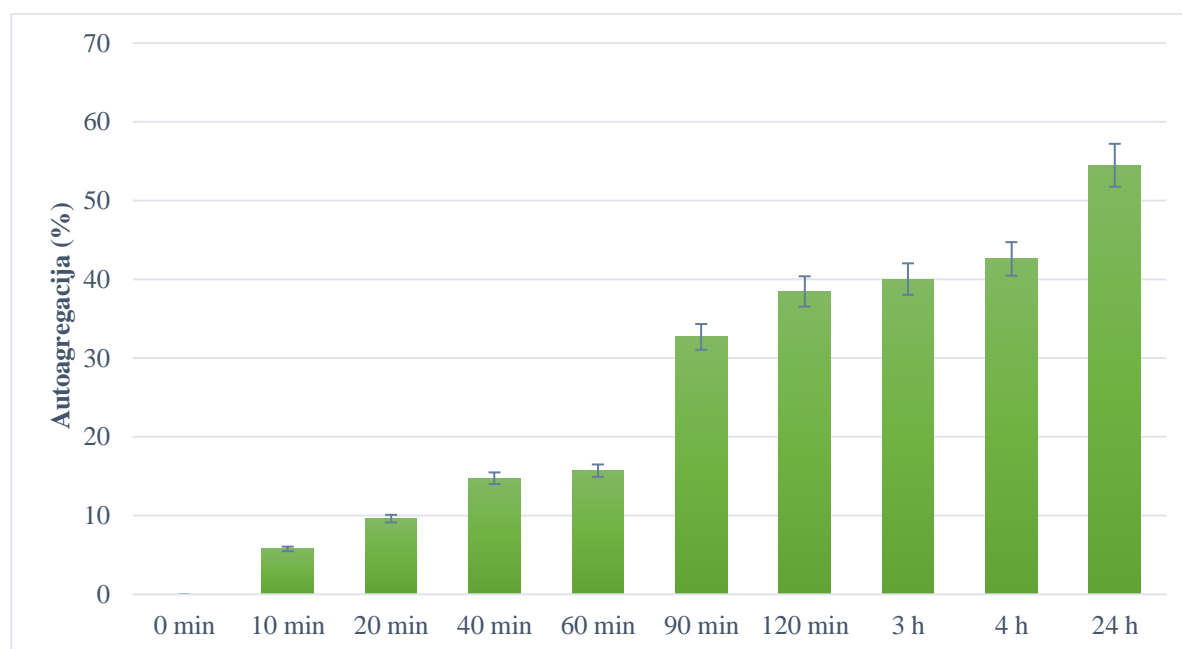
## 4.4. SPOSOBNOST AUTOAGREGACIJE I KOAGREGACIJE

### 4.4.1. Autoagregacijske sposobnosti kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Autoagregacija kvasca odnosi se na sposobnost stanica kvasca da se međusobno povežu i formiraju agregate ili klastere. Ovo je značajan fenomen u mikrobiološkom kontekstu zato što se povećava stabilnost i preživljavanje jer agregirane stanice često imaju veću otpornost prema stresnim uvjetima u usporedbi s pojedinačnim stanicama što u kontekstu probiotika može značiti bolju sposobnost preživljavanja kroz agresivno okruženje želuca (niska pH vrijednost) te bolju sposobnost kolonizacije crijeva (Fernandez-Bellot i Cullin, 2001).

Određena je autoagregacijska sposobnost istraživanog kvasca te je prikazana na slici 13.

Rezultati autoagregacije prikazani su kao postotak autoagregiranih stanica u rasponu početne OD pa sve do 24 sata inkubacije u usporedbi sa slijepom probom.



**Slika 13.** Sposobnost autoagregacije kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u zadanim vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazane kao postotak  $\pm$  SD

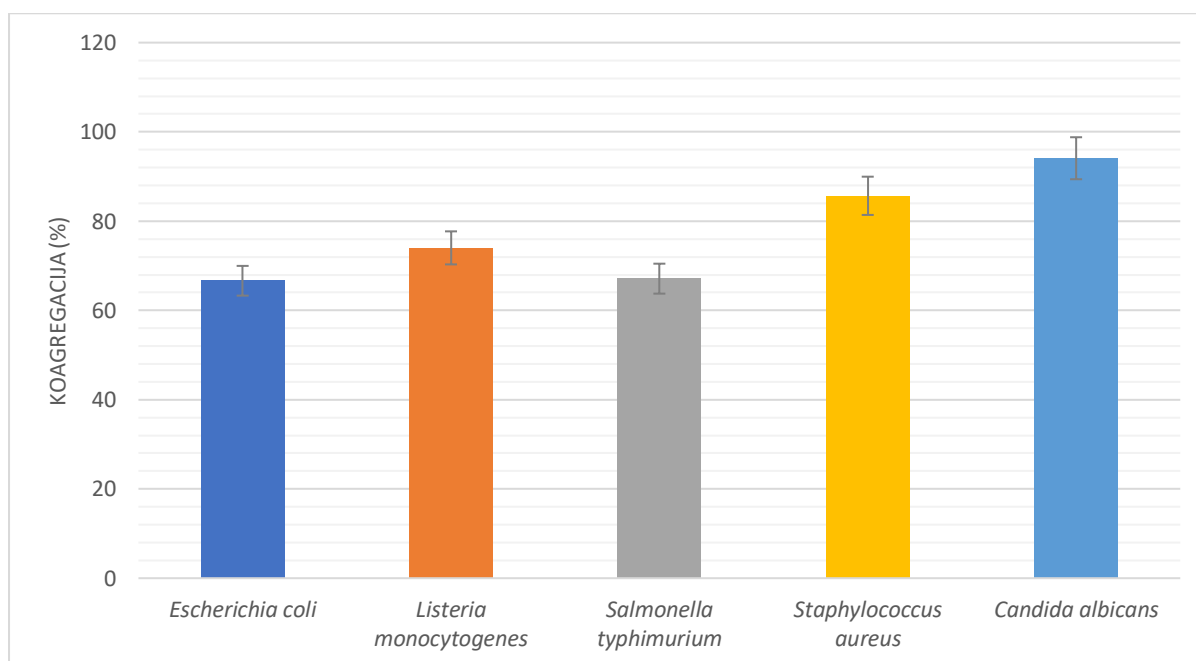
Iz rezultata prikazanih na slici 13 se može vidjeti kako vrijednosti autoagregacije (prikazane kao postotak autoagregiranih stanica) soja *Kluyveromyces marxianus* DS12 rastu s vremenom te nakon 24 sata inkubacije postižu vrijednost od oko 55 %.

U studiji Youn i sur. (2022) sojevi kvasca imali su vrijednosti autoagregacije u rasponu od 68,67 do 84,66 % nakon 5 sati inkubacije. Najviše vrijednosti nađene su za Km A5, koji je pokazao vrijednost autoagregacije od 84,66 %, dok je za Sb MYA-796 ta vrijednost iznosila 68,67 % ( $p < 0,05$ ).

Važno je spomenuti kako agregirane probiotičke stanice mogu spriječiti vezanje i kolonizaciju patogenih mikroorganizama na crijevne stijenke, djelujući na principu kompetitivne inhibicije i na taj način mogu isključiti patogene. Autoagregacija može poticati koagregaciju s drugim korisnim mikroorganizmima, potičući formiranje simbiotskih zajednica koje mogu promicati zdravu ravnotežu crijevne mikroflore (Alkanbani i sur., 2022).

#### 4.4.2. Koagregacijske sposobnosti kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Koagregacija se odnosi na sposobnost interakcije i međusobnog prijanjanja između dvije različite vrste mikroorganizama. U kontekstu probiotika, koagregacija može biti korisna jer omogućuje probiotičkim mikroorganizmima da interagiraju s drugim mikroorganizmima u gastrointestinalnom traktu, što može pomoći u inhibiranju rasta i prijanjanju patogenih bakterija. Drugim riječima, koagregacija može potaknuti probiotičke bakterije da „surađuju“ s drugim korisnim mikroorganizmima kako bi stvorile zaštitnu barijeru protiv patogena (Alkalbani i sur., 2022).



**Slika 14.** Sposobnost koagregacije kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD

Sukladno s dobivenim rezultatima koji su prikazani na slici 14, vrijednosti koagregacije soja *Kluyveromyces marxianus* DS12 s ispitivanim patogenima, izražene kao postotak koagregiranih stanica u odnosu na početnu vrijednost, rasle su s vremenom te dostigle najviše vrijednosti nakon 24 h sata inkubacije. Vrijednosti koagregacije protežu se od 67 do čak 94 %. Najnižu vrijednost koagregacije imala je *E. coli* dok je najvišu imala *C. albicans*.

Iznimno visoke stope koagregacije ukazuju na to da je *Kluyveromyces marxianus* DS12 ispunio još jedan od ključnih kriterija potrebnih za klasifikaciju kao probiotički soj.

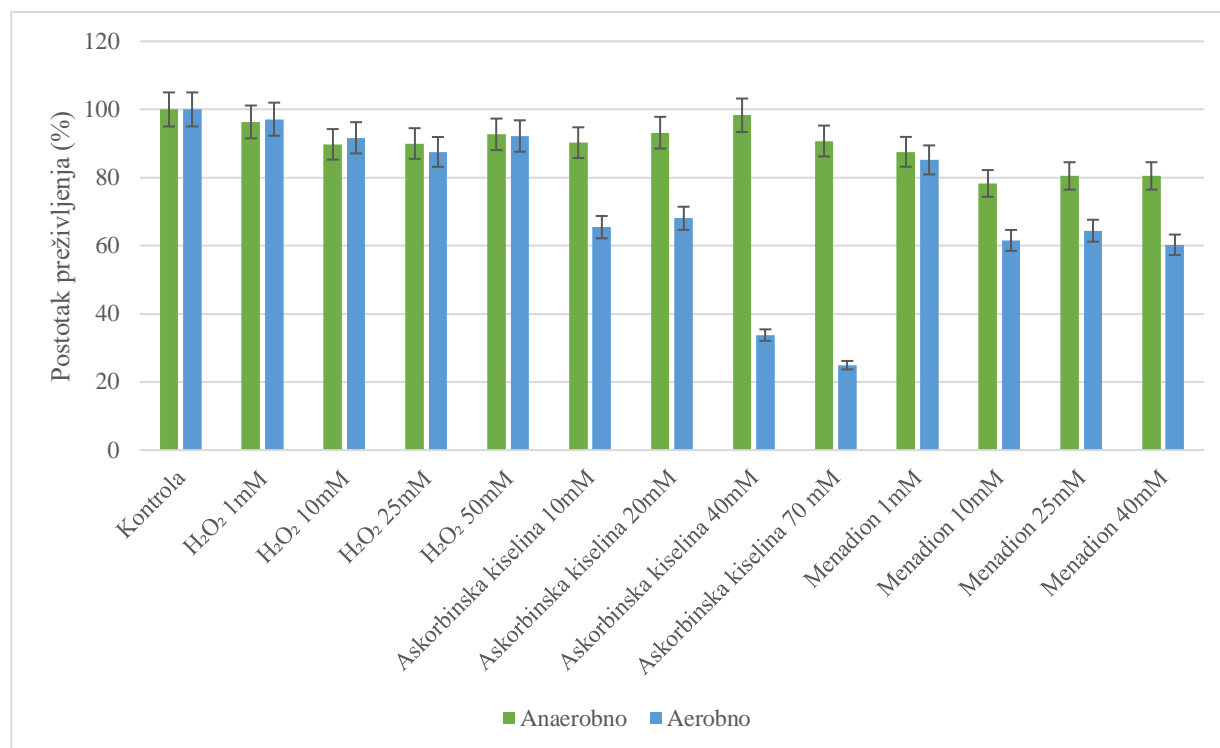
Rezultati istraživanja Díaz-Vergara i sur. (2017) su pokazali da se sposobnost kvasaca za vezanje drugih mikroorganizama razlikuje ovisno o soju kvasca i uključenom patogenu. Ispitani sojevi pokazali su kapacitet koagregacije u rasponu od 5,3 do 66,2 %, pri čemu su tri soja imala varijabilnu sposobnost vezanja za *Serratia* sp. *Kluyveromyces marxianus* VM005 pokazao je najnižu sposobnost vezanja, bez sposobnosti koagregacije s *E. coli* 81749 i slabim vezanjem za druge proučavane patogene bakterije, osim za *Serratia* sp. i *Salmonella* sp. LM006. *K. marxianus* VM004 pokazao je najbolji kapacitet koagregacije koji se kretao od 32,4 % do 66,2 %. Rezultati antimikrobne aktivnosti pokazali su da su svi sojevi imali dobru sposobnost inhibicije protiv proučavanih patogenih bakterija, osim *K. marxianus* VM003 protiv *S. Typhimurium* i *K. marxianus* VM004 protiv *E. coli* 81749. Međutim, *K. marxianus* VM004 pokazao je dobru sposobnost inhibicije protiv drugih proučavanih sojeva *E. coli*. Ustanovljeno je da je antimikrobna aktivnost povezana sa sojem.

#### **4.5. ODREĐIVANJE RASTA *Kluyveromyces marxianus* U UVJETIMA OKSIDACIJSKOG STRESA**

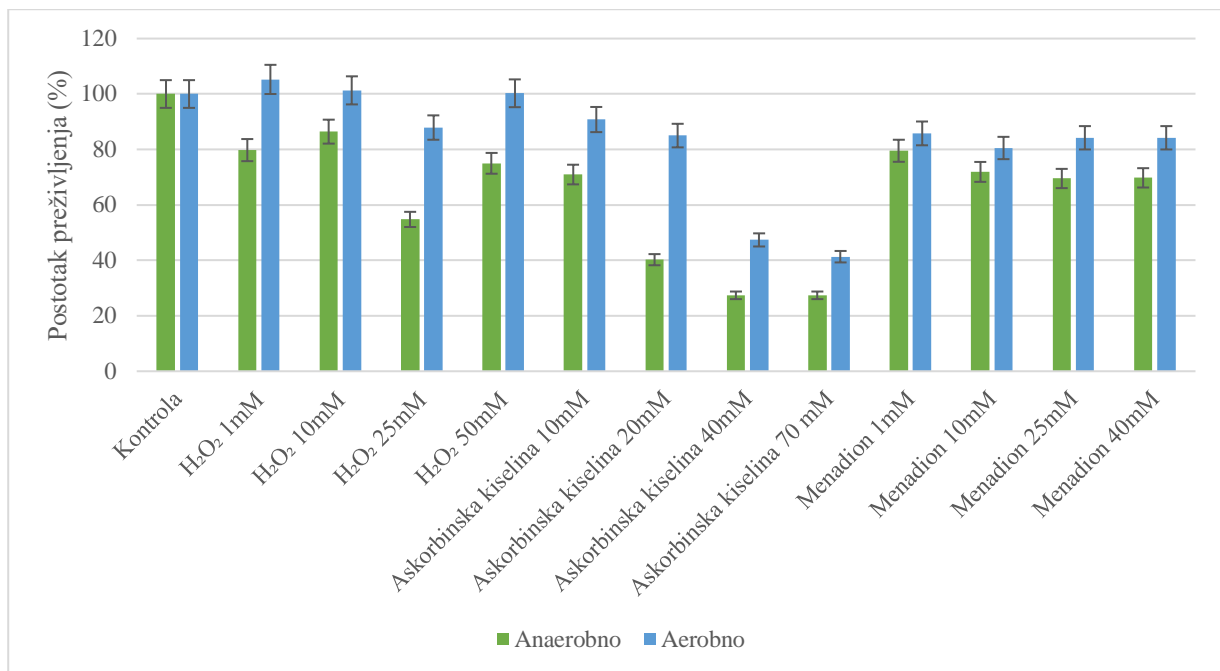
Aerobno uzgojeni kvasci izloženi su toksičnim nuspojavama molekularnog kisika, produkcijom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Te vrste nastaju tijekom normalnog staničnog metabolizma (npr. putem mitohondrijskog respiratornog lanca ili kroz reakcije proizvodnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koje kataliziraju oksidaze). ROS također mogu nastati prisutnošću prooksidanata, kao što su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parakvat ili menadion u mediju, izlaganjem ionizirajućem zračenju ili povećanjem tlaka kisika (hiperoksija ili reoksigenacija hipoksičnih stanica; Gille i Sigler 1995). ROS oštećuje stanične komponente oksidirajući lipide, proteine te nukleinske kiseline (Moradas-Ferreira i sur., 1996).

Vodikov peroksid i menadion dokazani su uzročnici oksidacijskog stresa na bakterijske stanice (Arcanjo i sur., 2019) pa je u ovom istraživanju ispitan utjecaj tih spojeva na stanice kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12.

Stanice kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 izložene su oksidacijskom stresu tako što su tijekom semiaerobnog i anaerobnog uzgoja izlagane rasponu koncentracija vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona. U tim se uvjetima mjerila sposobnost rasta kulture kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 te su zatim rezultati prikazani u obliku postotka rasta nakon izlaganja oksidacijskom stresu u usporedbi s kontrolnim uzorkom, koji nije bio izložen oksidacijskom stresu. Sposobnost rasta mjerila se nakon 24 i 48 sati uzgoja za medij i za stanice. Spomenute ovisnosti prikazane su na slikama 15 i 16:



**Slika 15.** Rast stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u sladnom bujonu pri različitim koncentracijama vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona. Rast je praćen 24 sata u anaerobnim i semiaerobnim uvjetima. Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD



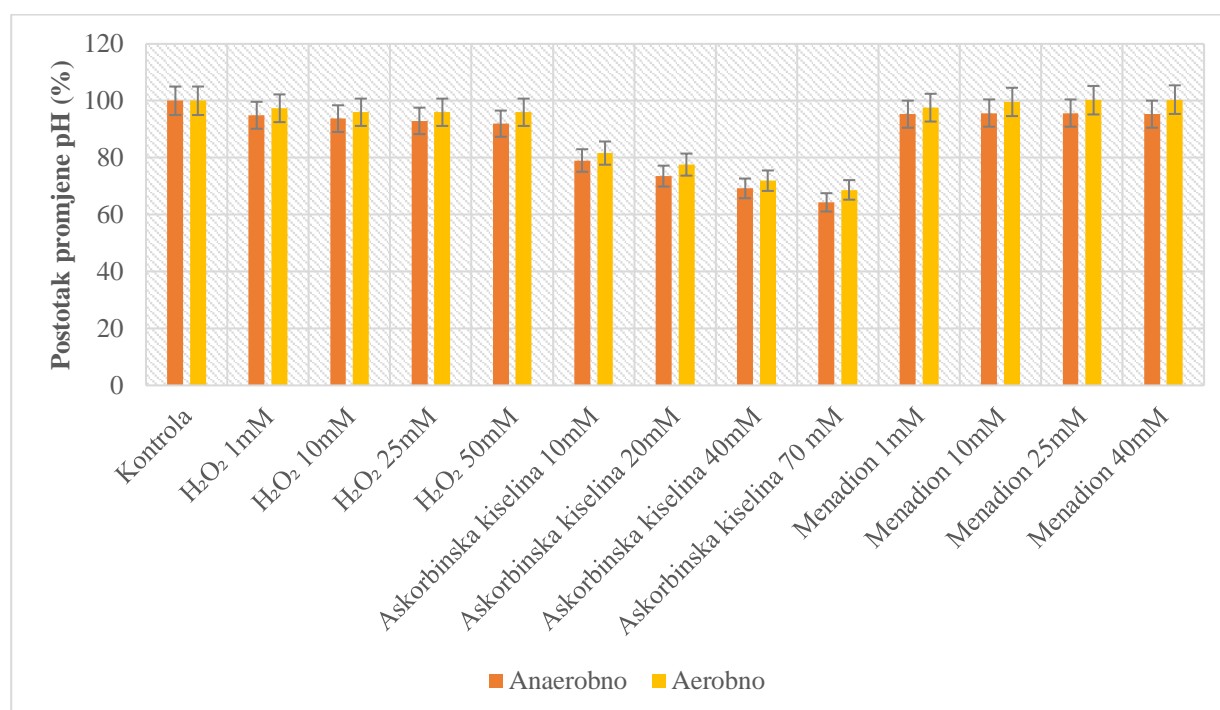
**Slika 16.** Rast stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u sladnom bujonu pri različitim koncentracijama vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona. Rast je praćen 48 sati u anaerobnim i semiaerobnim uvjetima. Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD

Iz dobivenih vrijednosti prikazanih na slikama 15 i 16, može se zaključiti da kvasac *Kluyveromyces marxianus* DS12 relativno dobro reagira na stresne uvjete. Kvasac pokazuje veću otpornost na oksidacijski stres ako je uzgojen semiaerobno. Broj stanica je opadao s povećanjem koncentracije uzročnika oksidacijskog stresa ali i s dužinom inkubacije. Pri koncentraciji od 25mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uočen je pad broja stanica za skoro 50 % dok je za menadion pri istoj koncentraciji on iznosio oko 30 %. Postotak preživljenja kod stanica tretiranih s 20 mM askorbinske kiseline pao je ispod 40 % što upućuje na smanjenje koncentracije stanica veće od 60 %.

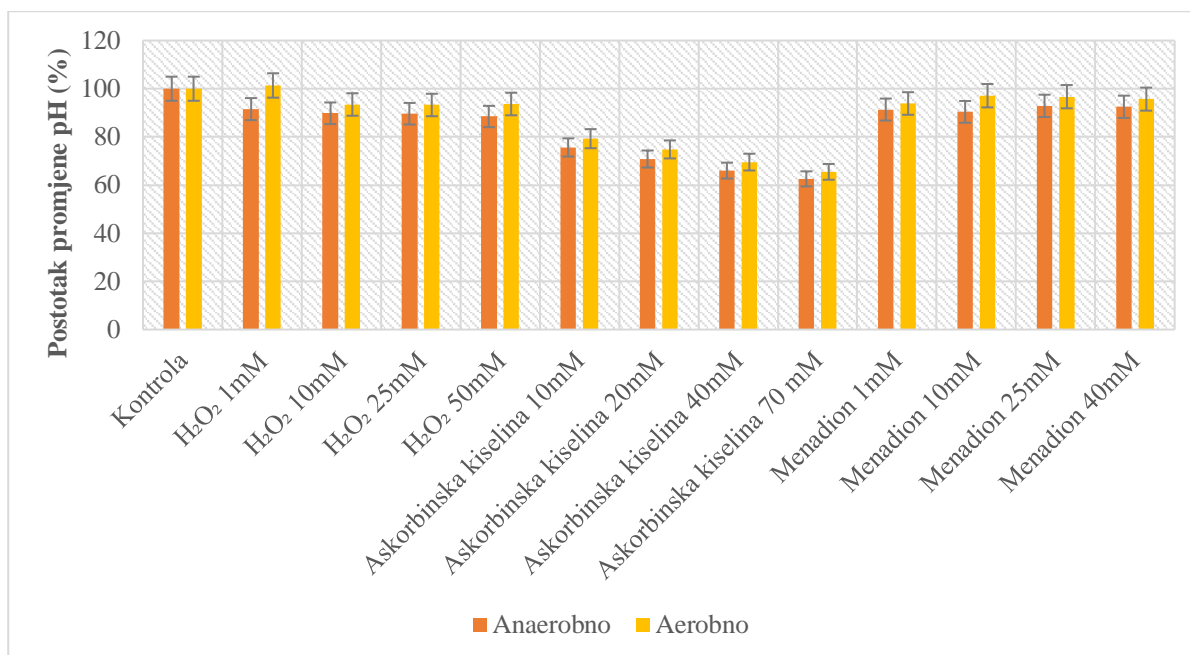
U istraživanju Pinheira i sur. (2002) testiran je utjecaj dva različita induktora oksidacijskog stresa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i parakvat, na rast stanica i održivost u fazi eksponencijalnog rasta. Kada su stanice bile izložene parakvatu (1 mM) ili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM), rast stanica je usporen za oba primijenjena tlaka. Primijećeno je smanjenje rasta stanica povećanjem tlaka s 1,2 bara na 6,0 bara kako u odsutnosti oksidanata, tako i u prisutnosti kemijskih oksidanata. Nakon dodavanja oksidanata, stanice su bile sposobne nastaviti rast; ali su dostigle veću konačnu koncentraciju stanica na 1,2 bara nego na 6,0 bara zračnog tlaka. Štoviše, stanice bolje reagiraju na izlaganje parakvatu nego na izlaganje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Održivost stanica počela je opadati nakon dodavanja kemikalija. Međutim,

na kraju eksperimenta, i dalje je bilo 50 % održivih stanica, što pokazuje da je ovaj soj *K. marxianus* prilično otporan na 1 mM parakvata i 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rezultati dobiveni za održivost stanica sugeriraju da je ovaj soj *Kluyveromyces* vrlo otporan na oba kemijska spoja, za korištene koncentracije, koje se smatraju smrtonosnima za druge mikroorganizme.

Osim optičke gustoće, stanicama kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12, koje su izložene oksidacijskom stresu tako što su u nakon semiaerobnog i anaerobnog uzgoja izlagane rasponu koncentracija vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona, izmjeren je i pH. pH je mjereno nakon uzgoja od 24 i 48 sati. Podaci su prikazani kao postotak pH kontrole.



**Slika 17.** Postotak promjene pH kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12, koji je uzgojen semiaerobno i anaerobno te je izložen oksidacijskom stresu tako da je tretiran s rasponom koncentracija vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona. Uzgoj je trajao 24 sata. Podaci su prikazani kao postotak pH kontrole ± SD



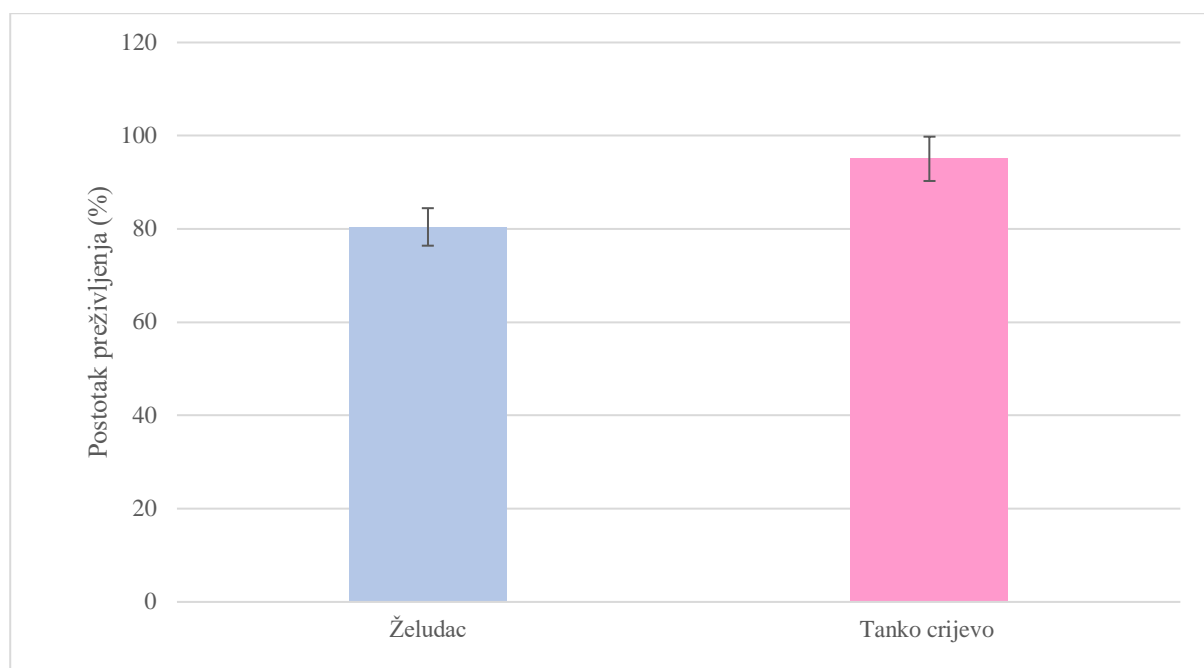
**Slika 18.** Postotak promjene pH kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12, koji je uzgojen semiaerobno i anaerobno te je izložen oksidacijskom stresu tako da je tretiran s rasponom koncentracija vodikovog peroksida, askorbinske kiseline i menadiona. Uzgoj je trajao 48 sati. Podaci su prikazani kao postotak pH kontrole  $\pm$  SD

Nije primijećena velika promjena pH vrijednosti tijekom uzgoja kvasca u uvjetima oksidacijskog stresa osim u slučaju askorbinske kiseline, što je bilo i očekivano zbog dodatka askorbinske kiseline.

#### 4.6. ODREĐIVANJE STUPNJA PREŽIVLJENJA U SIMULIRANIM UVJETIMA PROBAVNOG TRAKTA

Za ostvarivanje funkcionalnih učinaka probiotika od presudne je važnosti njihova sposobnost da prežive u specifičnim okruženjima raznih dijelova gastrointestinalnog sustava kako bi stigli do ciljane lokacije u tijelu domaćina. U ovom radu analizirana je otpornost izolata *Kluyveromyces marxianus* DS12 prema simuliranim uvjetima želuca i crijeva. Relevantni rezultati prikazani su na slici 19.





**Slika 19.** Preživljavanje kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 u simuliranim uvjetima želuca i crijeva izraženo kao postotak preživljavanja  $\pm$  SD

Jedna od glavnih prepreka za probiotičke mikroorganizme je kisela okolina želuca. pH želučane kiseline može biti između 1,5 i 3,5, što je vrlo kiselo. Ipak, *K. marxianus* i drugi probiotički kvasci razvili su mehanizme otpornosti na ovakve uvjete, uključujući promjene u staničnoj stijenci i membrani, koje mogu pomoći u zaštiti stanica od kiselog okoliša.

Kada stanice kvasca prežive kroz želudac, ulaze u tanko crijevo gdje se pH postupno povećava. U tankom crijevu, uvjeti su manje kiseli nego u želucu, ali još uvijek predstavljaju izazov za mnoge mikroorganizme. Međutim, probiotički kvasci poput *K. marxianus* „opremljeni“ su da se nose s tim uvjetima i mogu preživjeti te kolonizirati crijeva, pružajući potencijalne koristi domaćinu.

Analizom rezultata koji su prikazani na slici 19, utvrđeno je da kvasac *Kluyveromyces marxianus* DS12 dobro podnosi simulirane uvjete želuca, gdje je postotak preživljenja stanica iznosio oko 80 %, te više od 95 % za simulirane uvjete crijeva, što ga čini odličnim kandidatom za probiotički soj.

Otpornost *K. marxianus* na niski pH probavnog trakta potvrđena je i u istraživanju Youn i sur. (2022) koji su analizirali pet sojeva *K. marxianus* (Km A1-A5) i Sb MYA-79.6. Općenito, Km A4 i A5 pokazali su najveću sposobnost preživljavanja među testiranim Km sojevima. Nasuprot tome, Sb MYA-796 nije pokazao rast, već je samo preživio, u rasponu od

0,45 do 0,76 puta u različitim okruženjima. Zanimljivo je da je Km A4 pokazao značajno veću sposobnost preživljavanja od Sb MYA-796 u svim simuliranim uzastopnim GI okruženjima ( $p < 0,05$ ). Svi sojevi kvasca pokazali su veću sposobnost preživljavanja ili povećanje u okruženju s višim pH vrijednostima što je bilo i očekivano.

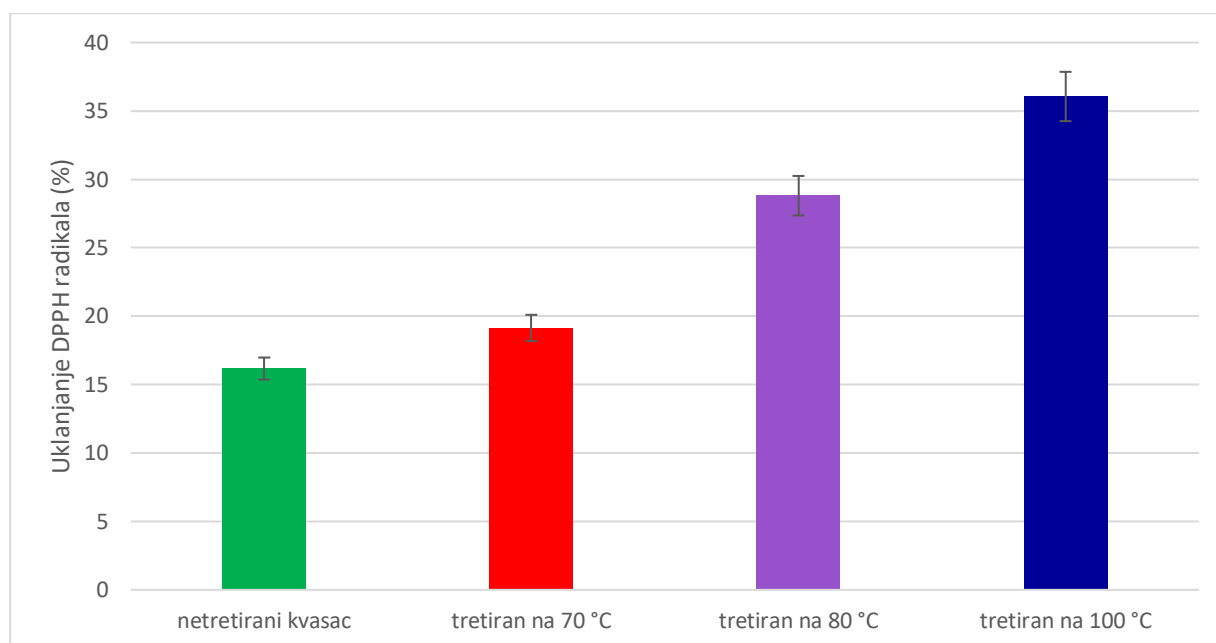
#### **4.7. SPOSOBNOST UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA**

Uklanjanje DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) slobodnih radikala je standardni test koji se koristi za procjenu antioksidacijske aktivnosti tvari, uključujući i metaboličke ekstrakte kvasaca. Test se temelji na sposobnosti antioksidansa u uzorku da reduciraju DPPH radikale, koji su stabilni i imaju karakterističnu ljubičastu boju. Kada se DPPH radikali neutraliziraju, dolazi do promjene boje, što se može kvantificirati mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom.

U kontekstu kvasaca, antioksidacijska aktivnost može biti povezana s prisutnošću antioksidacijskih spojeva poput glutathiona, superoksid dismutaze, katalaze, i drugih enzima koji štite stanicu od oksidacijskog stresa, kao i s manjim molekulama poput fenolnih spojeva koji su poznati po svojim antioksidacijskim svojstvima (Banu i sur., 2012).

U istraživanjima probiotika i postbiotika, sposobnost kvasca da uklanja DPPH slobodne radikale može biti indikator potencijalne koristi za zdravlje domaćina. Antioksidansi pomažu u zaštiti stanica od oksidacijskog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima, što je važno jer oksidacijski stres igra ulogu u mnogim bolestima, uključujući kardiovaskularne bolesti, rak i neurodegenerativne bolesti.

Antioksidacijski potencijal ispitan je određivanjem sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala (slika 20).



**Slika 20.** Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala netretiranog uzorka kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 i uzorka tretiranog izlaganju različitim temperaturama. Rezultati su prikazani kao postotak kontrole  $\pm$  SD

Na temelju podataka prikupljenih tijekom ovog eksperimenta, može se zaključiti kakav je utjecaj termičke obrade na antioksidacijsku aktivnost kvasca. Analiza rezultata ukazuje na to da toplinska obrada na 100 °C rezultira značajnim porastom antioksidacijske aktivnosti. Ovo se može objasniti rupturom stanične stijenke kvasca pri visokoj temperaturi, što dovodi do oslobađanja intracelularnih sadržaja, uključujući metabolite koji pokazuju antioksidacijska svojstva. Takvi, biološki aktivni metaboliti mogu se smatrati potencijalnim postbiotičkim spojevima. S obzirom na termolabilnost enzima kao što su peroksidaze, njihova uloga u vezanju slobodnih radikala na visokim temperaturama može biti ograničena zbog denaturacije, stoga je manje vjerojatno da su one primarni čimbenici u povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti koja je opažena.

U istraživanju Cho i sur. (2018) antioksidacijska aktivnost intaktnih stanica kvasca na DPPH bila je usporediva s onom kontrolnih kvasaca, SC i KL. KM2 je pokazao najveću antioksidacijsku aktivnost, 21,1 %, među kvascima izoliranim iz kefira. Intracelularni ekstrakti stanica kvasca dobiveni nakon sonikacije pokazali su antioksidacijske aktivnosti usporedive s kontrolnim kvascima, SC i KL. Antioksidacijske aktivnosti KM4 i KM5 bile su veće od onih kod KM1 i KM2. Općenito, antioksidacijske aktivnosti intracelularnih ekstrakata bez stanica bile su manje od onih kod intaktnih stanica kvasca. Druge studije su također pokazale manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti intracelularnih ekstrakata bez stanica nego kod intaktnih

stanica. Ovo smanjenje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata bez stanica moglo bi biti zbog odsutnosti antioksidacijskih tvari poput proteina i polisaharida (Chen i sur., 2010).

U kontekstu vezanja DPPH radikala, sposobnost bakterijskih ili kvašćevih stanica da djeluju kao antioksidansi tipično bi bila veća pri normalnim uvjetima rasta, jer bi visoke temperature kao što je 100 °C mogle dovesti do denaturacije proteina, uključujući enzime koji sudjeluju u antioksidacijskim procesima. Tijekom toplinskog stresa, stanične strukture i metabolički putevi mogu biti oštećeni ili inaktivirani, što može smanjiti sposobnost stanica da neutraliziraju slobodne radikale.

Međutim, ako je toplinski stres doveo do lize stanične stijenke i oslobađanja intracelularnih sadržaja, moguće je da bi koncentracija raspoloživih antioksidacijskih spojeva u mediju bila veća, što bi teoretski moglo rezultirati povećanom sposobnošću vezanja DPPH radikala. Ovo bi uključivalo oslobađanje antioksidacijskih molekula koje nisu enzimski aktivne, poput fenolnih spojeva ili drugih stabilnih antioksidanata koji nisu osjetljivi na visoke temperature. U tom bi slučaju, povećana antioksidacijska aktivnost bila rezultat otpuštanja tih spojeva, a ne inherentne sposobnosti živih stanica.

Stoga je mogućnost da tretirane stanice pri visokim temperaturama pokažu veću sposobnost vezanja DPPH radikala logična samo ako otpuštanje antioksidacijskih spojeva nadmašuje negativan učinak toplinskog stresa na stanice. Također, povećanje temperature može uzrokovati promjenu strukture stanične stijenke što može doprinijeti povećanju sposobnosti za vezanje DPPH radikala, no točan uzrok je potrebno utvrditi daljnjim istraživanjem. Tehnike ekstrakcije, poput sonikacije, liofilizacije ili upotrebe različitih otapala, mogu utjecati na stabilnost i očuvanje antioksidacijskih molekula kao i naravno razlika u sojevima (koja podrazumijeva različite metaboličke puteve), ali i uvjetima provođenja eksperimenta pa je to moguće objašnjenje zašto se rezultati pokusa razlikuju (Chen i sur., 2010).

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata tijekom provedbe ovog istraživanja, može se zaključiti:

1. Soj *Kluyveromyces marxianus* DS12 iskazuje visoko efikasne antimikrobne karakteristike u odnosu na analizirane patogene. Najviša zabilježena antimikrobna aktivnost, koja doseže 75 %, zabilježena je prema *Listeria monocytogenes*.
2. Ispitivani kvasac nije pokazao hemolitičku aktivnost jer oko poraslih kultura nije bilo vidljivih hemolitičkih zona što upućuje na  $\gamma$ -hemolizu, stoga se on smatra sigurnim za upotrebu kod ljudi.
3. U promatranom soju uočena je visoka sposobnost formiranja biofilma koja omogućava kvascu da uspostavi stabilno okruženje unutar gastrointestinalnog trakta, čime potencira svoju otpornost na agresivne uvjete, kao što su kiselost želuca i prisutnost žučnih soli.
4. Soj *Kluyveromyces marxianus* DS12 pokazao je srednje visoke vrijednosti autoagregacije (>55 % nakon 24 h) te visoke vrijednosti koagregacije s patogenima gdje je najveću vrijednost od 94 % imao s kulturom *C. albicans*.
5. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* DS12 iskazuje otpornost na stresne uvjete, a najvišu razinu otpornosti na oksidacijski stres iskazuje ako je uzgojen semiaerobno. Pri koncentraciji od 25mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uočen je pad broja stanica za skoro 50 % dok je za menadion pri istoj koncentraciji on iznosio oko 30 %. Kod stanica tretiranih s 20 mM askorbinske kiseline uočen je pad broja stanica za čak 60 %.
6. Analiza soja *Kluyveromyces marxianus* DS12 je pokazala visok stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava pa je tako utvrđeno da je postotak preživljenja stanica kvasca u simuliranim uvjetima želuca oko 80 %, dok je u simuliranim uvjetima crijeva on viši od 95 %.
7. Termička obrada kvasca na 100 °C oslobađanja intracelularnih postbiotičkih spojeva uslijed ruptore stanične stijenke, što rezultira značajno povećanom antioksidacijskom aktivnošću iskazanom kao postotak uklonjenih DPPH radikala.

## 6. LITERATURA

1. Adam J, Barret A, Barret-Bellet C (1977) Essai clinique controle en double issu de l'ultra levure lyophilisee. *Med Chir Digest* **5**, 401–406.
2. Alkalbani NS, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Olaimat, AN, Liu SQ, Shah NP, Apostolopoulos V, Ayyash MM (2022) Assessment of Yeasts as Potential Probiotics: A Review of Gastrointestinal Tract Conditions and Investigation Methods. *J Fungi* **8**, 365. <https://doi.org/10.3390/jof8040365>
3. Altieri C (2016) Dairy Propionibacteria as Probiotics: Recent Evidences. *World J Microbiol Biotechnol* **32**, 172–178. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2118-0>
4. Arcanjo NO, Andrade MJ, Padilla P, Rodríguez A, Madruga MS, Estévez M (2019) Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- induced oxidative stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the dhaT gene. *Free Radic Biol Med* **135**, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.023>
5. Banu I, Aprodu I (2012) Studies concerning the use of *Lactobacillus helveticus* and *Kluyveromyces marxianus* for rye sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol* **234**, 769–777. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1691-1>
6. Bayless TM, Brown E, Paige DM (2017) Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Curr Gastroentero* **19**, 23. <http://doi.org/10.1007/s11894-017-0558-9>
7. Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, Holland IB (1988) The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur J Epidemiol* **4**, 135–143. <https://doi.org/10.1007/BF00144740>
8. Bilal M, Ji L, Xu Y, Xu S, Lin Y, Iqbal HMN, Cheng H (2022) Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. *Front Bioeng Biotechnol* **10**, 851768. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>
9. Borges S, Silva J, Teixeira P (2012) Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**, 677–682. <https://doi.org/10.1007/S10482-011-9666-Y>
10. Cardoso VM, Borelli BM, Lara CA, Soares MA, Pataro C, Bodevan EC i sur. (2015) The Influence of Seasons and Ripening Time on Yeast Communities of a Traditional Brazilian Cheese, *Food Res Int* **69**, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>

11. Cernak P, Estrela R, Poddar S, Skerker JM, Cheng YF, Carlson AK i sur. (2018) Engineering *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Synthetic Biology Platform Host. *mBio* **9**, e01410-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01410-18>
12. Chen LS, Ma Y, Maubois JL, Chen LJ, Liu QH, Guo JP (2010) Identification of yeasts from raw milk and selection for any antioxidant properties. *Int J Dairy Technol* **63**, 47-54. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00548.x>.
13. Cho YJ, Kim DH, Jeong D, Seo KH, Jeong HS, Lee HG i sur. (2018) Characterization of Yeasts Isolated from Kefir as a Probiotic and its Synergic Interaction with the Wine Byproduct Grape Seed Flour/extract. *Lebensm Wiss Technol* **90**, 535–539. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.010>
14. Coloretti F, Chiavari C, Luise D, Tofalo R, Fasoli G, Suzzi G, Grazia L (2017) Detection and identification of yeast in natural whey starter for Parmigiano Reggiano cheese-making. *Int J Dairy Technol* **66**, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.013>
15. Cosme F, Inês A, Vilela A (2022) Consumer's acceptability and health consciousness of probiotic and prebiotic of non-dairy products. *Food Res Int* **151**, 110842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110842>
16. Cousin FJ, Jouan-Lanhouet S, Dimanche-Boitrel MT, Corcos L, Jan G (2012) Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PloS One* **7**, e31892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031892>
17. Deive FJ, Costas M, Longo MA (2003) Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* **25**, 1403–1406. <https://doi.org/10.1023/a:1025049825720>
18. de Vrese M, Schrezenmeir J (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **111**, 1–66. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_097](https://doi.org/10.1007/10_2008_097)
19. Díaz-Vergara L, Pereyra CM, Montenegro M, Pena GA, Aminahuel CA, Cavaglieri LR (2017) Encapsulated whey-native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **34**, 750–759. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1290830>
20. Fasoli G, Barrio E, Tofalo R, Suzzi G, Belloch C (2016) Multilocus analysis reveals large genetic diversity in *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from Parmigiano Reggiano and Pecorino di Farindola cheeses. *Int J Food Microbiol* **233**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.028>

21. Fernandez-Bellot E, Cullin C (2001) The protein-only theory and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the prions and the propagons. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1857–1878. <https://doi.org/10.1007/PL00000823>
22. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann , Gombert AK (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 339–354. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>
23. Frece J (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
24. Frece J, Markov K, Kovačević D (2011) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* **12** 92–98.
25. Gille G, Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* **40**, 131–152. <https://doi.org/10.1007/BF02815413>
26. Goktas H, Dikmen H, Demirbas F, Sagdic O, Dertli E (2021) Characterisation of Probiotic Properties of Yeast Strains Isolated from Kefir Samples. *Int J Dairy Technol* **74**, 715–722. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12802>
27. Grba S (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Plejada, Zagreb.
28. Gut AM, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor ON (2018) *Salmonella* infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology* **164**, 1327–1344. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000709>
29. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund M F, Lidén G, Zacchi G (2006) Bioethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* **24**, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>
30. Halder D, Mandal M, Chatterjee SS, Pal NK, Mandal S (2017) Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines* **5**, 1–11. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020031>
31. Hatoum R, Labrie S, Fliss I (2012) Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol* **3**, 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>
32. Hensing M, Vrouwenvelder H, Hellinga C, Baartmans R, Van Dijken H (1994) Production of Extracellular Inulinase in High-Cell-Density Fed-Batch Cultures of *Kluyveromyces Marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 516–521.



33. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B i sur. (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterol Hepatol* **11**, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
34. Hsiung RT, Fang WT, LePage BA, Hsu SA, Hsu CH, Chou JY (2021) In Vitro properties of Potential Probiotic Indigenous Yeasts Originating from Fermented Food and Beverages in Taiwan. *Probiotics Antimicrob Proteins* **13**, 113–124. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09661-8>
35. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. (n.d.). About ISAPP. Preuzeto [03. studenog 2023.], sa <https://isappsience.org/about-isapp/>
36. Jäger R, Mohr AE, Carpenter KC, Kerksick CM, Purpura M, Moussa A, i sur. (2019) International Society of Sports Nutrition Position Stand: Probiotics. *J Int Soc Sports Nutr* **16**, 62. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0329-0>
37. Karim A, Gerliani N, Aider M (2020) *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int J Food Microbiol* **333**, 108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
38. Karimi S, Mahboobi Soofiani N, Mahboubi A, Taherzadeh MJ (2018) Use of Organic Wastes and Industrial By-Products to Produce Filamentous Fungi with Potential as Aqua-Feed Ingredients. *Sustainability* **10**, 3296. <https://doi.org/10.3390/su10093296>
39. Kos B, Šuskovic J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**, 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
40. Kostelac D (2022) Formulacija i razvoj višestruko mikroinkapsuliranog probiotika s ciljanim učincima na zdravlje (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
41. Lane MM, Morrissey JP (2010) *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol Rev* **24**, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>
42. Martinez-Corona R, Banderas-Martínez FJ, Pérez-Castillo JN, CortesPenagos C, González-Hernández JC (2019) Avocado Oil as an Inducer of the Extracellular Lipase Activity of *Kluyveromyces Marxianus* L2029. *Food Sci Technol* **40**, 121–129. <https://doi.org/10.1590/fst.06519>

43. Martins DBG, de Souza CG, Jr Simoes DA, de Morais MA Jr (2002) The  $\beta$ -galactosidase Activity in *Kluyveromyces Marxianus* CBS6556 Decreases by High Concentrations of Galactose. *Curr Microbiol* **44**, 379–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0052-2>
44. Mcfarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA i sur. (1994) A randomized placebo-controlled trial combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *J Am Med Assoc* **271**, 1913–1918.
45. Mirzaei M, Aminlari M, Hosseini E (2016) Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activities of *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates and their peptide fractions. *Funct Foods Health Dis* **6**, 425–439. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v6i7.250>
46. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol microbiol* **19**, 651–658. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.403940.x>
47. Motey GA, Johansen PG, Owusu-Kwarteng J, Ofori LA, Obiri-Danso K, Siegumfeldt, H, Jespersen L (2020) Probiotic Potential of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces Marxianus* Isolated from West African Spontaneously Fermented Cereal and Milk Products. *Yeast* **37**, 403–412. <https://doi.org/10.1002/yea.3513>
48. Oliveira C, Guimarães PM, Domingues L (2011) Recombinant Microbial Systems for Improved  $\beta$ -galactosidase Production and Biotechnological Applications. *Biotechnol Adv* **29**, 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.008>
49. Padilla B, Frau F, Ruiz-Matute AI, Montilla A, Belloch C, Manzanares P, i sur. (2015) Production of Lactulose Oligosaccharides by Isomerisation of Transgalactosylated Cheese Whey Permeate Obtained by  $\beta$ -galactosidases from Dairy *Kluyveromyces*. *J Dairy Res* **82**, 356–364. <https://doi.org/10.1017/s0022029915000217>
50. Perpetuini G, Tittarelli F, Suzzi G, Tofalo R (2019) Cell Wall Surface Properties of *Kluyveromyces marxianus* Strains From Dairy-Products. *Front Microbiol* **10**, 79. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00079>
51. Pinheiro R, Belo I, Mota M (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 842–847. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0927-y>
52. Pivarnik LF, Senecal AG, Rand AG (1995) Hydrolytic and Transgalactosylic Activities of Commercial  $\beta$ -galactosidase (Lactase) in Food Processing. *Adv Food Nutr Res* **38**, 1–102. [https://doi.org/10.1016/s1043-4526\(08\)60083-2](https://doi.org/10.1016/s1043-4526(08)60083-2)

53. Ratsep M (2014) Effect of *Lactobacillus plantarum* strains on clinical isolates of *Clostridium difficile* *in vitro*. *J Probiotics Health* **2**, 1000119. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000119>
54. Ristow LC, Welch RA (2016) Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochim Biophys Acta* **1858**, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.015>
55. Ritala A, Häkkinen ST, Toivari M, Wiebe MG (2017) Single Cell Protein—State-Of-The-Art, Industrial Landscape, and Patents 2001–2016. *Front Microbiol* **8**, 2009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
56. Rouwenhorst RJ, Visser LE, Van Der Baan AA, Scheffers WA, Van Dijken JP (1988) Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces Marxianus* CBS 6556. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1131–1137. <http://doi.org/10.1128/aem.54.5.1131-1137.1988>
57. Ruhai R, Kataria R (2021) Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res* **251**, 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>
58. Saber A, Alipour B, Faghfoori Z, Khosroushahi AY (2017) Secretion Metabolites of Dairy *Kluyveromyces Marxianus* AS41 Isolated as Probiotic, Induces Apoptosis in Different Human Cancer Cell Lines and Exhibit Antipathogenic Effects. *J Funct Foods* **34**, 408–421. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.007>
59. Sarmah N, Revathi D, Sheelu G, Yamuna Rani K, Sridhar S, Mehtab V, i sur. (2018) Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. *Biotechnol Prog* **34**, 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
60. Sharma R, Soni SK, Vohra RM, Gupta LK, Gupta JK (2002) Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* Sp. RSJ-1. *Process Biochem* **37**, 1075–1084. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(01\)00316-8](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(01)00316-8)
61. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016) Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st century. *3 Biotech* **6**, 1–15. <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
62. Son S, Lewis BA (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* **50**, 468–472. <https://doi.org/10.1021/jf010830b>
63. Stergiou PY, Foukis A, Sklivaniti H, Zacharaki P, Papagianni M, Papamichael EM (2012) Experimental Investigation and Optimization of Process Variables Affecting the

- Production of Extracellular Lipase by *Kluyveromyces Marxianus* IFO 0288. *Appl Biochem Biotechnol* **168**, 672–680. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9808-3>
64. Su M, Hu Y, Cui Y, Wang Y, Yu H, Liu J, Piao C (2021) Production of  $\beta$ -glucosidase from Okara Fermentation Using *Kluyveromyces Marxianus*. *J Food Sci Technol* **58**, 366–376. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04550-y>
  65. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, Van Belle G (1990) Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Z Gastroenterol* **28**, 259–260.
  66. Šiekštelė R, Veteikytė A, Tvaska B, Matijošytė I (2015) Yeast *Kluyveromyces Lactis* as Host for Expression of the Bacterial Lipase: Cloning and Adaptation of the New Lipase Gene from *Serratia Sp.* *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**, 1309–1317. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1655-0>
  67. Taverniti V, Guglielmetti S (2011) The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* **6**, 261–274. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>
  68. UC Davis (2018) <<https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/winemicrobiology/yeast-mold/kluyveromyces-marxianus>>. Pristupljeno 03. studenog 2023.
  69. Vinderola G, Sanders ME, Salminen S (2022) The Concept of Postbiotics. *Foods* **11**, 1077. <https://doi.org/10.3390/foods11081077>
  70. Winston JA, Theriot CM (2020) Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut microbes* **11**, 158–171. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1674124>
  71. Yadav JSS, Bezawada J, Ajila CM, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY (2014a) Mixed Culture of *Kluyveromyces Marxianus* and *Candida Krusei* for Single-Cell Protein Production and Organic Load Removal from Whey. *Bioresour Technol* **164**, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.069>
  72. Yadav JSS, Bezawada J, Elharche S, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY (2014b) Simultaneous Single-Cell Protein Production and COD Removal with Characterization of Residual Protein and Intermediate Metabolites during Whey Fermentation by *K. Marxianus*. *Bioproc Biosyst Eng* **37**, 1017–1029. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1072-6>
  73. Yadav JSS, Yan S, Ajila CM, Bezawada J, Tyagi RD, Surampalli RY (2016) Food-grade Single-Cell Protein Production, Characterization and Ultrafiltration Recovery of

- Residual Fermented Whey Proteins from Whey. *Food Bioprod Process* **99**, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.04.012>
74. Youn HY, Kim DH, Kim HJ, Bae D, Song KY, Kim H, Seo KH (2022) Survivability of *Kluyveromyces marxianus* Isolated From Korean Kefir in a Simulated Gastrointestinal Environment. *Front Microbiol* **13**, 842097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.842097>
75. Youn HY, Kim DH, Kim HJ, Jang YS, Song KY, Bae D, Kim H, Seo KH (2023) A Combined *In Vitro* and *In Vivo* Assessment of the Safety of the Yeast Strains *Kluyveromyces marxianus* A4 and A5 Isolated from Korean Kefir. *Probiotics Antimicrob Proteins* **15**, 129–138. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09872-7>
76. Zhou HX, Xu JL, Chi Z, Liu GL, Chi ZM (2013)  $\beta$ -Galactosidase Over-production by a Mig1 Mutant of *Kluyveromyces Marxianus* KM for Efficient Hydrolysis of Lactose. *Biochem Eng J* **76**, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.010>
77. Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W (2020). Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* **12**(8), 2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>
78. Zotta T, Ricciardi A, Ianniello RG, Parente E, Reale A, Rossi F, Iacumin L, Comi G, Coppola R (2014) Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. *PLoS ONE* **9**, e99189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099189>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis