

# Proizvodnja šećernih alkohola s pomoću ne-Saccharomyces kvasaca

---

**Burić, Branimir**

**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:159:756611>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



MSVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Branimir Burić

**PROIZVODNJA ŠEĆERNIH  
ALKOHOLA S POMOĆU NE-  
*Saccharomyces* KVASACA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Antonije Trontel te uz pomoć dr. sc. Nenada Marđetka.

*Prije svega zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Antoniji Trontel na susretljivosti, savjetima, strpljenju, uloženom trudu i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Mariu Novaku i dr. sc. Nenadu Marđetku na pomoći, savjetima te stvaranju ugodne i produktivne atmosfere.*

*Najveće hvala mojim roditeljima Ivanu i Ružici na neizmjernom strpljenju, razumijevanju, motivaciji, podršci i savjetima zbog kojih sam ustrajao na svome putu i kada je bilo najteže! Hvala i mojoj sestri Katarini koja je imala strpljenja za moja učenja dugo u noć.*

*Veliko hvala prijateljima i kolegama koji su uljepšali moje studentske dane.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PROIZVODNJA ŠEĆERNIH ALKOHOLA S POMOĆU NE-*Saccharomyces* KVASACA

*Branimir Burić*, univ. bacc. ing. biotechn. 0058212369

## Sažetak:

U ovom radu provedeni su uzgoji kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM21175, *Candida lyxosophila* JCM7532 i *Scheffersomyces stipitis* JCM10742, te kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM3418 s ciljem određivanja koje šećerne alkohole mogu u određenim uvjetima proizvesti. Uzgoji su provedeni u podlogama s glukozom i glicerolom, bez i s dodatkom NaCl-a. Među testiranim kvascima najveće koncentracije eritritola, manitola i maltitola proizveo je kvasac *Y. lipolytica* DSM21175. U podlozi s glukozom i NaCl-om proizvedeno je 1,19 g L<sup>-1</sup> eritritola. U podlozi s glicerolom proizvedeno je 2,32 g L<sup>-1</sup> manitola, a u podlozi s glicerolom i NaCl-om proizvedeno je 0,55 g L<sup>-1</sup> maltitola i 0,60 g L<sup>-1</sup> eritritola. Uzgoji *Y. lipolytica* DSM21175 u većem mjerilu provedeni su u tzv. „podlozi za proizvodnju eritritola“ i podlozi s kvašičevim ekstraktom, peptonom i glicerolom (YPG) uz dodatak NaCl-a. U „podlozi za proizvodnju eritritola“ proizveden je eritritol, a u YPG podlozi u niskim koncentracijama proizvedeni su eritritol, manitol i maltitol.

**Ključne riječi:** ne-*Saccharomyces* kvasci, *Yarrowia lipolytica*, šećerni alkoholi, eritritol, glicerol

**Rad sadrži:** 54 stranice, 17 slika, 7 tablica, 49 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Antonija Trontel

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Nenad Mardetko

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Mario Novak (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Antonija Trontel (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

**Datum obrane:** 20. srpnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### SUGAR ALCOHOLS PRODUCTION USING NON-*Saccharomyces* YEASTS

*Branimir Burić*, univ. bacc. ing. biotechn. 0058212369

**Abstract:**

In this work, yeasts *Yarrowia lipolytica* DSM21175, *Candida lyxosophila* JCM7532 and *Scheffersomyces stipitis* JCM10742, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ZIM3418 were cultivated in order to determine which sugar alcohols these yeasts can produce under certain conditions. Cultivations were carried out in media with glucose and glycerol without and with the addition of NaCl. The yeast *Y. lipolytica* DSM2175 produced the highest concentrations of erythritol, mannitol and maltitol among the tested yeasts. In the medium with glucose and NaCl, it was produced 1.19 g L<sup>-1</sup> of an erythritol. In the medium with glycerol, 2.32 g L<sup>-1</sup> of mannitol was produced, while in the medium with glycerol and NaCl, 0.55 g L<sup>-1</sup> of maltitol and 0.60 g L<sup>-1</sup> of erythritol were produced. Cultivations of the yeast *Y. lipolytica* DSM2175 on a larger scale were carried out in "erythritol production medium" and yeast extract, peptone, glycerol medium (YPG) with the addition of NaCl. In "erythritol production medium" only erythritol was produced, while in YPG medium erythritol, mannitol and maltitol were produced in relatively low concentrations.

**Keywords:** non-*Saccharomyces* yeasts, *Yarrowia lipolytica*, sugar alcohols, erythritol, glycerol

**Thesis contains:** 54 pages, 17 figures, 7 tables, 49 references, 1 supplement

**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:** Antonija, Trontel, PhD, Assistant professor

**Technical support and assistance:** *Nenad, Marđetko, PhD*

**Reviewers:**

1. Mario, Novak, PhD, Assistant professor (president)
2. Antonija, Trontel, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Andreaj, Leboš Pavunc, Associate professor (member)
4. Blaženka, Kos, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** July 20<sup>th</sup>, 2023

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. KVASCI KAO RADNI MIKROORGANIZMI U BIOTEHNOLOGIJI .....	2
2.2. NEKONVENCIONALNI (NE- <i>Saccharomyces</i> ) KVASCI .....	3
2.2.1. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	3
2.2.1.1. Metabolizam i proizvodi kvasca <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	4
2.2.1.2. Šećerni alkoholi – polioli.....	7
2.3. SIROVINE U BIOTEHNOLOGIJI .....	8
2.3.1. Glicerol .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	11
3.1.2. Kemikalije.....	12
3.1.3. Hranjive podloge .....	12
3.1.3.1. Hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama .....	12
3.1.3.2. Hranjive podloge za inokulum za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama .....	12
3.1.3.3. Hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama .....	13
3.1.3.4. Hranjive podloge za inokulum za uzgoje u bioreaktoru .....	13
3.1.3.5. Hranjive podloge za uzgoj u bioreaktoru .....	13
3.1.4. Aparatura i pribor .....	13
3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (UPLC) .....	13
3.1.4.2. Spektrofotometar.....	14
3.1.4.3. Centrifuge .....	14
3.1.4.4. Bioreaktori s miješalima.....	14
3.1.4.5. Ostala aparatura i pribor .....	15
3.2. METODE .....	15
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	15
3.2.1.1. Priprema hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama .....	15
3.2.1.2. Priprema hranjive podloge za inokulum za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama .	15
3.2.1.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama .....	16



3.2.1.4. Priprema hranjive podloge za inokulum za uzgoj bioreaktoru .....	16
3.2.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj bioreaktoru .....	16
3.2.2. Uzgoj kvasaca .....	17
3.2.2.1. Aerobni uzgoj kvasaca u podlozi s glicerolom.....	17
3.2.2.2. Uzgoj kvasaca u podlozi s glukozom kao glavnim izvorom ugljika bez i s dodatkom NaCl-a te u podlozi s glicerolom kao glavnim izvorom ugljika bez i s dodatkom NaCl-a 17	
3.2.2.3. Uzgoj kvasaca u bioreaktoru .....	17
3.3. ANALITIČKE METODE .....	18
3.3.1. Mjerenje optičke gustoće uzoraka.....	18
3.3.2. Mjerenje koncentracije suhe tvari biomase .....	18
3.3.3. Analiza uzoraka uređajem za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC) .....	19
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>20</b>
4.1. AEROBNI UZGOJ KVASACA U PODLOZI S GLICEROLOM .....	21
4.2. UZGOJ KVASACA U PODLOZI S GLUKOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA I ODREĐIVANJE PRODUKATA METABOLIZMA TIJEKOM UZGOJA BEZ I S DODATKOM NaCl-a.....	25
4.3. UZGOJ KVASACA U PODLOZI S GLICEROLOM KAO IZVOROM UGLJIKA I ODREĐIVANJE PRODUKATA METABOLIZMA TIJEKOM UZGOJA BEZ I S DODATKOM NaCl-a.....	35
4.4. UZGOJ KVASCA <i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175 U BIOREAKTORIMA S MIJEŠALOM.....	45
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>49</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>50</b>
<b>7. PRILOZI</b>	

# 1. UVOD

Šećerni alkoholi ili, kako se još nazivaju, polioli su organski spojevi uglavnom proizvedeni iz šećera. Stabilni su pri visokim temperaturama i pri promjenama pH vrijednosti, imaju nekancerogena svojstva, ne uzrokuju kvarenje zubi i puno manje od saharoze utječu na količinu šećera u krvi. Mogu se naći u prirodi, posebice u voću i povrću. Pojavom svijesti o prehrani i zdravijem načinu života, konzumacija šećera postala je jedan od glavnih zdravstvenih pitanja ljudi svih naraštaja. Upravo zbog svojih svojstava, šećerni alkoholi nameću se kao zamjena za saharozu. Najčešće korišteni šećerni alkoholi su: sorbitol, manitol, ksilitol, izomaltoza, maltitol, laktitol i eritritol (Carocho i sur., 2017). U mikrobnom metabolizmu polioli imaju nekoliko uloga: mogu se koristiti kao izvori ugljika, uključeni su u regulaciju koenzima ili djeluju kao osmoregulatorni spojevi. Zbog toga mnogi mikroorganizmi, uključujući različite bakterije (primjerice bakterije mliječne kiseline), plijesni (primjerice plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*) i kvasce (primjerice kvasci roda *Candida*, *Yarrowia*, *Hansenula*), prirodno proizvode šećerne alkohole. Tako su identificirani mikroorganizmi koji proizvode arabitol, eritritol, galaktinol, glicerol, manitol, ribitol, sorbitol ili ksilitol iz odgovarajućih šećera (L-arabitol iz L-arabinoze) ili iz drugih poliola (eritritol iz glicerola; Erian i sur., 2022).

Najčešće korišten kvasac kao radni mikroorganizam u industriji je *Saccharomyces cerevisiae*. Međutim, kako se javlja potreba za korištenjem novih, obnovljivih izvora ugljika, tako se javlja potreba za kvascima koji imaju mogućnost metaboliziranja različitih izvora ugljika. Stoga se koriste ne-*Saccharomyces* kvasci, odnosno kvasci koji ne pripadaju rodu *Saccharomyces*. Oni posjeduju neuobičajene i za biotehnologiju zanimljive karakteristike, poput otpornosti na stresne uvjete i mogućnosti korištenja različitih izvora ugljika kao što su škrob, celuloza, arabinoza, ksiloza i šećerni alkoholi (glicerol, eritritol, manitol i sl.; Kręgiel i sur., 2017).

Cilj ovoga rada bio je odrediti i proizvesti šećerne alkohole s pomoću ne-*Saccharomyces* kvasaca. Stoga je proveden uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532 i *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, te kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u podlogama s glukozom i glicerolom. Na temelju rezultata odabran je kvasac koji je najbolji producent šećernih alkohola. Uzgoji u većem mjerilu provedeni su s pomoću kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, u podlogama s glicerolom uz dodatak NaCl-a.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KVASCI KAO RADNI MIKROORGANIZMI U BIOTEHNOLOGIJI

Kvasac je jednostanični mikroorganizam detaljno proučavan u fiziologiji, genetici i molekularnoj biologiji. Također je korišten kao modelni organizam za razumijevanje ostalih mikroorganizama, a do danas je otkriveno i opisano najmanje 1500 vrsta (Onyema i sur., 2023). Osim toga, kvasci imaju široku industrijsku važnost u znanstvenim, prehrambenim, medicinskim i poljoprivrednim granama. Zbog svojih tradicionalnih industrijskih svojstava imaju primarnu ulogu u mnogim procesima fermentacije hrane kao što je fermentacija piva, vina, jabukovače, destiliranih alkoholnih pića, pekarskih proizvoda, sira, kobasica i ostalih proizvoda. Ostali dugotrajniji procesi u kojima se koriste kvasci su proizvodnja etanola za gorivo, jednostaničnih proteina, krmiva i stočne hrane, industrijskih enzima te metabolita niske molekulske mase. Određene vrste kvasaca razvijene su kao industrijski mikroorganizmi za heterolognu proizvodnju enzima i proteina. Različiti kvasci, posebice *Saccharomyces cerevisiae*, koriste se kao domaćini za ekspresiju proteinskih biokatalizatora i više-enzimskih putova za sintezu finih kemikalija i spojeva niske molekulske mase od medicinske i nutritivne važnosti. Također, imaju važnu ulogu u poljoprivredi kao pokazatelji kvalitete okoliša te u biokontroli i bioremedijaciji (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011). Primjenu u industriji kvasci duguju metaboličkoj sposobnosti fermentacije šećera do etanola i ugljikovog dioksida u anaerobnim uvjetima. Štoviše, u procesu fermentacije nastaje velik broj sekundarnih spojeva koji utječu na organoleptička svojstva određenih prehrambenih proizvoda. Naravno, kvasci nemaju samo fermentativni metabolizam, nego imaju sposobnost rasta i u aerobnim uvjetima (Żymańczyk-Duda i sur., 2017). Većinom se kvasci klasificiraju u dvije skupine: konvencionalni kvasci i nekonvencionalni kvasci. Skupini konvencionalnih kvasaca pripadaju *Saccharomyces cerevisiae* i njemu blisko srodne vrste kvasaca, a svi ostali kvasci pripadaju skupini nekonvencionalnih kvasaca (Onyema i sur., 2023).

Kvasac *S. cerevisiae* smatra se najvrjednijom vrstom kvasaca za razne industrijske primjene. Točnije, kvasac i u aerobnim i anaerobnim uvjetima proizvodi etanol koji ima inhibitorni utjecaj na druge mikroorganizme, čime uklanja većinu konkurenata za supstrat koji koristi. Također, vrlo važne karakteristike kvasca *S. cerevisiae* su otpornost na visoke koncentracije šećera te proizvodnja niza aromatskih, hlapljivih spojeva (Parapouli i sur., 2020).

## 2.2. NEKONVENCIONALNI (NE-*Saccharomyces*) KVASCI

Kako je već spomenuto, kvasac *S. cerevisiae* zbog svojih karakteristika koristi se u proizvodnji fermentiranih prehrambenih proizvoda, za proizvodnju biogoriva te u proizvodnji heterolognih proteina, humanog inzulina i cjepiva protiv hepatitisa i humanog papiloma virusa. Međutim, novi tehnološki postupci razlikuju se od onih u tradicionalnim fermentativnim procesima i predstavljaju posebne izazove. To podrazumijeva procese u različitim uvjetima, sa širokim rasponom ugljikovih i energetske izvora te procese u kojima je prisutna značajna količina tvari toksičnih za stanicu koje mogu imati inhibični učinak na radne mikroorganizme (Kręgiel i sur., 2017).

Nekonvencionalni kvasci predstavljaju veliku skupinu mikroorganizama koja je izvor velike bioraznolikosti kvasaca. Mnogi od njih posjeduju relevantne karakteristike za industrijsku primjenu, što podrazumijeva sposobnost korištenja kompleksnih supstrata kao hranjivih tvari te ekstremnu otpornost na stresne uvjete i inhibitore fermentacije. Razvili su specifične mehanizme koji im omogućuju preživljavanje u ekstremnim uvjetima (Radecka i sur., 2015). Osim glukoze, nekonvencionalni kvasci mogu kao supstrate koristiti različite izvore ugljika prisutne u obnovljivim sirovinama i to: monosaharide (ksilozu, galaktozu, fruktozu, arabinozu), disaharide (laktozu, celobiozu, ksilobiozu) i polisaharide (ksilan i celulozu). Neki od njih su visoko tolerantni na stresne uvjete poput niske pH-vrijednosti, povišene temperature, visokog osmotskog tlaka te prisutnosti inhibičnih spojeva. Također, određeni nekonvencionalni kvasci „superiorniji“ su u odnosu na kvasac *S. cerevisiae* kada se radi o akumulaciji metabolita te sintezi i sekreciji rekombinantnih proteina (Geijer i sur., 2022). Primjerice, kvasci *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Scheffersomyces stipitis*, *Hansenula polymorpha*, *Ogataea thermomethanolica*, *Candida albicans* i *Candida glabrata* imaju prirodnu sposobnost proizvodnje raznolikijeg i šireg spektra komercijalnih metabolita u usporedbi s kvascem *S. cerevisiae* (Patra i sur., 2021).

### 2.2.1. *Yarrowia lipolytica*

Kvasac *Y. lipolytica* obično se nalazi u okruženjima koja sadrže hidrofobne supstrate kao što su otpad koji sadrži ulje, prehrambeni proizvodi (mesni i mliječni proizvodi) te mjesta zagađena uljem (Zinjarde i sur., 2014). Također, može se izolirati iz usta, pluća i crijevnog trakta. Otporan je na niske pH-vrijednosti, želučani sok i želučane soli. Kao dimorfni kvasac, *Y. lipolytica* stvara multipolarne pupajuće stanice i micelije sa septiranim (pregrađenim) hifama. Osim toga, stvara i

pseudohife, a to su pupajuće stanice koje ostaju vezane jedna za drugu. U nekoliko određenih staništa i u prisutnosti glukoze, glicerola, eritritola, laktata i biljnih ulja, stanice mogu stvarati biofilmove (Sutherland i sur., 2014).

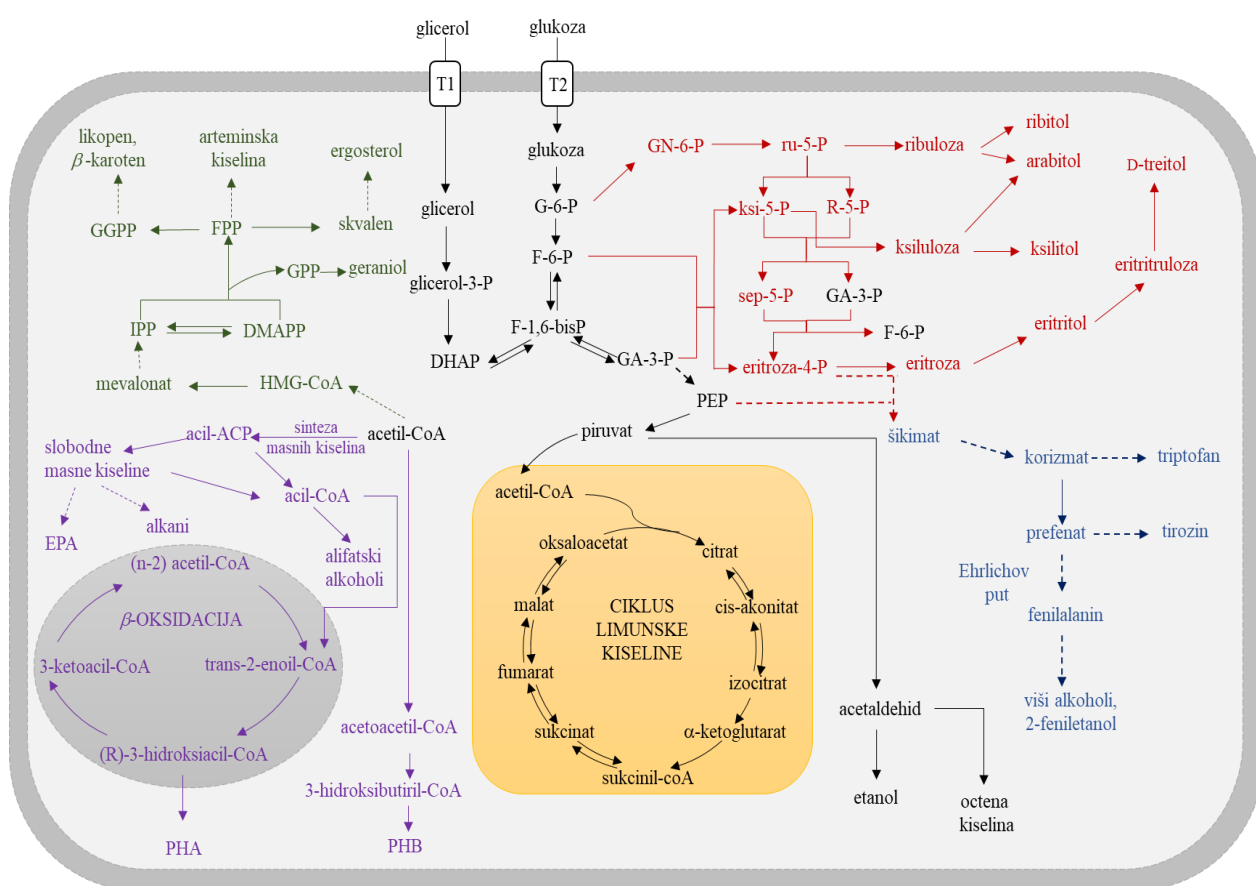
S obzirom da je kvasac *Y. lipolytica* obligatni aerob, koncentracija kisika predstavlja limitirajući faktor rasta. Većina sojeva je psihrotrofna i rastu na temperaturi od 5 °C, ali mogu dobro rasti i na sobnim temperaturama, dok neki sojevi mogu rasti čak i na temperaturi od 37 °C. Kvasac *Y. lipolytica* može rasti pri širokom rasponu pH vrijednosti, točnije pri pH vrijednosti 2,0-8,0, ali uglavnom pri pH 3,5. Neki sojevi imaju sposobnost rasta pri niskim pH vrijednostima, manjima od 2,0, ili pri visokim pH vrijednostima do 9,7. Kako se nalazi u slanoj hrani i staništima, tolerantnost na visoke koncentracije soli omogućuje joj rast pri koncentraciji od 7,5 % NaCl-a, a neki sojevi mogu rasti čak i pri koncentraciji od 15 %. Posjeduje i svojstvo adsorpcije metala kao što su krom, željezo, nikal, bakar, cink i kadmij (Sutherland i sur., 2014). Uz navedena svojstva koja pogoduju primjeni kvasca *Y. lipolytica* u industriji, još je nekoliko značajnih karakteristika: (i) mogućnost korištenja različitih izvora ugljika; (ii) postizanje visoke koncentracije stanica tijekom uzgoja iz čega proizlazi nekoliko prednosti poput olakšanog „downstream“ procesa, smanjenja otpadnih voda, smanjenja proizvodnih troškova itd. Primjera radi, rastom na glukozu postiže koncentraciju veću od 100,00 g L<sup>-1</sup>, na kombiniranom supstratu ksiloze i glicerola 120,70 g L<sup>-1</sup> i 60,00 g L<sup>-1</sup> na sirovom glicerolu; (iii) kod sekrecije proteina posjeduje važna svojstva poput: visokog stupnja sekrecije, dobrog prinosa produkta, ponovljivosti procesa i niskog stupnja glikolizacije (Park i Ledesma-Amaro, 2023).

#### 2.2.1.1. Metabolizam i proizvodi kvasca *Yarrowia lipolytica*

Kvasac *Y. lipolytica* može koristiti širok spektar sirovina kao izvora ugljika, bilo hidrofobnih ili hidrofilnih. Pod hidrofobnim izvorima ugljika podrazumijevaju se masne kiseline, trigliceridi i alkani (Madzak, 2021). Supstrati na kojima raste kvasac *Y. lipolytica* su primjerice metil ester, masne kiseline, biljna ulja (palmino, sojino, maslinovo, suncokretovo, itd.), životinjska mast i fosilna ulja. Rast na takvim supstratima omogućen je proizvodnjom izvanstaničnih lipaza koje omogućuju učinkovito korištenje izvanstaničnih lipida kao supstrata. Također, svojstvo koje omogućuje rast na hidrofobnim supstratima jest mogućnost akumulacije masnih kiselina u obliku triacilglicerola ili sterolnih estera u lipidnim tijelima (Soong i sur., 2019).

Pod hidrofilne supstrate koje kvasac *Y. lipolytica* može koristiti spadaju heksoze (glukoza, manoza, galaktoza, fruktoza), pentoze (D-ksiloza, L-arabinoza), acetat, lignoceluloza, etanol i glicerol. Među hidrofilnim izvorima ugljika najproučavaniji u laboratorijskom mjerilu su glukoza

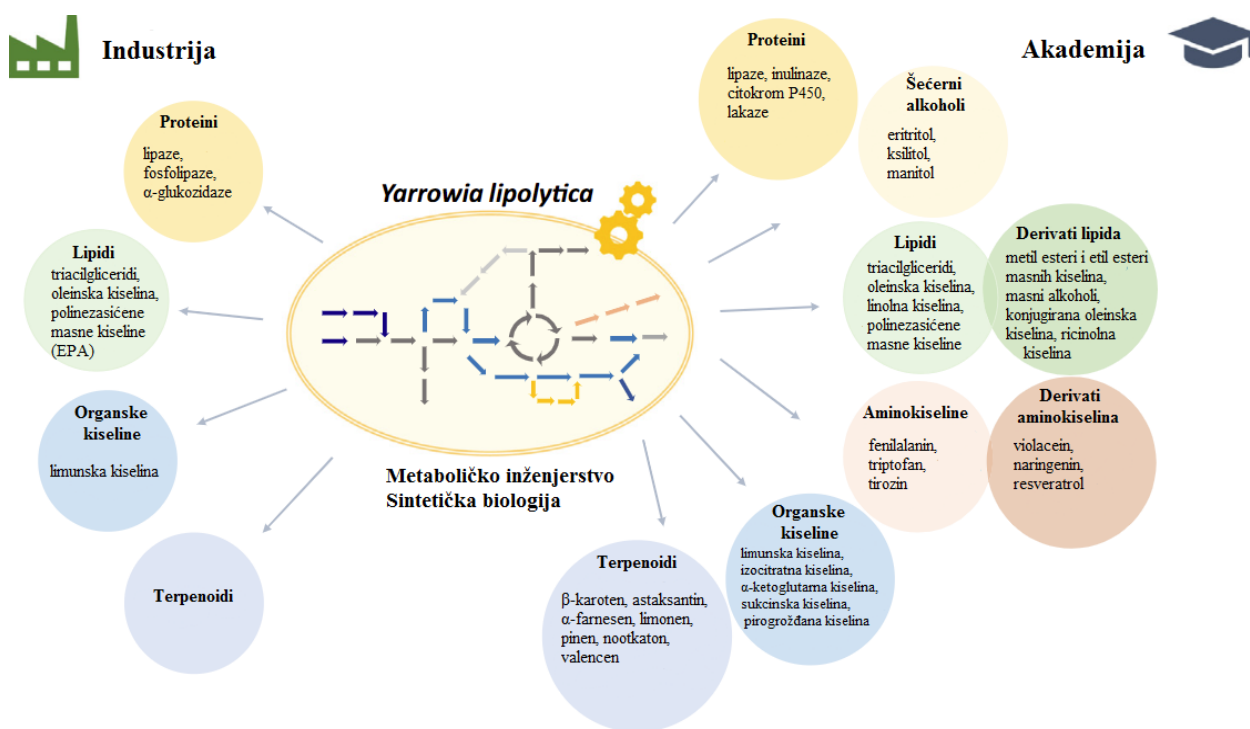
i glicerol (Soong i sur., 2019). Prema brojnim izvješćima, preferiraniji izvor ugljika je glicerol zbog velike brzine rasta mikroorganizma. Štoviše, tolerantnost kvasca *Y. lipolytica* na inhibitorne spojeve prisutne u sirovom glicerolu čini ju izrazito zanimljivim mikroorganizmom za konverziju nerafiniranog glicerola (nusproizvoda proizvodnje biodizela) u vrijedne proizvode (Spagnuolo i sur., 2018). Metabolizam glukoze i glicerola do krajnjih produkata prikazan je na slici 1. Pretpostavljeni transportni proteini kvasca *Y. lipolytica* za glicerol su YALI0B17138p, YALI0C04730p, YALI0C16522p, YALI0E05665p i YALI0F00462 te je pretpostavljeno da sadrži dva transportna kanala za glicerol (Erian i sur., 2022). Pretpostavljeni transportni proteini za glukozu su YALI0C06424, YALI0F19184, YALI0E23287 i YALI0B01342 (Spagnuolo i sur., 2018).



**Slika 1.** Metabolički putevi razgradnje glukoze i glicerola u kvascu *Y. lipolytica* (prema Bilal i sur., 2020)

Skraćenice: G-6-P: glukoza-6-fosfat; F-6-P: fruktoza-6-fosfat; F-1,6-bisP: fruktoza-1,6-bisfosfat; DHAP: dihidroksiaceton fosfat; GA-3-P: gliceraldehid-3-fosfat; glicerol-3-P: glicerol-3-fosfat; GN-6-P: glukonolakton-6-fosfat; ru-5-P: ribuloza-5-fosfat; ksi-5-P: ksiluloza-5-fosfat; R-5-P: riboza-5-fosfat; sep-7-P: sedoheptuloza-7-fosfat; eritroza-4-P: eritroza-4-fosfat; PEP: fosfoenolpiruvat; EPA: eikozapentaenska kiselina; PHA: polihidroksi-alkanoati; PHB: polihidroksibutirat; HMG-CoA: 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A; IPP: izopentenil pirofosfat; DMAPP: dimetilalil pirofosfat; GPP: geranil difosfat; FPP: farnezil difosfat; GGPP: geranilgeranil difosfat; T1: transportni sustav za glicerol; T2: transportni sustav za glukozu

Kvasac *Y. lipolytica* dobar je izvor raznih biomolekula kao što su enzimi, jednostanični proteini i mikrobnj lipidi (Rebello i sur., 2018). Koristi se za razne primjene u procesima povezanim s hranom. Tu spadaju primjerice: proizvodnja mesnih i mliječnih proizvoda, proizvodnja aroma, sinteza organskih kiselina, proizvodnja šećernih alkohola kao zamjene za saharozu, proizvodnja emulgatora i površinski aktivnih tvari. Koristi se i u proizvodnji lipida i iz lipida izvedenih spojeva kao što su biodizel, jestiva ulja ili dikarboksilne kiseline koje služe kao građevni blokovi za polimere. Također, kao povoljan domaćin za proizvodnju proteina upotrebljen je za proizvodnju više od 130 proteina, što s akademskom, što s komercijalnom primjenom (Ledesma-Amaro i Nicaud, 2016). Slika 2 prikazuje proizvode kategorizirane prema skupini spojeva kojoj pripadaju, odnosno kategorizirane na lipide, proteine, organske kiseline, aminokiseline i njihove derivate, lipide i njihove derivate, šećerne alkohole i terpenoide. Proizvodi su također kategorizirani prema tome proizvode li se u industrijskom mjerilu ili samo u znanstvene svrhe.



**Slika 2.** Proizvodi kvasca *Y. lipolytica* u industriji i znanosti (prema Park i Ledesma-Amaro, 2023)

U proizvodnji mesnih i mliječnih proizvoda kvasac *Y. lipolytica* koristi se u svrhu proizvodnje određenih spojeva koji doprinose stvaranju konačnog okusa proizvoda. Proizvodi spojeve poput slobodnih masnih kiselina (palmitinska, oleinska, stearinska, maslačna, itd.),

kiselina, alkohola (npr. 2-metilbutan-1-ol), aldehida, ketona (3-hidroksibutan-2-on), terpena ( $\Delta$ -3-karen), alkana (pentan, oktan). Koristi se za proizvodnju prehrambenog aditiva  $\gamma$ -dekalaktona koji ima okus breskve (Zinjarde, 2014). Od organskih kiselina, glavne koje proizvodi su: limunska, izocitratna,  $\alpha$ -ketoglutarina, sukcininska, octena i itakonska kiselina (Fickers i sur., 2020).

Sve prihvaćeniji radni mikroorganizam u proizvodnji biodizela postaje upravo kvasac *Y. lipolytica* i to zbog dvaju svojstava; prvo je sposobnost proizvodnje različitih lipaza koje se mogu koristiti kao biokatalizatori u biokonverziji biljnih ili mikrobnih ulja u biodizel, a drugo je činjenica da kvasac *Y. lipolytica* može akumulirati veliku količinu lipida koji se potom mogu koristiti kao početni materijal u proizvodnji biodizela (Darvishi i sur., 2017).

### 2.2.1.2. Šećerni alkoholi – polioli

Kvasac *Y. lipolytica* koristi se za proizvodnju šećernih alkohola (poliola), uglavnom eritritola i manitola (Fickers i sur., 2020). Šećerni alkoholi su neciklički hidrogenirani ugljikohidrati koji nastaju redukcijom aldehida i ketona do hidroksilne skupine u šećerima te predstavljaju zamjenu za saharozu. Specifični su po tome što imaju sladak okus te nekancerogena i manje kalorična svojstva od saharoze. Također, neki od njih mogu se kao građevne jedinice kemijskom katalizom prevesti u kemikalije od komercijalne važnosti (Park i sur., 2016).

Zbog svojih pozitivnih svojstava i prednosti nad ostalim šećernim alkoholima, eritritol se proizvodi desetljećima. U osmofilnim kvascima, među koje spada i kvasac *Y. lipolytica*, ima ulogu osmoprotektanta, odnosno kvasci ga proizvode kao odgovor na povišeni osmotski tlak. Sinteza eritritola odvija se putem pentozna fosfata, a u zadnjem koraku eritroza reduktaza reducira eritrozu do eritritola uz oksidaciju NAD(P)H (Mirończuk i sur., 2017). Osim upotrebe kao niskokaloričnog zaslađivača, eritritol može biti kemijski prekursor za sintezu 1,4-anhidroeritritola, butadiena, 1,4-butandiola, 2,5-dihidrofurana i tetrahidrofurana (Jagtap i sur., 2021).

Manitol je šećerni alkohol sa šest ugljikovih atoma i ima važnu ulogu u otpornosti mikroorganizama na stresne uvjete. Primjenjuje se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te medicini. Široko je rasprostranjen u prirodi, a nalazi se u različitim biljkama, algama, u micelijima raznih gljivica i jedan je od glavnih ugljikohidrata u gljivama (Tomaszewska i sur., 2012).

Ksilitol se koristi kao zaslađivač, a s obzirom na njegova antiinflamatorna svojstva može se koristiti za uspješno liječenje kroničnih upalnih bolesti. Nastavno tome, koristi se za liječenje bolesti srednjeg uha, ali i za liječenje bolesti dišnog sustava poput pneumonije. Također, svoju primjenu je pronašao i u žvakaćim gumama „bez šećera“ i ne predstavlja opasnost za ljude, dok



može biti izrazito toksičan za pse. Proizvodnja ksilitola kemijskom sintezom je skup i težak proces, stoga proizvodnja pomoću mikrobnih stanica predstavlja jeftiniju i profitabilniju opciju proizvodnje. Jedan od mikroorganizama koji posjeduju sve enzime za proizvodnju ksilitola je kvasac *Y. lipolytica* (Abbasi i sur., 2021).

### 2.3. SIROVINE U BIOTEHNOLOGIJI

U industrijskoj biotehnologiji koriste se sirovine uzgojene na poljoprivrednim površinama, primjerice šećerna repa i šećerna trska (sadrže saharozu), biljke bogate škrobom (sadrže škrob, inulin, celulozu i druge ugljikohidrate), biljke uljarice (sadrže ulje, mast, glicerol, celulozu) i drvo (sadrži lignocelulozu i celulozu) (Yu i sur., 2019).

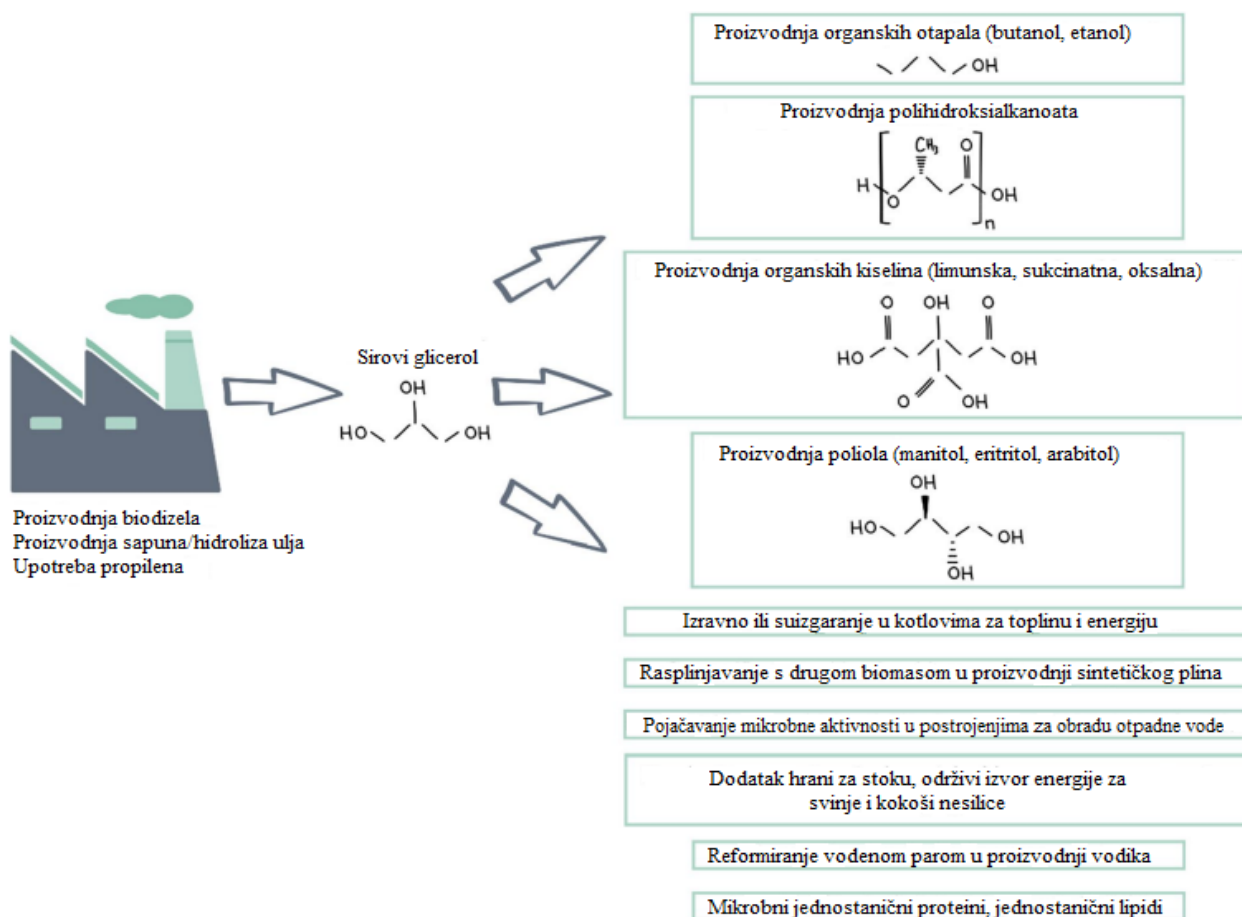
Glukoza i saharoza predstavljaju klasične i najčešće sirovine u industrijskim procesima, no cijena ova dva supstrata može postići čak i do 60 – 80 % cijene ukupne proizvodnje. Stoga se sve više pristupa alternativnim jeftinim izvorima ugljika kako bi se postigla održivost proizvodnje i ekonomije (Geijer i sur., 2022).

Sve češće upotrebljavana sirovina u biotehnologiji jest lignocelulozna biomasa. Lignocelulozne sirovine svrstane su u tri skupine: netaknuta biomasa, energetske usjevi i otpadna biomasa. Netaknuta biomasa podrazumijeva sve prirodno rastuće kopnene biljke, uključujući zeljaste biljke (jednogodišnje, dvogodišnje i višegodišnje biljke) i drvenaste biljke (drveće, grmlje i patuljasto grmlje), te vodene biljke kao što su vodeni zumbul, vodena paprat, vodena salata i vodena trava. Energetske usjevi podrazumijevaju višegodišnje trave i druge energetske usjeve koji daju visok prinos lignocelulozne biomase, a to su primjerice divlje proso, obični trst, slonova trava i kineski šaš. Treća skupina, otpadna biomasa, nusproizvod je niske vrijednosti različitih industrijskih sektora i to: poljoprivrede (slama žitarica, ljuške žitarica i ostatci nakon žetve), šumarstva (grane s uginulih stabala, ostatci rezidbe i stanjivanja) i proizvodnje drva i papira (kora, piljevina i drvna sječka). Osim navedenog, u otpadnu biomasu spada i organski dio krutog komunalnog otpada (Broda i sur., 2022). Općenito, lignocelulozna biomasa sastoji se od tri frakcije: celuloze, hemiceluloze i lignina. Najzastupljenija je celuloza koja čini 38 – 50 % biomase. Hemiceluloza čini 23 – 32 % biomase, a lignin 15 – 30 %. Udio pojedine frakcije u biomasi ovisi o vrsti i podrijetlu lignocelulozne sirovine. Fermentabilni šećeri dobivaju se iz celuloze i hemiceluloze, a razbijanjem lignina oslobađa se velik broj polifenola (Arora i sur., 2019).

Kao jedna od obećavajućih sirovina današnjice koja poprima sve više interesa jest biomasa mikroalgi. Njihova biomasa uglavnom se sastoji od ugljikohidrata i lipida zbog čega se nameće kao sirovina u proizvodnji biogoriva i biomaterijala (biovodik, bioetanol, biometan, biodizel, biougljen, farmaceutici). Štoviše, zbog malog udjela hemiceluloze i lignina u biomasi, nije potrebno pristupati predtretmanima što povećava uspješnost hidrolize i fermentacija (Kumar i sur., 2020).

### 2.3.1. Glicerol

Osim navedenih, kao sirovina u biotehnologiji sve više se proučava i upotrebljava glicerol (1,2,3-propantriol), poznat i kao glicerol. Glicerol je glavni nusproizvod dobiven tijekom reakcije transesterifikacije u proizvodnji biodizela. Omjer sirovog glicerola prema biodizelu je 1:10, odnosno u proizvodnji 10 kilograma biodizela nastaje 1 kilogram glicerola kao nusproizvoda. Sirovi glicerol taloži se u donjem dijelu proizvodnog spremnika, zbog čega se lako odvaja od biodizela (Vivek i sur., 2017). Sirovi glicerol je heterogeni supstrat bogat na spojevima ugljika, sapuna, metala, soli, alkohola i ulja te na čvrstim organskim spojevima. Također sadrži i tragove neiskorištenih katalizatora korištenih u procesu esterifikacije. Proizvodnja glicerola iz godine u godinu raste, što se najbolje vidi iz činjenice da je godišnja proizvodnja u 2006. godini iznosila 7,8 milijuna litara, a 2018. godine čak 36 milijuna litara. Trenutno se rafinirani glicerol koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Kod proizvodnje rafiniranog glicerola, u posljednjoj fazi on se pročišćava ispiranjem vrućom vodom pri čemu se uklanjaju ostatci katalizatora i ostalih nečistoća. Taj korak je dug, zagađujući i skup, stoga je sirovi glicerol od većeg interesa. Odnosno, njegova primjena u biotehnološkim procesima kao što je fermentacija predstavlja obećavajući odgovor na ekološka pitanja o sirovom glicerolu kao otpadu i njegovom odlaganju (Guerfali i sur., 2020). Jedno od mogućih rješenja jest primjena kao izvora ugljika u hranjivom mediju za rast oleaginoznih mikroorganizama u svrhu dobivanja različitih proizvoda koji su prikazani na slici 3, a osim toga prikazane su neke druge primjene sirovog glicerola. Jedan od oleaginoznih mikroorganizama koji mogu koristiti glicerol je i kvasac *Y. lipolytica*. U tablici 1 prikazani su neki proizvodi koji se mogu proizvesti koristeći čisti i sirovi glicerol.



Slika 3. Prikaz mogućih primjena sirovog glicerola (prema Rakicka-Pustułka i sur., 2021)

Tablica 1. Prikaz različitih dobivenih metabolita sojeva *Y. lipolytica* koristeći glicerol kao izvor ugljika (Rywińska i sur., 2013)

Supstrat	Produkt
Čisti glicerol	$\alpha$ -ketoglutarna kiselina
	Limunska kiselina i invertaza
	Pirogroždana kiselina
	Sukcinatna kiselina
	$\alpha$ -amilaza
	Lipaza
	Površinski aktivne tvari
Sirovi glicerol	Limunska kiselina
	Eritritol
	Manitol
	Octena kiselina
	Polinezasićene masne kiseline
	Lipidi
	Lipidi nalik kokosovom maslacu
	Proizvodnja biomase

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi korišteni u ovom radu prikazani su u tablici 2. U tablici nalaze se i podaci o staništu iz kojeg su mikroorganizmi izolirani te iz koje zbirke mikroorganizama su nabavljeni.

**Tablica 2.** Popis mikroorganizama korištenih u ovom radu

<b>Mikroorganizam</b>	<b>Stanište iz kojeg je izoliran</b>	<b>Zbirka mikroorganizama</b>	<b>Referenca</b>
<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175	Spremnik goriva zrakoplova	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Njemačka	Egermeier i sur., 2017
<i>Candida lyxosophila</i> JCM 7532	Površinsko tlo, Južnoafrička Republika	Japan Collection of Microorganisms (JCM), Japan	JCM (2023)
<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	Ličinka insekta, Francuska	Japan Collection of Microorganisms (JCM), Japan	JCM (2023)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3418	Hrast, kora, list, Slovenija	Slovenian Collection of Industrial Microorganisms (ZIM), Slovenija	ZIM (2023)

### 3.1.2. Kemikalije

U tablici 3. prikazane su kemikalije korištene u izradi ovog rada te njihova čistoća i proizvođač. Kemikalije su korištene za pripravu hranjivih podloga i različitih otopina korištenih tijekom pripreme uzoraka za analizu.

**Tablica 3.** Popis kemikalija

<b>Kemikalija</b>	<b>Stupanj čistoće</b>	<b>Proizvođač</b>
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
glicerol	≥ 99,5 %	Macron Fine Chemicals, SAD
agar	tehnički	Biolife, Italija
cinkov sulfat	p.a.	Merck KgaA, Njemačka
sumporna kiselina	za UPLC, 96 %	Merck KgaA, Njemačka
amonijev klorid	≥99,5 %	CARLO ERBA Reagents, Italija
kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
sumporna kiselina	96%, p.a.	Merck KgaA, Njemačka

### 3.1.3. Hranjive podloge

#### 3.1.3.1. Hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama

Za održavanje čistih kultura radnih mikroorganizama (*Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418) korištena je čvrsta podloga sljedećeg sastava: 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 20 g L<sup>-1</sup> peptona, 20 g L<sup>-1</sup> glukoze i 20 g L<sup>-1</sup> agara.

#### 3.1.3.2. Hranjive podloge za inokulum za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Za inokulum su korištene dvije vrste podloga. Prva je klasična tekuća YPD podloga sastava: kvašćev ekstrakt – 10 g L<sup>-1</sup>, pepton – 20 g L<sup>-1</sup>, glukoza – 20 g L<sup>-1</sup>. Druga vrsta je tekuća YPG podloga sastava: kvašćev ekstrakt – 10 g L<sup>-1</sup>, pepton – 20 g L<sup>-1</sup>, glicerol – 20 g L<sup>-1</sup>.

### 3.1.3.3. Hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

Za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama korištene su 4 različite podloge. Korištene su YPD podloga i YPG podloga istog sastava kao i podloge za inokulum te YPD i YPG podloga uz dodatak  $25 \text{ g L}^{-1}$  NaCl-a.

### 3.1.3.4. Hranjive podloge za inokulum za uzgoje u bioreктору

Za pripremu inokuluma za uzgoje provedene u bioreктору s miješalom korištene su sljedeće podloge:

(1) kvašćev ekstrakt –  $1 \text{ g L}^{-1}$ , glicerol –  $20 \text{ g L}^{-1}$ , amonijev klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) –  $5 \text{ g L}^{-1}$ , kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) –  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) –  $0,5 \text{ g L}^{-1}$

(2) YPG podloga sastava opisanog u poglavlju 3.1.3.2.

### 3.1.3.5. Hranjive podloge za uzgoj u bioreктору

Za uzgoje provedene u bioreaktorima korištene su podloge sljedećeg sastava:

(1) kvašćev ekstrakt –  $1 \text{ g L}^{-1}$ , glicerol –  $20 \text{ g L}^{-1}$ , natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) –  $25 \text{ g L}^{-1}$ , amonijev klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) –  $5 \text{ g L}^{-1}$ , kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) –  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) –  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ .

(2) YPG podloga uz dodatak NaCl-a opisana u poglavlju 3.1.3.3.

## 3.1.4. Aparatura i pribor

### 3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sadrži sljedeće dijelove:

- injektor (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnicu
- crpku (G7104A 1290 Flexible Pump)
- analitičku kolonu (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija  $150 \times 7,8 \text{ mm}$  s pripadajućim pretkolonama
- detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID)

- računalni program za kromatografiju (OpenLAB CDS).

Za mobilnu fazu korištena je otopina sumporne kiseline (0,0025 M), a protok mobilne faze bio je 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura kolone iznosi 60 °C a temperatura RID-a 40 °C. Volumen uzorka za analizu bio je 10 µL.

#### 3.1.4.2. Spektrofotometar

Optička gustoća uzoraka tijekom uzgoja određivana je pomoću spektrofotometra „Cary 100 UV-VIS“ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Mjerenje je izvršeno pri valnoj duljini od 600 nm u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

#### 3.1.4.3. Centrifuge

Za izdvajanje biomase iz suspenzije nakon uzgoja u tikvicama korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD), a centrifugiranje je izvršeno pri 8000 o min<sup>-1</sup> i temperaturi od 4 °C u trajanju od 7 minuta. Prilikom pripreve uzoraka za analizu na UPLC korištena je centrifuga CF-10 (Witeg, Wertheim, Njemačka).

#### 3.1.4.4. Bioreaktori s miješalima

Uzgoj kvasca *Y. lipolytica* proveden je paralelno u dva bioreaktora u dvije različite podloge (poglavlje 3.1.3.5.). Uzgoj u YEG podlozi s dodatkom mineralnih hranjivih tvari proveden je u bioreaktoru od nehrđajućeg čelika Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) s ugrađenim miješalom. Ukupni volumen bioreaktora je 30 L. Ugrađeno miješalo ima tri turbine od kojih svaka ima 6 lopatica, a pokreće ga elektromotor snage 0,9 kW. Bioreaktor posjeduje i kontrolnu jedinicu kojom se reguliraju i prate parametri bioprocasa, a tu spadaju temperatura i pH vrijednost podloge, brzina protoka zraka, parcijalni tlak kisika u podlozi, brzina okretaja miješala te razina podloge i pjene u bioreaktoru. Također, na bioreaktoru se nalaze dva izlaza za podlogu, jedan služi za izuzimanje uzoraka, a drugi za pražnjenje bioreaktora.

Uzgoj u YPG podlozi opisanoj u 3.1.3.5. proveden je u bioreaktoru Biostat Cplus istog proizvođača sličnih karakteristika. Bioreaktor je izrađen od nehrđajućeg čelika, ukupnog volumena 42 L. Ugrađeno miješalo sadrži tri podesive turbine od kojih svaka ima po 6 lopatica, a pokreće ga elektromotor snage 2,09 kW. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom kojom se reguliraju i prate temperatura, pH vrijednost podloge, brzina protoka zraka, parcijalni tlak kisika u podlozi, izlazni plinovi (O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>), brzina okretaja miješala te razina podloge i pjene u bioreaktoru, a

posjeduje i turbidimetar. Na poklopcu bioreaktora nalaze se ulazni i izlazni membranski filteri za zrak te ulazi za inokulaciju i dodavanje različitih otopina. Također, na bioreaktoru se nalaze dva izlaza za podlogu, jedan služi za izuzimanje uzoraka, a drugi za pražnjenje bioreaktora.

#### *3.1.4.5. Ostala aparatura i pribor*

- sušionik (Instrumentaria ST-50, Hrvatska)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Satorius Group, Njemačka)
- zamrzivač (Gorenje, Slovenija)
- tehnička vaga (Tehnica ET – 1111, Slovenija)
- analitička vaga (Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA, Japan)
- stakleno i plastično laboratorijsko posuđe
- jednokratni plastični pribor

## **3.2. METODE**

### 3.2.1. Priprema hranjivih podloga

#### *3.2.1.1. Priprema hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama*

Za pripremu hranjive podloge za održavanje kultura radnih mikroorganizama u 500 mL demineralizirane vode otopljeno je 5 g kvašćevog ekstrakta, 10 g peptona, 10 g glukoze i 10 g agara, tako da je dobiven potreban sastav čvrste hranjive podloge opisan ranije u poglavlju 3.1.3.1.. Hranjiva podloga je potom sterilizirana u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta. Nakon sterilizacije podloga je izlivena oprezno u aseptičnim uvjetima u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi se ohladila i postigla željenu čvrstu teksturu.

#### *3.2.1.2. Priprema hranjive podloge za inokulum za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama*

Hranjive podloge za inokulum korišten za uzgoj mikroorganizama na glukozi kao izvoru ugljika su YPD podloge pripremljene tako da je u 200 mL demineralizirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici otopljeno 2 g kvašćevog ekstrakta, 4 g peptona i 4 g glukoze. Takvom odvagom dobivene su željene masene koncentracije navedene ranije u poglavlju 3.1.3.2.. Podloga je nakon odvage i otapanja sastojaka sterilizirana u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta.



Hranjive podloge za inokulum korišten za uzgoj mikroorganizama na glicerolu kao izvoru ugljika su YPG podloge pripremljene na isti način kao i one za ispitivanje na glukozu, ali je umjesto glukoze otopljeno 4 g glicerola.

#### *3.2.1.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama*

Hranjive podloge korištene za uzgoj mikroorganizama na glukozu su pripremljene tako da je u 100 mL demineralizirane vode otopljen 1 g kvašćevog ekstrakta, 2 g peptona i 2 g glukoze. Podloge su potom sterilizirane u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta. Pripremljene podloge jednakih su masenih koncentracija i sastava kao YPD podloga za inokulum. Također su pripremljene YPG podloge istog sastava kao YPD podloge, ali je umjesto glukoze otopljeno 2 g glicerola.

U svrhu ispitivanja utjecaja osmotskog stresa na proizvodnju metabolita, napravljene su YPD i YPG podloge s dodanih 2,5 g NaCl-a, odnosno masene koncentracije NaCl-a od 25 g L<sup>-1</sup>.

#### *3.2.1.4. Priprema hranjive podloge za inokulum za uzgoj bioreaktoru*

Podloga za uzgoj u bioreaktoru sastava opisanog u poglavlju 3.1.3.4. pripravljena je tako da je u 1 L demineralizirane vode otopljeno 1 g kvašćevog ekstrakta, 20 g glicerola, 5 g amonijevog klorida (NH<sub>4</sub>Cl), 0,25 g kalijevog dihidrogenfosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O). Po 250 mL podloge razdijeljeno je u četiri Erlenmeyerove tikvice volumena 500 mL, nakon čega su tikvice s podlogama sterilizirane u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta.

YPG hranjiva podloga pripremljena je tako da je u 1 L demineralizirane vode otopljeno 10 g kvašćevog ekstrakta, 20 g peptona i 20 g glicerola. Dobivena je podloga sastava opisanog u poglavlju 3.1.3.4. Po 250 mL podloge razdijeljeno je u četiri Erlenmeyerove tikvice volumena 500 mL, nakon čega su tikvice s podlogama sterilizirane u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta.

#### *3.2.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj bioreaktoru*

Podloge su pripremljene na sljedeći način:

(1) Hranjiva podloga opisana u poglavlju 3.1.3.5. pripremljena je tako da je u 7 L demineralizirane vode otopljeno 7 g kvašćeva ekstrakta, 140 g glicerola, 35 g amonijeva klorida, 1,75 g kalijeva dihidrogenfosfata, 175 g natrijeva klorida i 3,5 g magnezijeva sulfata heptahidrata.

(2) YPG podloga s dodatkom NaCl-a pripremljena je na način da je u 7 L demineralizirane vode otopljeno 70 g kvašćevog ekstrakta, 140 g peptona, 140 g glicerola i 175 g natrijeva klorida tako da se dobije željeni sastav podloge kako je ranije opisano u poglavlju 3.1.3.5.

### 3.2.2. Uzgoj kvasaca

#### 3.2.2.1. *Aerobni uzgoj kvasaca u podlozi s glicerolom*

Inokulum za uzgoj svakog od kvasaca navedenih u poglavlju 3.1.1. pripravljen je tako da je s čvrste podloge u Petrijevim zdjelicama u epruvete s 10 mL tekuće YPD podloge sterilno prenesena biomasa čiste kulture kvasaca. Inokulum u epruvetama je ostavljen preko noći, otprilike 24 sata u termostatu na 28 °C. Nakon uzgoja inokuluma, isti je bio prenesen u aseptičnim uvjetima u Erlenmeyerovu tikvicu s YPG podlogom ranije spomenutog sastava (poglavlje 3.1.3.3.). Uzgoj kvasaca proveden je u aerobnim uvjetima pri temperaturi od 28 °C na tresilici pri broju okretaja od 280 o min<sup>-1</sup>. Koncentracija biomase te koncentracije supstrata i produkata metabolizma praćena je tijekom uzgoja metodama opisanim u kasnijem poglavlju (3.3. Analitičke metode).

#### 3.2.2.2. *Uzgoj kvasaca u podlozi s glukozom kao glavnim izvorom ugljika bez i s dodatkom NaCl-a te u podlozi s glicerolom kao glavnim izvorom ugljika bez i s dodatkom NaCl-a*

U preliminarnom uzgoju korištene su 4 različite podloge sastava kako je opisano u poglavlju 3.1.3.3. Inokulum za uzgoj kvasaca u YPD podlozi s i bez dodatka NaCl-a uzgojen je u YPD podlozi u Erlenmeyerovoj tikvici, a inokulum za uzgoj kvasaca u YPG podlozi s i bez dodatka NaCl-a bio je uzgojen u YPG podlozi u Erlenmeyerovoj tikvici. Inokulum je ostavljen preko noći, 24 sata pri temperaturi od 28 °C na tresilici pri broju okretaja od 125 o min<sup>-1</sup>. Nakon uzgojenog inokuluma, po 10 mL istog je preneseno u pripadajuću Erlenmeyerovu tikvicu. Koncentracija biomase te koncentracije supstrata i produkata metabolizma praćena je tijekom uzgoja metodama opisanim u kasnijem poglavlju (3.3. Analitičke metode).

#### 3.2.2.3. *Uzgoj kvasaca u bioreaktoru*

Uzgoj kvasaca u podlozi proveden je u aerobnim uvjetima uz stalan protok zraka od 2 L min<sup>-1</sup>, pH vrijednosti podloge od 3 jedinice, temperaturi od 30 °C te broju okretaja miješala od 400

o min<sup>-1</sup>. Hranjiva podloga naciepljena je inokulumom volumena 500 mL. Od trenutka naciepljivanja uzgoj je trajao 46 h prilikom čega su iz bioreaktora uzorci izuzimani u određenim vremenskim intervalima te analizirani analitičkim metodama opisanim u sljedećem poglavlju (3.3. Analitičke metode).

Uzgoj kvasaca u YPG podlozi proveden je također u aerobnim uvjetima uz stalan protok zraka od 2 L min<sup>-1</sup>, pH vrijednosti podloge 3, temperaturi od 30 °C te broju okretaja miješala od 400 o min<sup>-1</sup>. Hranjiva podloga naciepljena je inokulumom volumena 500 mL. Uzgoj je od trenutka naciepljivanja podloge trajao 45 h, a uzorci su također iz bioreaktora izuzimani u određenim vremenskim intervalima te, kasnije opisanim analitičkim metodama (poglavlje 3.3.), analizirani.

### 3.3. ANALITIČKE METODE

#### 3.3.1. Mjerenje optičke gustoće uzoraka

Uzorci su izuzeti sterilno u plastične kivete od 15 mL, na vorteksu su homogenizirane te je spektrofotometrom pri valnoj duljini od 600 nm izmjerena optička gustoća. Mjerenje je rađeno za originalni uzorak i prvo decimalno razrjeđenje uzorka koje je pripravljeno tako da je u 4,5 mL demineralizirane vode dodano 0,5 mL originalnog uzorka.

#### 3.3.2. Mjerenje koncentracije suhe tvari biomase

Koncentracija suhe tvari biomase mjerila se tako da je po 5 mL uzorka otpipetirano u unaprijed izvagane i označene kivete, a potom je centrifugom centrifugirano pri 8000 o min<sup>-1</sup> i temperaturi od 4 °C u trajanju od 7 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je odvojen u označene kivete i zamrznut kako bi se očuvao za analizu na UPLC uređaju. Preostali talog je sušen u sušioniku na 50 °C do konstante mase. Po završetku procesa sušenja, kivete su ohlađene u eksikatoru i nakon toga su izvagane na analitičkoj vagi. Koncentracija biomase kvasca X (g L<sup>-1</sup>) računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$X = \frac{m_{k+bm} - m_k}{V_{uz}} \quad [1]$$

Gdje je X koncentracija biomase (g L<sup>-1</sup>), m<sub>k+bm</sub> masa kivete s biomasom (g), m<sub>k</sub> masa prazne kivete (g) i V<sub>uz</sub> volumen uzorka (5 L).

### 3.3.3. Analiza uzoraka uređajem za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Izdvojeni supernatant kako je opisano u poglavlju 3.3.2. zamrznut je kako bi se očuvao za UPLC analizu. Prije početka analize uzorak je odleđen. U kivetu od 2 mL otpipetirano je 800  $\mu\text{L}$  uzorka i 800  $\mu\text{L}$  10 %-tne otopine cinkovog sulfata heptahidrata. Uzorci su homogenizirani 20 sekundi na vorteksu i ostavljeni na sobnoj temperaturi 10 – 20 minuta. Nakon toga su centrifugirani 5 minuta pri 10 000  $\text{rpm}$  kako bi se istaložili proteini i nečistoće koje mogu uzrokovati smetnje prilikom analize u UPLC uređaju. Supernatant je propušten kroz filter pora 0,20  $\mu\text{L}$  u staklene vijalice. Uzorci pripremljeni na ovaj način analizirani su UPLC uređajem.

### 3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

Za određivanje parametara uspješnosti procesa uzgoja kvasaca i dobivanja produkata metabolizma korištene su sljedeće jednadžbe:

1. Potrošnja supstrata –  $\Delta S$ :

$$\Delta S = S_0 - S \quad [2]$$

gdje je  $\Delta S$  potrošnja supstrata ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $S_0$  koncentracija supstrata na početku uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ ), a  $S$  koncentracija supstrata na kraju uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ ).

2. Prinos biomase –  $Y_X$ :

$$Y_X = X - X_0 \quad [3]$$

gdje je  $Y_X$  prinos mase biomase ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $X_0$  koncentracija biomase na početku uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ ), a  $X$  koncentracija biomase na kraju uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ ).

3. Prinos produkta metabolizma –  $Y_P$ :

$$Y_P = P - P_0 \quad [4]$$

gdje je  $Y_P$  prinos produkta metabolizma ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $P_0$  koncentracija produkta na početku uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ ), a  $P$  koncentracija produkta na kraju uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ ).

4. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu –  $Y_{X/S}$ :

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S - S_0} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [5]$$

5. Koeficijent pretvorbe supstrata u proizvod –  $Y_{P/S}$ :

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S - S_0} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [6]$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532 i *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, te kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 na podlogama s glicerolom u Erlenmeyerovim tikvicama. Uzgoji su provedeni u aerobnim uvjetima ( $n = 180 \text{ o min}^{-1}$ ) kako bi se odredila sposobnost rasta ne-*Saccharomyces* kvasaca na glicerolu (poglavlje 4.1.).

Prema dostupnoj literaturi za proizvodnju šećernih alkohola s pomoću kvasaca potrebne su smanjene koncentracije kisika i/ili dodatak stresora (npr. NaCl, visoka koncentracija šećera, nizak pH; Rzechonek i sur., 2018). Stoga su uzgoji navedenih kvasaca provedeni u standardnim podlogama s glukozom i podlogama s glicerolom bez i s dodatkom NaCl-a pri smanjenoj brzini rotacije ( $n = 125 \text{ o min}^{-1}$ ; poglavlje 4.2.) bez održavanja pH vrijednosti podloge. Nakon provedenih uzgoja određeni su i kvantificirani proizvodi metabolizma ovih kvasaca te su određeni parametri uspješnosti provedenih uzgoja.

Na temelju dobivenih rezultata, za uzgoje u većem mjerilu (bioreaktor s miješalom) odabran je kvasac *Yarrowia lipolytica* DSM 21175. Uzgoji su provedeni u YPG podlozi s NaCl-om i podlozi u literaturi (Yang i sur., 2022) nazvanoj kao podloga za proizvodnju eritritola (poglavlje 3.2.1.5.) pri sniženoj pH vrijednosti od 3 jedinice (poglavlje 4.3.)

U poglavlju 4.1. prikazani su i raspravljani rezultati aerobnog uzgoja kvasaca u YPG podlozi.

U poglavlju 4.2. prikazani su i raspravljani rezultati uzgoja kvasaca u podlogama: YPD, YPD s dodatkom NaCl-a, YPG i YPG s dodatkom NaCl-a.

U poglavlju 4.3. prikazani su i raspravljani rezultati uzgoja kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u bioreaktorima s miješalima u „podlozi za proizvodnju eritritola“ i u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a.

#### 4.1. AEROBNI UZGOJ KVASACA U PODLOZI S GLICEROLOM

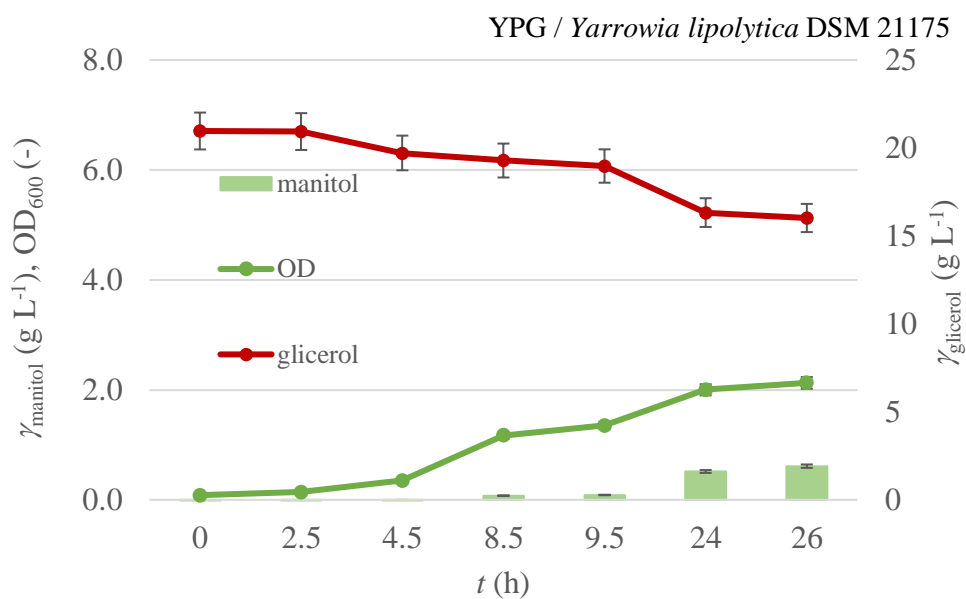
U ovom poglavlju prikazani su uzgoji kvasaca u podlozi s glicerolom u aerobnim uvjetima. Uzgoji su provedeni bez održavanja pH vrijednosti podloge pri temperaturi uzgoja od 28 °C i broju okretaja miješala od 180 min<sup>-1</sup>. Tijekom provedenih uzgoja glavni produkt metabolizma bila je biomasa kvasca (slika 4-7).

Glavni produkt kvasca *Y. lipolytica* DSM 21175 ovim načinom uzgoja, koristeći glicerol kao supstrat, bio je biomasa (slika 4). Također, kvasac je proizveo i manitol, čija je najveća koncentracija postignuta u 26. satu te je iznosila 0,61 g L<sup>-1</sup>, a koeficijent konverzije supstrata u manitol iznosio je samo 0,09 g g<sup>-1</sup>. Maksimalna koncentracija biomase postignuta je u 26. satu, a iznosila je 4,96 g L<sup>-1</sup> pri čemu je prinos biomase 0,46 g g<sup>-1</sup>. Tijekom uzgoja iz podloge utrošeno je 4,94 g L<sup>-1</sup> glicerola, odnosno 23,57 % ukupnog glicerola.

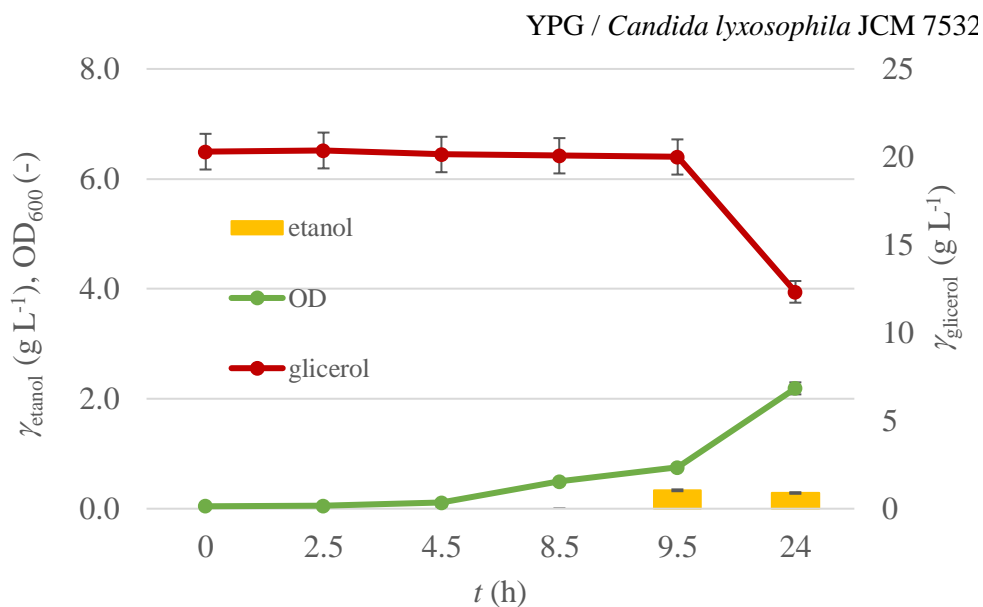
Kvasac *Candida lyxosophila* je, uz biomasu, proizveo i vrlo malu količinu etanola (slika 5). Najveća koncentracija etanola proizvedena je nakon 9,5 sati, a iznosila je 0,33 g L<sup>-1</sup>, uz koeficijent konverzije od 0,03 g g<sup>-1</sup>. Maksimalna koncentracija biomase iznosila je 4,40 g L<sup>-1</sup>, postignuta je u 26. satu, a prinos biomase je 0,29 g g<sup>-1</sup>. Prvih 9,5 sati kvasac nije trošio glicerol. Unatoč tome, kvasac je proizveo biomasu i etanol. Nastajanje biomase i produkta bez trošenja glicerola može se objasniti činjenicom da kvaščev ekstrakt može sadržavati i do 7 % trehaloze koju kvasac može metabolizirati (Zhang i sur, 2003).

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* proizveo je biomasu i etanol (slika 6). Najveća koncentracija etanola proizvedena je u 24. satu i to 1,00 g L<sup>-1</sup>, uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{etanol/S}} = 0,20 \text{ g g}^{-1}$ . U 26. satu postigao je maksimalnu koncentraciju biomase od 3,9 g L<sup>-1</sup>. Prinos biomase iznosi 0,49 g g<sup>-1</sup>. Kvasac je nakon 24. sata koristio etanol kao supstrat, a potrošio je neznatnu količinu glicerola (0,64 g L<sup>-1</sup>) prilikom uzgoja u 26 sati. Pretpostavka je, kao i kod kvasca *C. lyxosophila*, da je kvasac prvo trošio trehalozu.

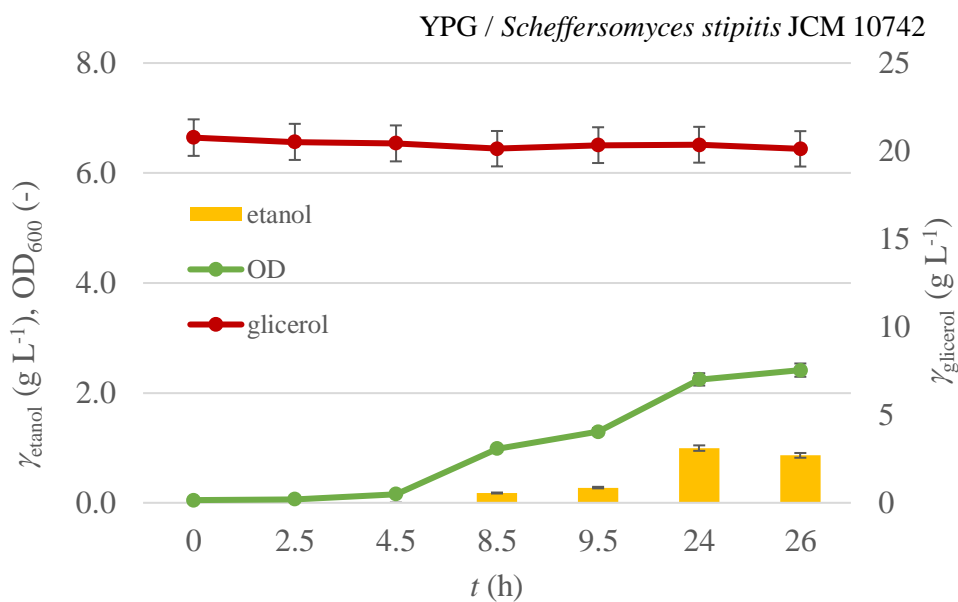
Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* proizveo je biomasu (slika 7). U podlogu je s inokulumom prenesen i etanol kojeg je kvasac počeo koristiti kao supstrat nakon 2,5 sati. Etanol je potrošen sav, a početna koncentracija iznosila je 1,02 g L<sup>-1</sup>. Maksimalna koncentracija biomase bila je 3,58 g L<sup>-1</sup>, uz prinos biomase  $Y_{\text{X/S}} = 0,50 \text{ g g}^{-1}$ , a postignuta je u 2. satu. Kvasac je potrošio 2,87 g L<sup>-1</sup> glicerola što predstavlja 13,60 % ukupnog glicerola u podlozi.



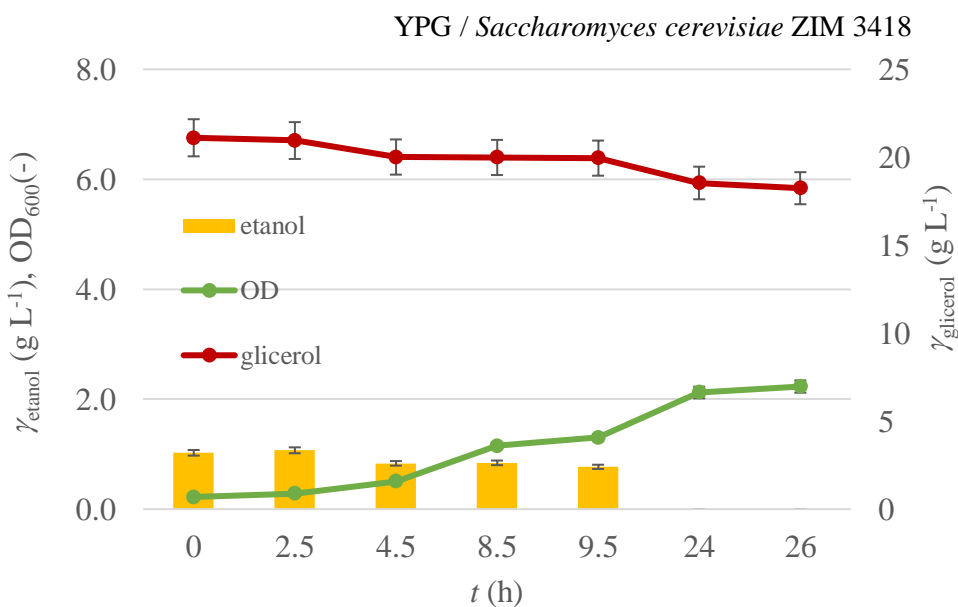
**Slika 4.** Aerobni uzgoj kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u YPG podlozi pri 28 °C stresanjem ( $n = 180 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge



**Slika 5.** Aerobni uzgoj kvasca *Candida lyxosophila* JCM 7532 u YPG podlozi pri 28 °C stresanjem ( $n = 180 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge



**Slika 6.** Aerobni uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 u YPG podlozi pri 28 °C stresanjem ( $n = 180 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge



**Slika 7.** Aerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u YPG podlozi pri 28 °C stresanjem ( $n = 180 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

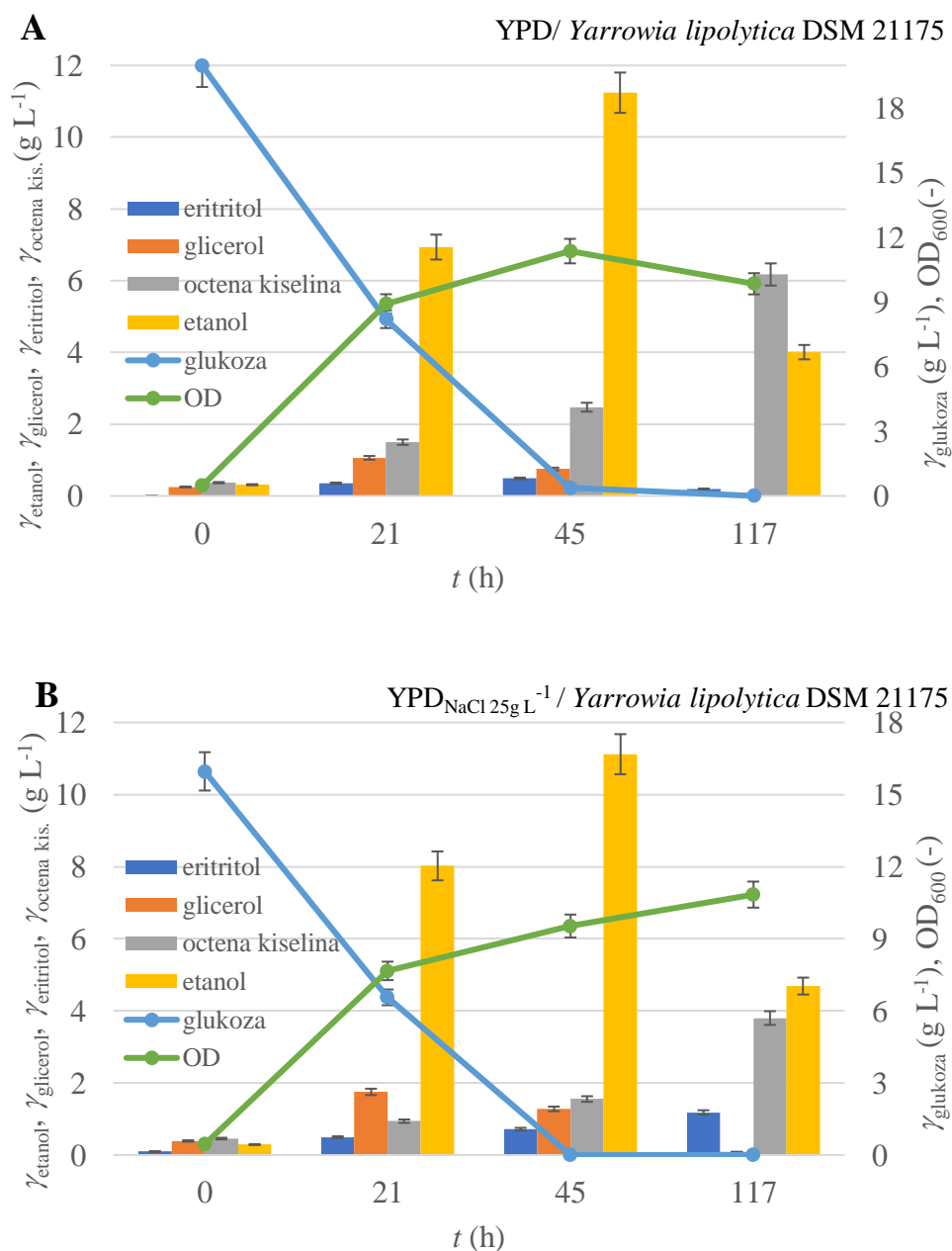


**Tablica 4.** Pokazatelji uspješnosti procesa aerobnog uzgoja kvasaca u YPG podlozi

<b>Mikroorganizam</b>	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175	<i>Candida lyxosophila</i> JCM 7532	<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3418
<b>X<sub>max</sub> [g L<sup>-1</sup>]</b>	4,96	4,40	3,90	3,58
<b>Y<sub>X/S</sub> [g g<sup>-1</sup>]</b>	0,46	0,29	0,49	0,50
<b>γ (manitol)<sub>max</sub> [g L<sup>-1</sup>]</b>	0,61	/	/	/
<b>γ (etanol)<sub>max</sub> [g L<sup>-1</sup>]</b>	/	0,33	1,00	/
<b>Y<sub>manitol/S</sub> [g g<sup>-1</sup>]</b>	0,09	/	/	/
<b>Y<sub>etanol/S</sub> [g g<sup>-1</sup>]</b>	/	0,03	0,20	/

## **4.2. UZGOJ KVASACA U PODLOZI S GLUKOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA I ODREĐIVANJE PRODUKATA METABOLIZMA TIJEKOM UZGOJA BEZ I S DODATKOM NaCl-a**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u standardnoj YPD podlozi (slike 8 – 11A) i YPD podlozi uz dodatak natrijevog klorida ( $\gamma_{\text{NaCl}} = 25 \text{ g L}^{-1}$ ; slike 8 – 11B). Uzgoji su provedeni u mikroaerofilnim uvjetima bez održavanja pH vrijednosti podloge pri temperaturi uzgoja od 28 °C i pri broju okretaja miješala od 125 min<sup>-1</sup>. Uzgoji su provedeni u svrhu određivanja osnovnih produkata metabolizma navedenih kvasaca. Tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije biomase mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm, ali i gravimetrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.3.2.. Uzorci izuzimani u određenim vremenskim intervalima analizirani su na uređaju za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti kako bi se odredili nastali produkti metabolizma. Natrijev klorid u YPD podlogu dodan je u svrhu postizanja osmotskog stresa i povećanja proizvodnje šećernih alkohola (Tomaszewska i sur., 2012).

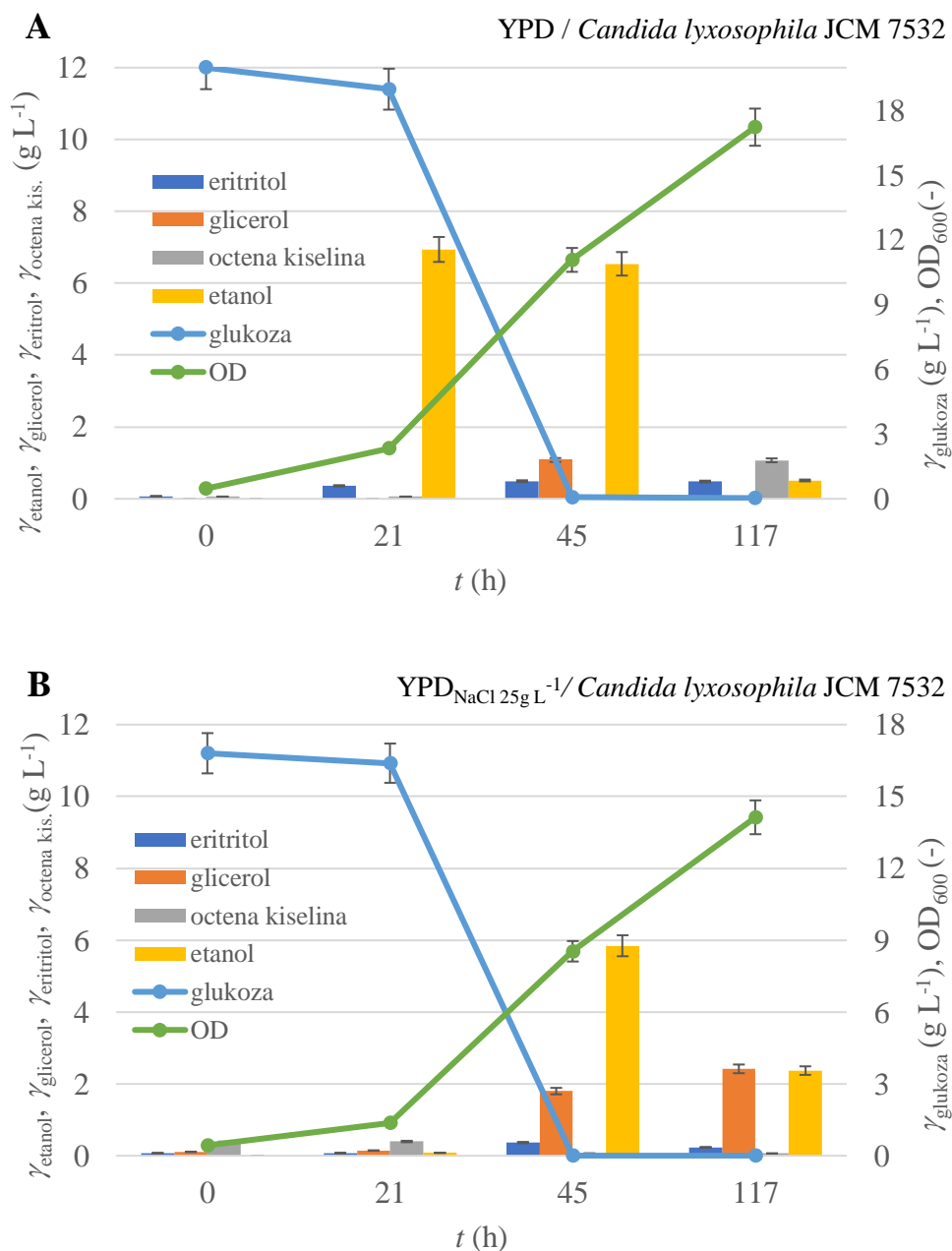


**Slika 8.** Uzgoj kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u (A) YPD podlozi i (B) YPD podlozi s dodatkom NaCl-a ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ) pri  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

U YPD podlozi i u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a, kvasac *Y. lipolytica* proizveo je eritritol, glicerol, octenu kiselinu i etanol koristeći glukožu kao glavni supstrat. Najveća koncentracija eritritola u YPD podlozi proizvedena je nakon 45 sati i to  $0,49 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije supstrata u proizvod  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a najviše eritritola proizvedeno je nakon 117 sati i to skoro 2,5 puta više u odnosu u običnoj YPD podlozi, odnosno  $1,19 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije supstrata u proizvod  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,05 \text{ g g}^{-1}$ . Vidljivo

je kako dodatak NaCl-a u podlogu utječe na povećanje proizvodnje eritritola. U YPD podlozi najveća koncentracija glicerola od  $1,06 \text{ g L}^{-1}$  postignuta je u 21. satu, uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{glicerol/S}} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$ . U YPD podlozi s dodatkom NaCl-a također je maksimalna koncentracija postignuta u 21. satu, ali nešto veća u odnosu na onu u običnoj YPD podlozi i iznosi  $1,75 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{glicerol/S}} = 0,06 \text{ g g}^{-1}$  što je 3 puta više nego u YPD podlozi bez NaCl-a. U obje podloge proizvedeno je više glicerola nego eritritola. Dobiveni rezultati slažu se s podacima iz literature gdje autori Ghezelbash i suradnici (2012) također imaju više prinose glicerola u odnosu na eritritol u podlozi s 1 % kvašćevog ekstrakta i pri bazičnim pH vrijednostima. Proizvedena octena kiselina maksimum koncentracije dosegla je u 117. satu u obje podloge. U YPD podlozi je ona iznosila  $6,17 \text{ g L}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a iznosila je  $3,80 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijent konverzije u YPD podlozi je  $0,21 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a iznosi  $0,14 \text{ g g}^{-1}$ . U YPD podlozi proizvedeno je skoro dvostruko više octene kiseline uz nešto veći koeficijent pretvorbe supstrata u proizvod. Prema Fickersu i suradnicima (2020) neki divlji sojevi su pri koncentraciji glukoze od  $60 \text{ g L}^{-1}$  i dušikom limitiranim uvjetima proizveli maksimalnu koncentraciju octene kiseline od  $24 \text{ g L}^{-1}$  uz koeficijent konverzije od  $0,48 \text{ g g}^{-1}$ . Nadalje, iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti da NaCl značajno utječe na smanjenje prinosa octene kiseline tijekom uzgoja (slika 8). Koncentracija etanola u obje podloge je najveća u 45. satu, u YPD podlozi proizvedeno je  $11,24 \text{ g L}^{-1}$  uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{etanol/S}} = 0,39 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a proizvedeno je  $11,12 \text{ g L}^{-1}$ , dok koeficijent konverzije iznosi  $Y_{\text{etanol/S}} = 0,46 \text{ g g}^{-1}$ . Zapravo, dodatkom NaCl-a proizvedena je približno ista količina etanola, te se može pretpostaviti da NaCl nema značajan utjecaj na proizvodnju etanola.

Glukoza kao glavni supstrat potrošena je u 45. satu u obje podloge. U YPD podlozi, nakon 21. sata kvasac *Y. lipolytica* počeo je koristiti proizvedeni glicerol kao supstrat, a u 117. satu potrošen je sav glicerol iz podloge. Također, kao supstrat korišteni su eritritol i etanol nakon 45. sata. U YPD podlozi s dodatkom NaCl-a kvasac je, također, nakon 21. sata koristio proizvedeni glicerol kao supstrat, a u 117. satu bio je potrošen gotovo sav. Nakon 45. sata kvasac je kao supstrat koristio i etanol. Maksimalna koncentracija biomase nije se značajno razlikovala u podlogama; u YPD podlozi bila je  $5,22 \text{ g L}^{-1}$  u 45. satu, a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a bila je  $6,42 \text{ g L}^{-1}$  u 117. satu. Prinosi biomase približno su jednaki, u YPD podlozi prinos iznosi  $0,09 \text{ g g}^{-1}$ , dok je u YPD podlozi s natrijevim kloridom prinos biomase  $0,10 \text{ g g}^{-1}$ .

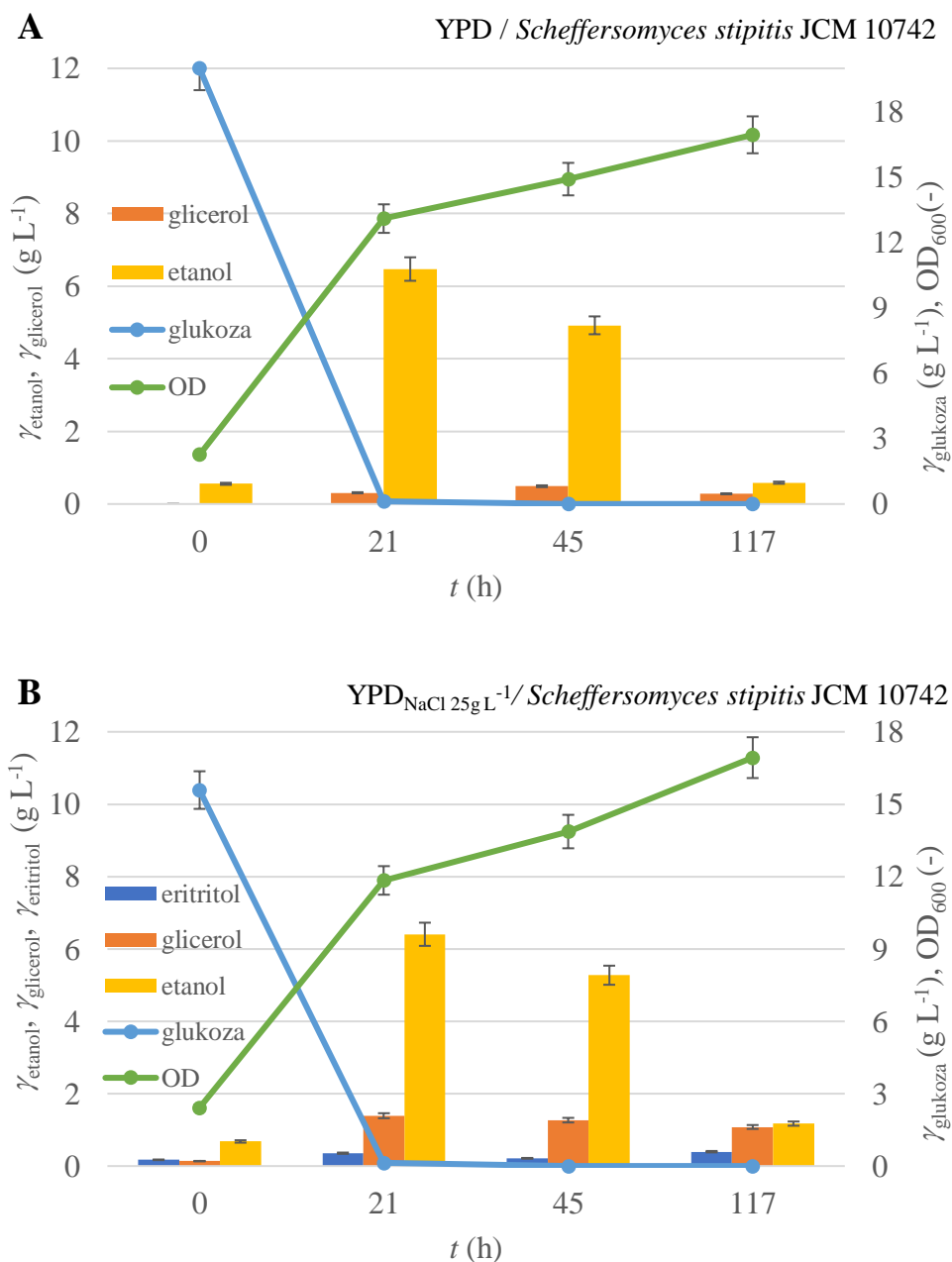


**Slika 9.** Uzgoj kvasca *Candida lyxosophila* JCM 7532 u (A) YPD podlozi i (B) YPD podlozi s dodatkom NaCl-a (25 g L<sup>-1</sup>) pri 28 °C stresanjem (n = 125 min<sup>-1</sup>) bez održavanja pH vrijednosti podloge

U YPD podlozi i u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a kvasac *C. lyxosophila* proizveo je eritritol, octenu kiselinu, etanol i glicerol (slika 9). U obje podloge kao glavni supstrat korištena je glukoza. U obje podloge najveća koncentracija eritritola postignuta je u 45. satu, u YPD podlozi iznosila je 0,49 g L<sup>-1</sup>, a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a iznosila je 0,37 g L<sup>-1</sup>, te nije vidljiv

utjecaj dodatka soli na prinos eritritola kao što je to kod kvasca *Y. lipolytica*. Koeficijent pretvorbe supstrata u eritritol u YPD podlozi je  $0,02 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a  $0,01 \text{ g g}^{-1}$ . Iz slika 9A i 9B vidljivo je da je u obje podloge proizveden i poliol glicerol. U YPD podlozi najveća koncentracija proizvedena je u 45. satu i iznosila je  $1,08 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{glicerol/S}} = 0,04 \text{ g g}^{-1}$ . U YPD podlozi s dodatkom NaCl-a proizvedeno je oko dva puta više glicerola, a najveća koncentracija od  $2,42 \text{ g L}^{-1}$  i koeficijentom pretvorbe  $Y_{\text{glicerol/S}} = 0,11 \text{ g g}^{-1}$  postignuta je u 117. satu. Glicerol, uz etanol u opisanim stresnim uvjetima predstavlja glavni produkt metabolizma. U YPD podlozi proizvedeno je  $1,07 \text{ g L}^{-1}$  octene kiseline, uz koeficijent pretvorbe  $Y_{\text{octena kiselina/S}} = 0,04 \text{ g g}^{-1}$ . Nadalje, dodatak NaCl-a u YPD podlogu ima utjecaj na prinos octene kiseline, tj. uz dodatak NaCl-a proizvedeno je manje octene kiseline ( $\gamma_{\text{octena kiselina}} = 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ) uz izrazito nizak koeficijent pretvorbe od  $0,002 \text{ g g}^{-1}$  u odnosu na prinos octene kiseline u YPD podlozi ( $\gamma_{\text{octena kiselina}} = 1,07 \text{ g L}^{-1}$ ). Također, dodatkom NaCl-a u podlogu proizvedeno je manje etanola uz približno isti koeficijent konverzije supstrata u etanol. U YPD podlozi maksimalna koncentracija postignuta je u 21. satu i iznosila je  $6,94 \text{ g L}^{-1}$  s koeficijentom konverzije supstrata u etanol od  $0,28 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a postignuta je u 45. satu i iznosila je  $5,84 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{etanol/S}} = 0,29 \text{ g g}^{-1}$ .

U obje podloge kvasac *C. lyxosophila* potrošio je svu glukozu u 45. satu. U YPD podlozi su nakon glukoze kao supstrati korišteni proizvedeni glicerol i etanol, prilikom čega je kvasac potrošio sav proizvedeni glicerol. U YPD podlozi s NaCl-om su, nakon glukoze, kao supstrat korišteni eritritol i etanol te glicerol koji je potrošen sav. Maksimalne koncentracije biomase postignute su u 117. satu u obje podloge, u YPD podlozi iznosila je  $9,96 \text{ g L}^{-1}$  uz prinos biomase  $0,29 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD s dodatkom NaCl-a maksimalna koncentracija bila je  $10,78 \text{ g L}^{-1}$  uz prinos biomase od  $0,35 \text{ g g}^{-1}$ .



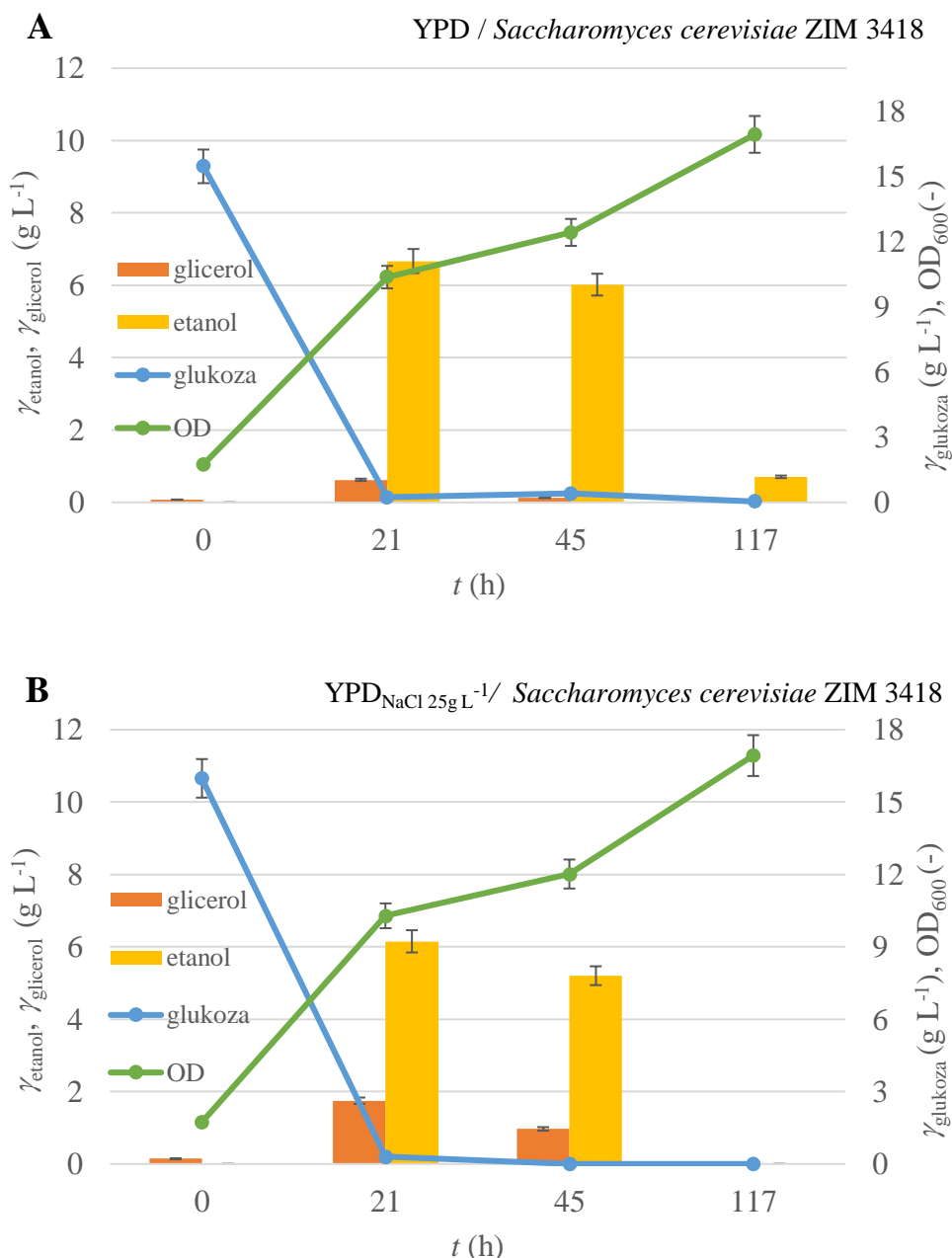
**Slika 10.** Uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 u (A) YPD podlozi i (B) YPD podlozi s dodatkom NaCl-a (25 g L<sup>-1</sup>) pri 28 °C stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 tijekom uzgoja u YPD podlozi proizveo je glicerol i etanol, a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a, uz glicerol i etanol, proizveden je i eritritol (slika 10). Najveća koncentracija eritritola u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a postignuta je u 117. satu, a iznosila je 0,40 g L<sup>-1</sup>, uz koeficijent pretvorbe supstrata u proizvod  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$ . U

YPD podlozi, najveća koncentracija glicerola proizvedena je u 45. satu, a iznosila je  $0,49 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent pretvorbe  $Y_{\text{glicerol/S}} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$ . U YPD podlozi s dodatkom NaCl-a najveća koncentracija proizvedenog glicerola bila je  $1,39 \text{ g L}^{-1}$  u 21. satu, a koeficijent pretvorbe supstrata u glicerol iznosi  $0,06 \text{ g g}^{-1}$ . U 21. satu u obje podloge proizvedena je približno ista najveća koncentracija etanola. U YPD podlozi iznosila je  $6,47 \text{ g L}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a iznosila je  $6,41 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijenti konverzije se razlikuju te je u YPD podlozi on  $0,24 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a  $0,28 \text{ g g}^{-1}$ .

Glukoza, kao glavni supstrat, u obje podloge potrošena je u 21. satu. Također, nakon 21. sata kvasac je počeo koristiti etanol kao supstrat, a nakon 45. sata glicerol. U YPD podlozi s dodatkom NaCl-a je također koristio glicerol i etanol nakon 21 h uzgoja kada je iz podloge iscrpljena sva glukoza. Maksimalna koncentracija biomase u obje podloge je postignuta u 117. satu, za YPD podlogu ona je iznosila  $9,58 \text{ g L}^{-1}$ , uz prinos biomase od  $0,28 \text{ g g}^{-1}$ , a za YPD podlogu s dodatkom NaCl-a maksimalna koncentracija iznosila je  $11,56 \text{ g L}^{-1}$ , uz prinos biomase od  $0,37 \text{ g g}^{-1}$ . Dodatak NaCl-a nije utjecao na proizvodnju etanola kod kvasca *S. stipitis*, ali je potaknuo proizvodnju eritritola i povećao proizvodnju glicerola. U radu Su i suradnici (2015) uzgojem kvasca *S. stipitis* u podlozi s 15 % glukoze proizveli su arabitol u koncentraciji od 2,8 do  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ , te 0,8 do  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  glicerola i 1,8 do  $4,7 \text{ g L}^{-1}$  octene kiseline i druge spojeve. Kvasac *S. stipitis* JCM 10742 YPD u podlogama sa i bez dodatka NaCl-a nije proizveo arabitol.





**Slika 11.** Uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u (A) YPD podlozi i (B) YPD podlozi s dodatkom NaCl-a (25 g L<sup>-1</sup>) pri 28 °C stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

U YPD i u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* proizveo je glicerol i etanol koristeći glukozu kao glavni supstrat (slika 11). Iz literature je poznato da kvasac *S. cerevisiae* proizvodi samo jedan poliol – glicerol (Erian i Sauer, 2022). U obje podloge najveća koncentracija glicerola postignuta je u 21. satu; u YPD podlozi bila je 0,62 g L<sup>-1</sup>, uz koeficijent konverzije 0,02 g g<sup>-1</sup>, a u YPD s dodatkom NaCl-a najveća koncentracija bila je skoro 3 puta veća

te je iznosila  $1,75 \text{ g L}^{-1}$  uz koeficijent konverzije  $0,07 \text{ g g}^{-1}$ . Najveća koncentracija etanola u obje podloge približno je jednaka, a postignuta je u 21. satu. U YPD podlozi iznosila je  $6,67 \text{ g L}^{-1}$ , a u YPD s dodatkom NaCl-a  $6,15 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijent konverzije u YPD podlozi je  $0,31 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD s dodatkom NaCl-a  $0,27 \text{ g g}^{-1}$ . Dodatkom NaCl-a u podlogu povećana je proizvodnja glicerola, dok na proizvodnju etanola nema značajnijeg utjecaja.

U obje podloge glukoza je potrošena u 21. satu. Nakon 21. sata, u YPD podlozi, kvasac je počeo koristiti glicerol i etanol kao supstrat, s tim da je potrošio sav glicerol. U YPD podlozi s NaCl-om također je nakon 21. sata počeo koristiti proizvedeni glicerol i etanol te ih je potrošio do kraja. Maksimalnu koncentraciju biomase u obje podloge kvasac je postigao u 117. satu, a ona je iznosila  $10,46 \text{ g L}^{-1}$ , ali je u YPD podlozi prinos biomase  $0,36 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPD s dodatkom NaCl-a  $0,30 \text{ g g}^{-1}$ .

Petrovska i suradnice (1999) provele su istraživanje utjecaja osmotskog stresa na proizvodnju glicerola u nekoliko kvasaca, a među kojima je bio i kvasac *S. cerevisiae*. Pri početnoj koncentraciji glukoze od  $50,00 \text{ g L}^{-1}$  kvasac je, potrošivši svu glukozu, proizveo  $5,20 \text{ g L}^{-1}$  biomase,  $22,20 \text{ g L}^{-1}$  etanola te  $1,00 \text{ g L}^{-1}$  glicerola. Koeficijent konverzije supstrata u glicerol bio je kao i u ovom radu, odnosno  $0,02 \text{ g g}^{-1}$ . Nadalje, rast u mediju s početnom koncentracijom glukoze  $100,00 \text{ g L}^{-1}$  i  $40,00 \text{ g L}^{-1}$  NaCl-a rezultirao je proizvodnjom  $4,40 \text{ g L}^{-1}$  biomase. Također, proizvedeno je  $23,30 \text{ g L}^{-1}$  etanola i  $6,50 \text{ g L}^{-1}$  glicerola uz koeficijent konverzije supstrata u glicerol  $0,07 \text{ g g}^{-1}$ , što je jednako koeficijentu dobivenom u ovom radu. Također, navode kako je u podlozi s dodatkom NaCl-a povećanje proizvodnje glicerola odgovor na osmotski stres.

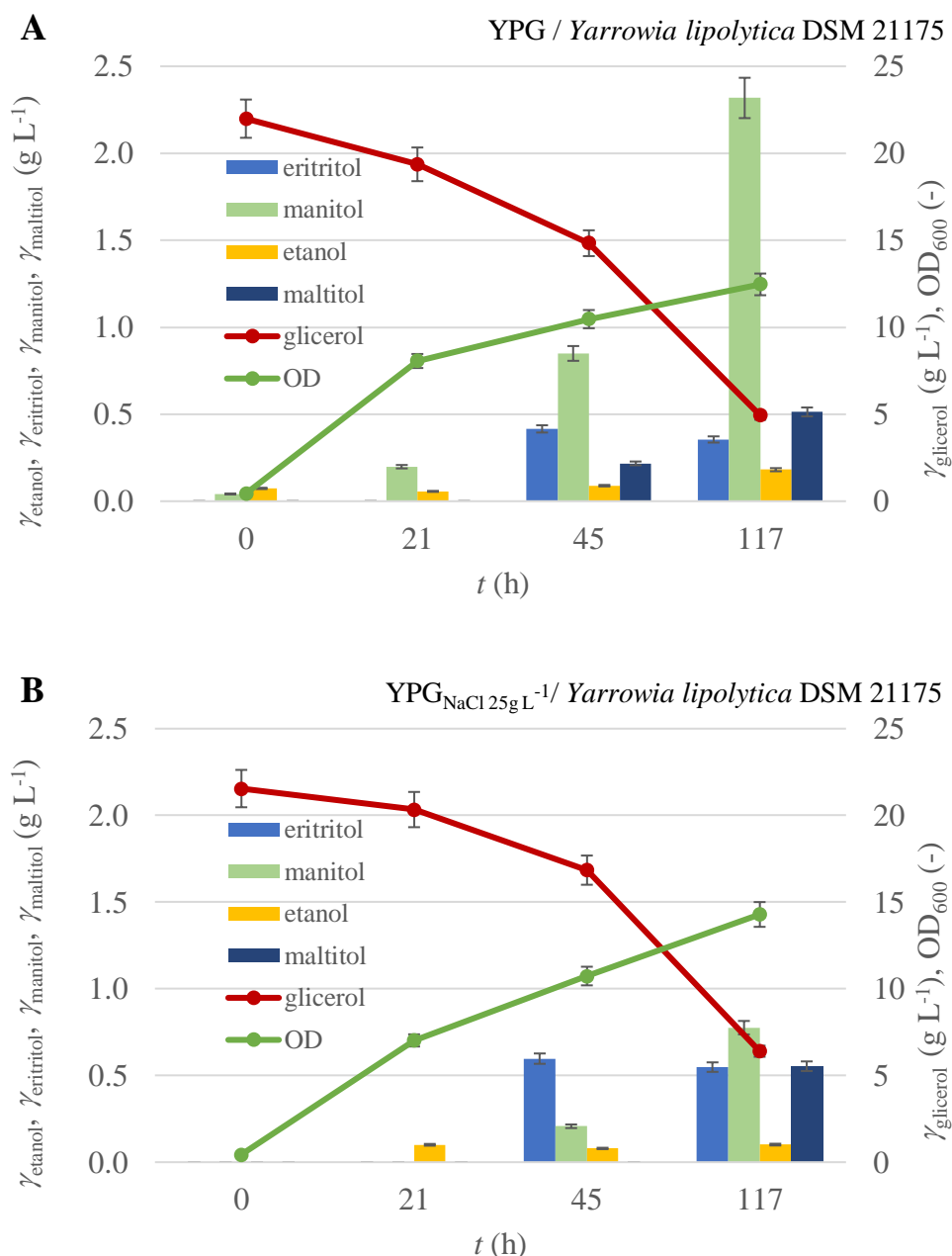
**Tablica 5.** Pokazatelji uspješnosti uzgoja kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u YPD podlozi bez i s dodatkom NaCl-a

Podloga	YPD				YPD + NaCl			
Mikroorganizam	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175	<i>Candida lyxosophila</i> JCM 7532	<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3418	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175	<i>Candida lyxosophila</i> JCM 7532	<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3418
$X_{\max}$ [g L <sup>-1</sup> ]	5,22	9,96	9,58	10,46	6,42	10,78	11,56	10,46
$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,09	0,29	0,28	0,36	0,10	0,35	0,37	0,30
$\gamma$ (eritritol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	0,49	0,49	/	/	1,19	0,37	0,40	/
$\gamma$ (glicerol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	1,06	1,08	0,49	0,62	1,75	2,42	1,39	1,75
$\gamma$ (octena kiselina) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	6,17	1,07	/	/	3,80	0,40	/	/
$\gamma$ (etanol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	11,24	6,94	6,47	6,67	11,12	5,84	6,41	6,15
$Y_{\text{eritritol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,02	0,02	/	/	0,05	0,01	0,02	/
$Y_{\text{glicerol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,02	0,04	0,02	0,02	0,06	0,11	0,06	0,07
$Y_{\text{octena kiselina}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,21	0,04	/	/	0,14	0,002	/	/
$Y_{\text{etanol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,39	0,28	0,24	0,31	0,46	0,29	0,28	0,27

### **4.3. UZGOJ KVASACA U PODLOZI S GLICEROLOM KAO IZVOROM UGLJIKA I ODREĐIVANJE PRODUKATA METABOLIZMA TIJEKOM UZGOJA BEZ I S DODATKOM NaCl-a**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u YPG podlozi u kojoj je glavni izvor ugljika – glukoza zamijenjena glicerolom iste koncentracije (20 g L<sup>-1</sup>, YPG, slike 12 – 15A) te u modificiranoj YPG podlozi u koju je dodan natrijev klorid ( $\gamma = 25$  g L<sup>-1</sup>; slika 12 – 15B). Tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije biomase mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm, ali i gravimetrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.3.2. Uzorci izuzimani u određenim vremenskim intervalima analizirani su na uređaju za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti kako bi se odredili nastali produkti metabolizma. Uzgoji su provedeni u mikroaerofilnim uvjetima bez održavanja pH vrijednosti podloge pri temperaturi uzgoja od 28°C i pri broju okretaja miješala od 125 min<sup>-1</sup>.

Uzgoji su provedeni u svrhu određivanja produkata metabolizma ovih kvasaca. Kao i u prethodnom poglavlju natrijev klorid dodan je kako bi se postigao osmotski stres i povećala proizvodnja eritritola.



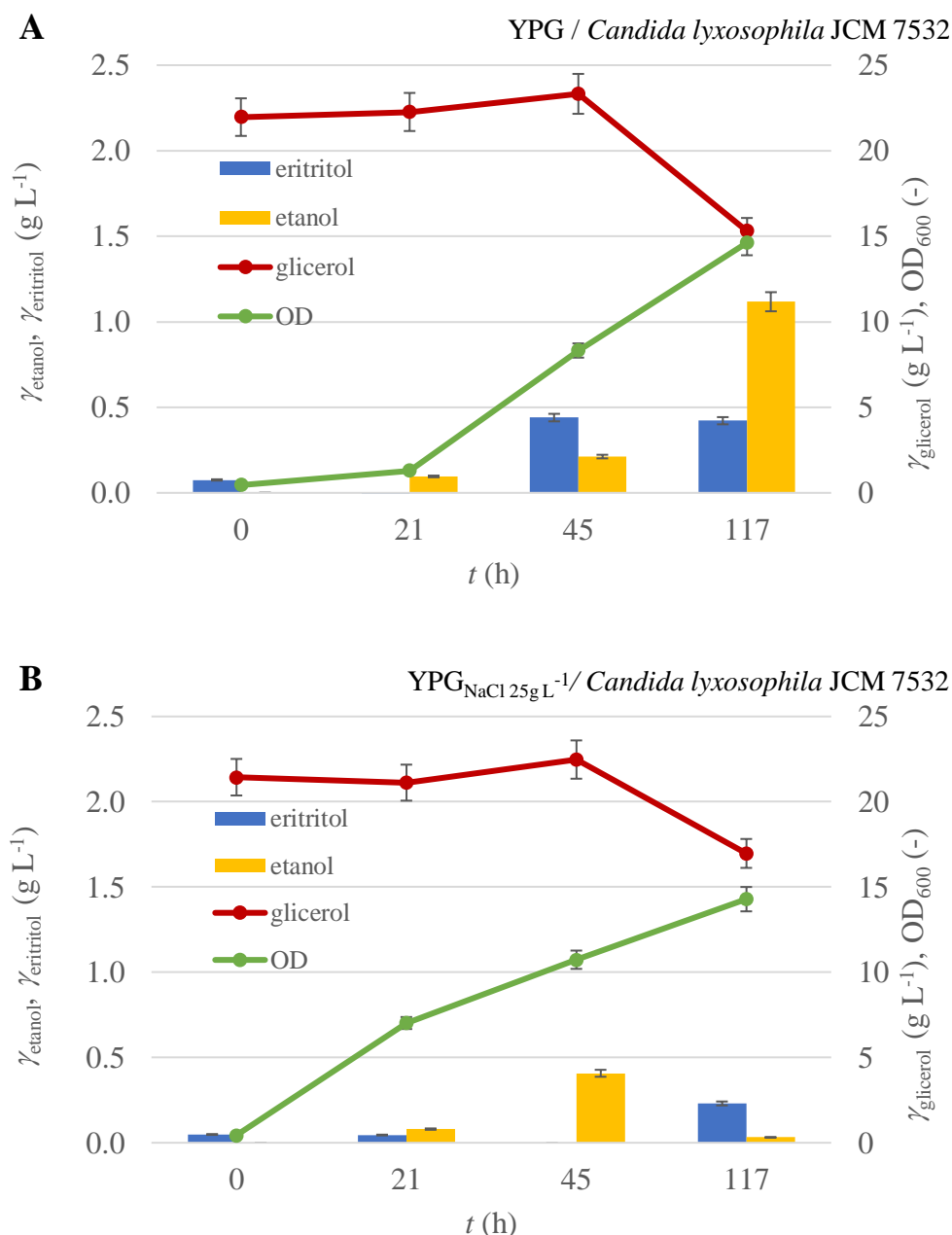
**Slika 12.** Uzgoj kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u (A) YPG podlozi i (B) YPG podlozi s dodatkom NaCl-a ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ) pri  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

Kvasac *Yarrowia lipolytica* u YPG podlozi bez i s dodatkom NaCl-a proizveo je eritritol, manitol, etanol i maltitol koristeći glicerol kao glavni supstrat (slika 12). Najveća koncentracija eritritola u obje podloge proizvedena je u 45. satu. U YPG podlozi iznosila je  $0,42 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije supstrata u proizvod  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a najveća koncentracija eritritola bila je nešto veća,  $0,60 \text{ g L}^{-1}$ , uz dvostruko veći koeficijent

konverzije od  $0,04 \text{ g g}^{-1}$ . Manitol je u najvećoj koncentraciji proizveden u 117. satu u obje podloge. Skoro tri puta veća koncentracija od  $2,32 \text{ g L}^{-1}$  proizvedena je u YPG podlozi, dok je u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a ona iznosila  $0,78 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijent konverzije je također veći u YPG podlozi i iznosi  $0,13 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a iznosi  $0,05 \text{ g g}^{-1}$ . Dodatkom NaCl-a došlo je do povećanja proizvodnje eritritola i smanjenja proizvodnje manitola. Povećanje proizvodnje eritritola uslijed dodatka NaCl-a može se objasniti činjenicom da kvasci trebaju više eritritola kako bi se spriječio izlazak vode iz stanice uslijed osmotskog stresa. Sukladno tome, više se supstrata metabolizira pentoza fosfatnim putem čiji je produkt eritritol, nego glikolizom kojom se uglavnom proizvodi manitol (Yang i sur., 2014). U svom radu, Tomaszewska-Hetman i Rywińska (2016) provele su uzgoje s pomoću tri divlja soja kvasca *Y. lipolytica* u podlozi s glicerolom bez i s dodatkom NaCl-a. U podlozi s glicerolom bez dodatka NaCl-a maksimalna koncentracija biomase bila je u rasponu od  $18,50 \text{ g L}^{-1}$  do  $19,80 \text{ g L}^{-1}$ . Proizvedeno je  $25,30$  do  $39,40 \text{ g L}^{-1}$  eritritola uz koeficijent konverzije supstrata u eritritol od  $0,17$  do  $0,26 \text{ g g}^{-1}$ . Koncentracija proizvedenog manitola iznosila je od  $16,60$  do  $20,00 \text{ g L}^{-1}$ . Dodatkom  $25 \text{ g L}^{-1}$  NaCl-a proizvedeno je od  $14,60$  do  $18,30 \text{ g L}^{-1}$  biomase. Koncentracija proizvedenog eritritola bila je u rasponu od  $40,10$  do  $66,80 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijente konverzije  $0,27 - 0,42 \text{ g g}^{-1}$ . U podlozi s dodatkom NaCl-a proizvedene su i značajno manje koncentracije manitola ( $3,20 - 6,90 \text{ g L}^{-1}$ ).

U YPG podlozi, uz koeficijent konverzije od  $0,01 \text{ g g}^{-1}$ , najveća koncentracija etanola u iznosu od  $0,18 \text{ g L}^{-1}$  proizvedena je u 117. satu. Najveća koncentracija etanola u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a proizvedena je u 21. satu i iznosila je  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ , a koeficijent konverzije je  $0,01 \text{ g g}^{-1}$ . Približno iste maksimalne koncentracije maltitola postignute su u 117. satu u obje podloge. U YPG podlozi bila je  $0,51 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{maltitol/S}} = 0,03 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a iznosila je  $0,55 \text{ g L}^{-1}$ , uz nešto veći koeficijent konverzije od  $0,04 \text{ g g}^{-1}$ .

U 117 sati provođenja uzgoja, kvasac je u YPG podlozi potrošio  $77,58 \%$  glicerola, odnosno  $17,06 \text{ g L}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a potrošio je nešto manje glicerola, točnije  $15,14 \text{ g L}^{-1}$  što je  $70,29 \%$ . Maksimalnu koncentraciju biomase kvasac je proizveo u 117. satu u obje podloge, u YPG podlozi  $8,44 \text{ g L}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a  $11,52 \text{ g L}^{-1}$ . Prinos biomase iznosi  $0,31 \text{ g g}^{-1}$  u YPG podlozi te  $0,43 \text{ g g}^{-1}$  u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a.



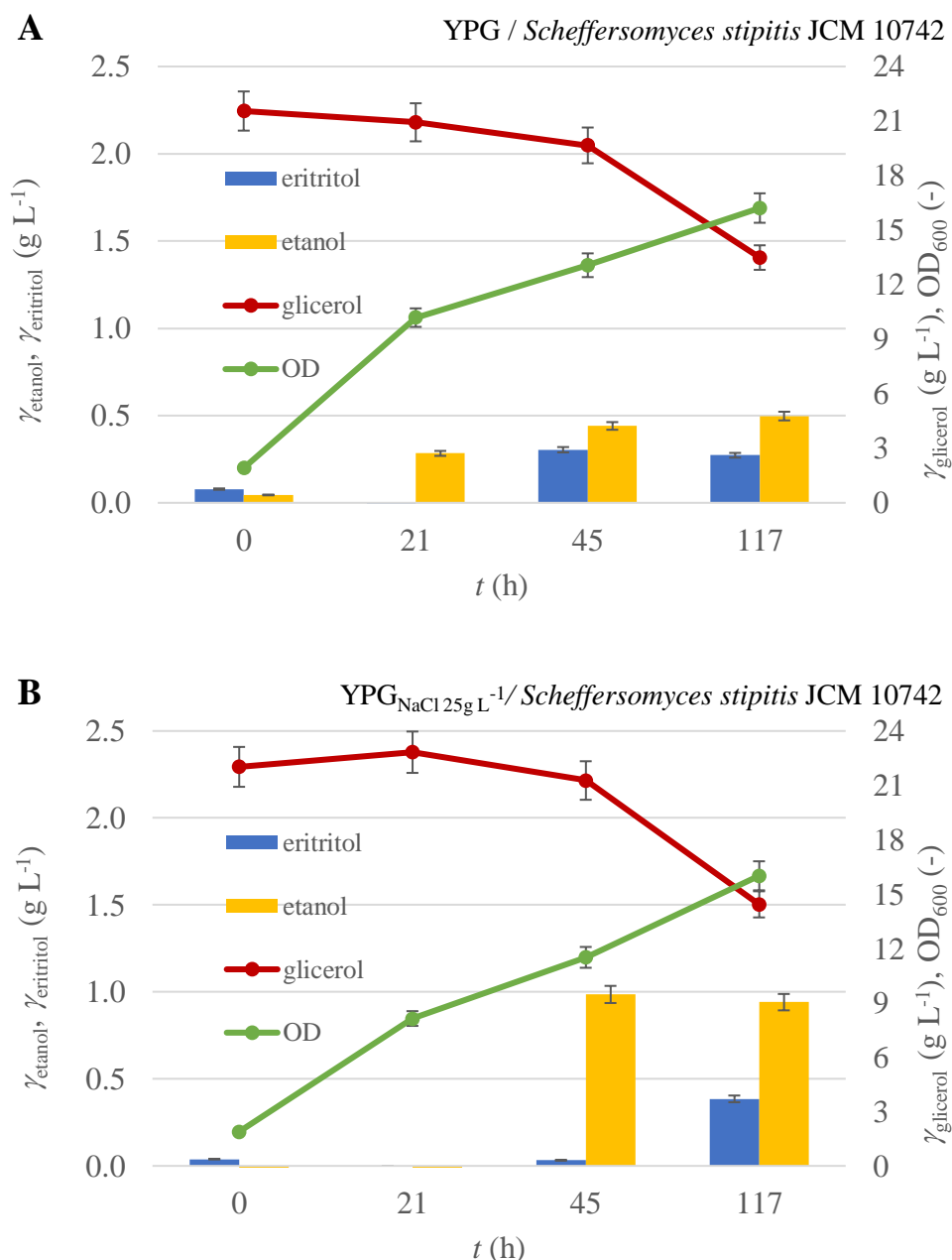
**Slika 13.** Uzgoj kvasca *Candida lyxosophila* JCM 7532 u (A) YPG podlozi i (B) YPG podlozi s dodatkom NaCl-a (25 g L<sup>-1</sup>) pri 28 °C stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

U YPG podlozi i YPG podlozi s dodatkom NaCl-a kvasac *Candida lyxosophila* proizveo je eritritol i etanol na glicerolu kao glavnom supstratu (slika 13). Uz koeficijent konverzije supstrata u proizvod  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,04 \text{ g g}^{-1}$  najveću koncentraciju eritritola u YPG podlozi proizveo je u 45. satu, a iznosila je  $0,44 \text{ g L}^{-1}$ . U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a najveća koncentracija eritritola iznosila je  $0,23 \text{ g L}^{-1}$ , uz koeficijent konverzije od  $0,03 \text{ g g}^{-1}$ , a proizvedena je u 117. satu. U

literaturi nema dostupnih podataka za proizvodnju eritritola s kvascem *C. lyxosophila*, iako je u literaturi poznato da neke vrste kvasaca iz roda *Candida* mogu proizvoditi različite šećerne alkohole. Tako kvasac *Candida magnoliae* može proizvoditi arabitol, eritritol, manitol, ksilitol i glicerol, a kvasac *Candida tropicalis* može proizvoditi arabitol, ksilitol i glicerol (Erian i Sauer, 2022). Najveća koncentracija etanola u YPG podlozi proizvedena je u 117. satu i uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{etanol/S}} = 0,13 \text{ g g}^{-1}$  iznosila je  $1,12 \text{ g L}^{-1}$ . U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a maksimalna koncentracija etanola postignuta u 45. satu bila je  $0,41 \text{ g L}^{-1}$ , a koeficijent konverzije iznosi  $0,08 \text{ g g}^{-1}$ .

Kvasac *C. lyxosophila* je više glicerola potrošio u YPG podlozi, odnosno 30,33 % ili  $6,66 \text{ g L}^{-1}$  glicerola. U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a potrošio je  $4,47 \text{ g L}^{-1}$  glicerola što je 20,85 %, a između 45. i 117. sata, uz trošenje glicerola, kao supstrat trošio je i proizvedeni etanol. Maksimalna koncentracija biomase postignuta je u obje podloge u 117. satu. U YPG podlozi iznosila je  $6,36 \text{ g L}^{-1}$  uz prinos biomase  $Y_{\text{X/S}} = 0,39 \text{ g g}^{-1}$ , dok je dodatkom NaCl-a u YPG podlogu maksimalna koncentracija biomase bila  $9,68 \text{ g L}^{-1}$  pri čemu je prinos biomase  $1,04 \text{ g g}^{-1}$ . Dodatak NaCl-a je povećao je proizvodnju biomase, a smanjio proizvodnju etanola i eritritola.



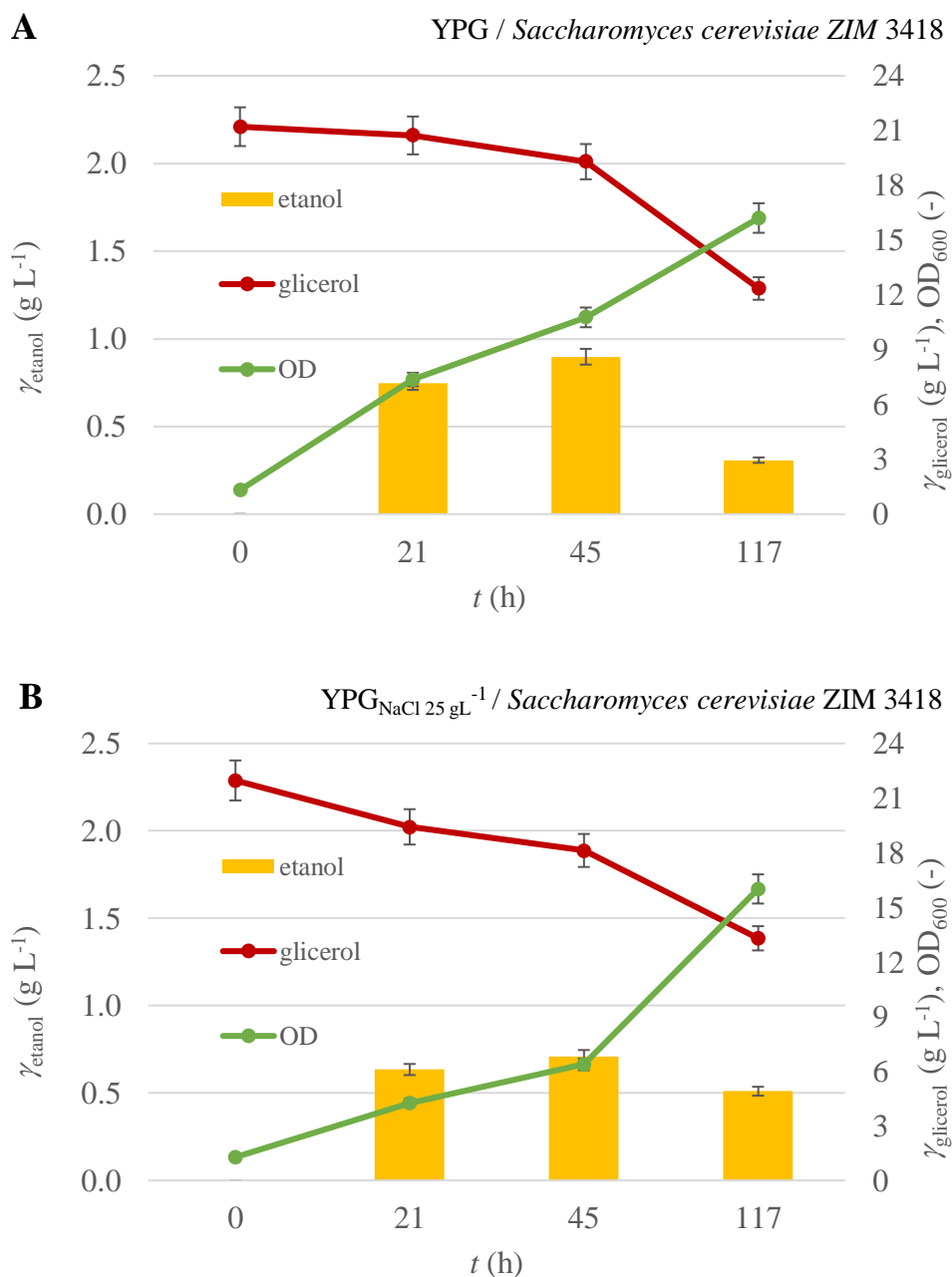


**Slika 14.** Uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 u (A) YPG podlozi i (B) YPG podlozi s dodatkom NaCl-a (25 g L<sup>-1</sup>) pri 28 °C stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* je, kao i *C. lyxosophila*, u obje podloge proizveo samo eritritol i etanol iz glicerola kao glavnog izvora ugljika (slika 14). Najveća koncentracija eritritola u YPG podlozi bila je 0,30 g L<sup>-1</sup> u 45. satu, uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$ . U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a najveća koncentracija proizvedena je u 117. satu i iznosila je 0,39 g L<sup>-1</sup> uz isti koeficijent konverzije kao u YPG podlozi bez dodatka NaCl-a, odnosno 0,04 g g<sup>-1</sup>. Najveća

koncentracija etanola u YPG podlozi proizvedena je u 117. satu, a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a u 45. satu. U YPG podlozi iznosila je  $0,50 \text{ g L}^{-1}$  uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{etanol/S}} = 0,06 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a bila je  $0,99 \text{ g L}^{-1}$  te je koeficijent konverzije dvostruko veći, točnije  $0,12 \text{ g g}^{-1}$ .

U YPG podlozi, kvasac *S. stipitis* potrošio je  $8,06 \text{ g L}^{-1}$  glicerola, odnosno 37,40 % ukupnog glicerola, a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a potrošio je  $7,59 \text{ g L}^{-1}$ , što predstavlja 34,47 % ukupne količine glicerola. Maksimalnu koncentraciju biomase dosegao je u 117. satu. Maksimalna koncentracija biomase nije se uvelike razlikovala u dvije podloge; u YPG podlozi bila je  $9,38 \text{ g L}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a  $10,70 \text{ g L}^{-1}$ . Prinosi biomasa također se ne razlikuju značajno, odnosno u YPG podlozi je  $0,75 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodanim NaCl-om  $0,78 \text{ g g}^{-1}$ . Dodatkom NaCl-a povećana je proizvodnja oba produkta, eritritola i etanola, ali bez značajnijeg utjecaja na proizvodnju biomase.



**Slika 15.** Uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u (A) YPG podlozi i (B) YPG podlozi s dodatkom NaCl-a (25 g L<sup>-1</sup>) pri 28 °C stresanjem ( $n = 125 \text{ min}^{-1}$ ) bez održavanja pH vrijednosti podloge

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u YPG podlozi bez i s dodatkom NaCl-a proizvodi etanol (slika 15). U 45. satu je postignuta najveća koncentracija etanola u obje podloge. U YPG podlozi bila je 0,90 g L<sup>-1</sup>, a u YPG s dodatkom NaCl-a 0,71 g L<sup>-1</sup>. Koeficijenti konverzije približno su slični, odnosno u YPG podlozi je 0,09 g g<sup>-1</sup>, a u YPG s dodatkom NaCl-a 0,08 g g<sup>-1</sup>.

Kvasac je potrošio skoro istu količinu glicerola u obje podloge. Točnije, u YPG podlozi potrošeno je  $8,85 \text{ g L}^{-1}$  što je  $41,73 \%$  ukupnog glicerola. U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a potrošeno je  $8,67 \text{ g L}^{-1}$  ( $39,46 \%$ ) glicerola. Maksimalna koncentracija biomase u obje je podloge postignuta u 117. satu. U YPG podlozi iznosila je  $9,80 \text{ g L}^{-1}$ , uz prinos biomase od  $0,67 \text{ g g}^{-1}$ , a u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a iznosila je neznatno manje,  $9,60 \text{ g L}^{-1}$  i uz nešto manji prinos biomase od  $0,53 \text{ g g}^{-1}$ . Dodatak NaCl-a nije imao značajnijeg utjecaja na rast biomase.

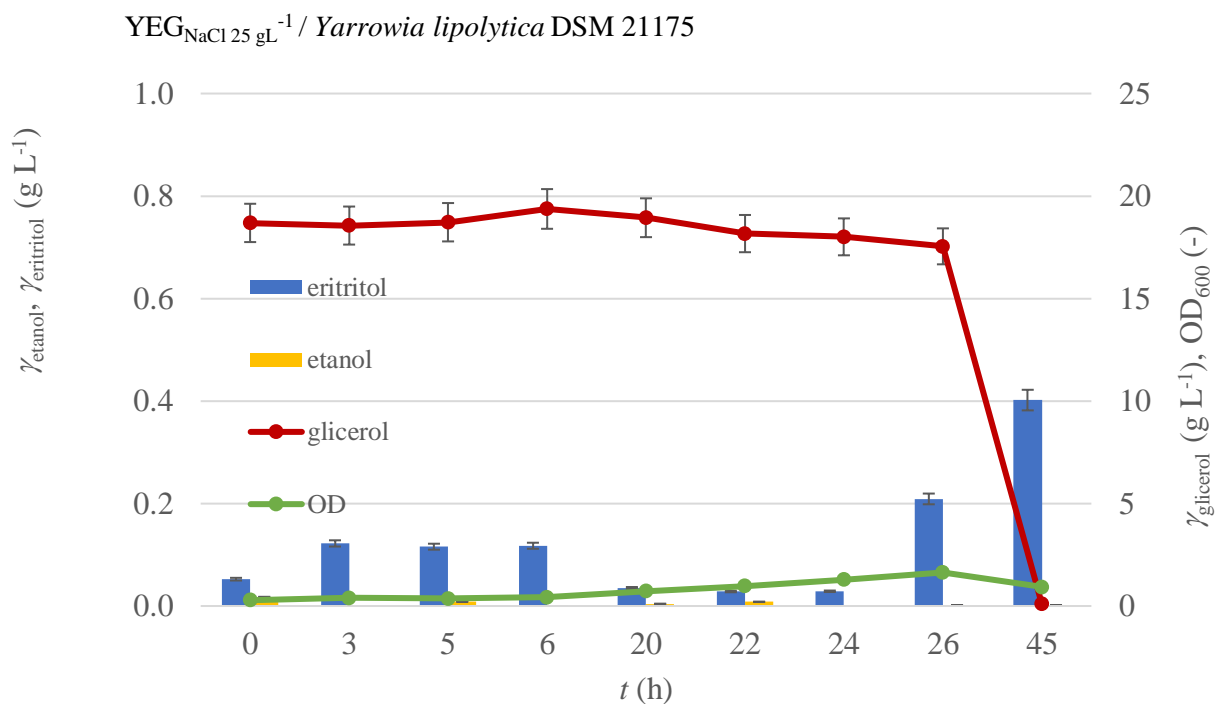
**Tablica 6.** Pokazatelji uspješnosti uzgoja kvasaca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u YPG podlozi bez i s dodatkom NaCl-a

Podloga	YPG				YPG + NaCl			
Mikroorganizam	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175	<i>Candida lyxosophila</i> JCM 7532	<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3418	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 21175	<i>Candida lyxosophila</i> JCM 7532	<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3418
$X_{\max}$ [g L <sup>-1</sup> ]	8,44	6,36	9,38	9,80	11,52	9,68	10,70	9,60
$Y_{x/s}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,31	0,39	0,75	0,67	0,43	1,04	0,78	0,53
$\gamma$ (eritritol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	0,42	0,44	0,30	/	0,60	0,23	0,39	/
$\gamma$ (etanol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	0,18	1,12	0,50	0,90	0,10	0,41	0,99	0,71
$\gamma$ (manitol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	2,32	/	/	/	0,78	/	/	/
$\gamma$ (maltitol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	0,51	/	/	/	0,55	/	/	/
$Y_{\text{eritritol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,02	0,04	0,02	/	0,04	0,03	0,04	/
$Y_{\text{etanol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,01	0,13	0,06	0,09	0,01	0,08	0,12	0,08
$Y_{\text{manitol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,13	/	/	/	0,05	/	/	/
$Y_{\text{maltitol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,03	/	/	/	0,04	/	/	/

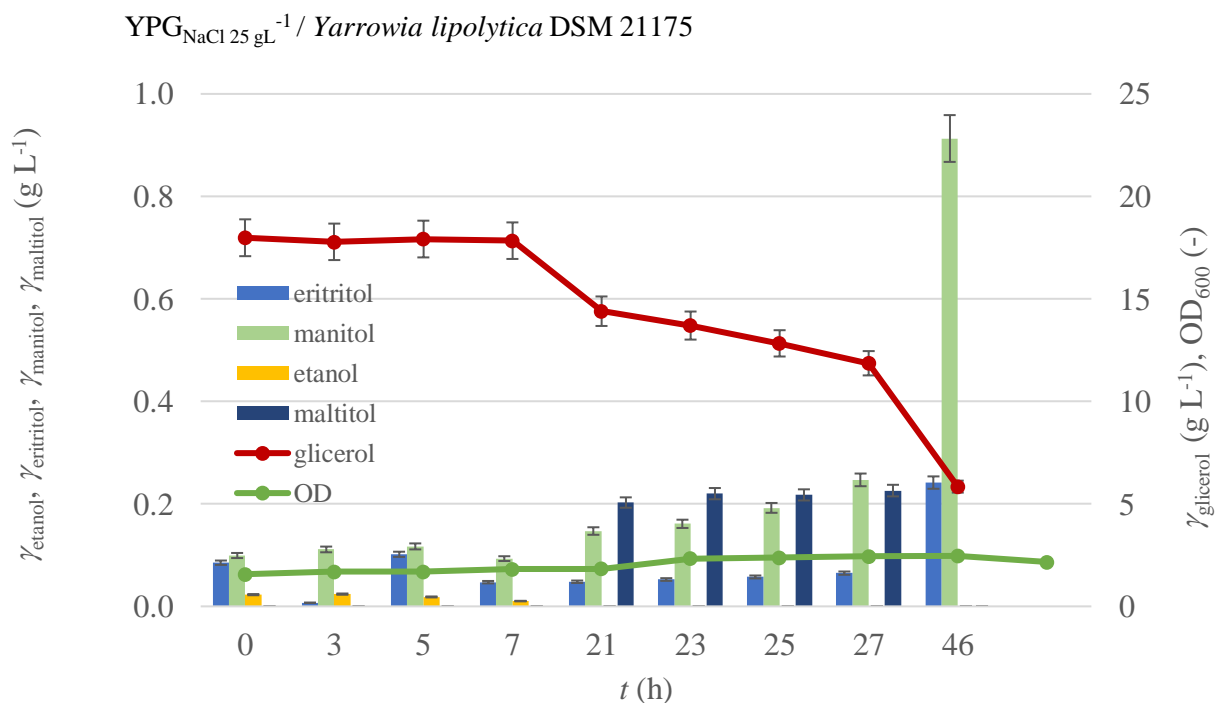
#### **4.4. UZGOJ KVASCA *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 U BIOREAKTORIMA S MIJEŠALOM**

Uzgoji kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 provedeni su u bioreaktorima s miješalom (opisanim u poglavlju 3.1.4.1.), pri pH vrijednosti od 3 jedinice i temperaturi od 30 °C, u mikroaerofilnim uvjetima ( $F_{\text{zrak}} = 2 \text{ L min}^{-1}$ ) i pri brzini okretaja miješala od  $400 \text{ min}^{-1}$ . Kao podloge za uzgoje korištene su dvije različite podloge opisane u poglavlju 3.1.3.5., YPG podloga s dodatkom NaCl-a i podloga s glicerolom uz dodatak NaCl-a koja je u literaturi opisana kao „podloga za proizvodnju eritritola“ (Yang i sur., 2022). Tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije biomase mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm, ali i gravimetrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.3.2. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim razmacima te su analizirani na uređaju za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti kako bi se odredili nastali produkti metabolizma. U obje podloge NaCl je dodan u svrhu izazivanja osmotskog stresa kao i u prethodnim uzgojima.

Uzgoj u bioreaktorima proveden je s ciljem proizvodnje šećernih alkohola, primarno eritritola (slike 16 i 17).



**Slika 16.** Uzgoj kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u podlozi za proizvodnju eritritola pri 30 °C, pH vrijednosti podloge od 3 jedinice, okretajima miješala 400 min<sup>-1</sup> i protoku zraka 2 L min<sup>-1</sup>



**Slika 17.** Uzgoj kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a pri 30 °C, pH vrijednosti podloge od 3 jedinice, okretajima miješala 400 min<sup>-1</sup> i protoku zraka 2 L min<sup>-1</sup>

Kvasac *Y. lipolytica* u bioreктору u podlozi za proizvodnju eritritola (slika 16) proizveo je biomasu i eritritol koristeći glicerol kao glavni supstrat. Najveća koncentracija eritritola proizvedena je u 45. satu i iznosila je  $0,40 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijent pretvorbe supstrata u eritritol iznosi  $0,02 \text{ g g}^{-1}$ . Maksimalna koncentracija biomase postignuta je u 26. satu  $3,72 \text{ g L}^{-1}$  uz prinos biomase od  $0,12 \text{ g g}^{-1}$ . Kvasac je potrošio sav glicerol u 45 sati uzgoja, odnosno  $19,63 \text{ g L}^{-1}$ .

U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a (slika 17) kvasac *Y. lipolytica* u bioreктору je proizveo biomasu, eritritol, manitol i maltitol. Najveća koncentracija eritritola proizvedena je u 46. satu i iznosila je  $0,24 \text{ g L}^{-1}$ , što je skoro dva puta manje nego u podlozi za proizvodnju eritritola. Koeficijent pretvorbe supstrata u eritritol iznosi  $0,01 \text{ g g}^{-1}$ , odnosno dva puta manje u odnosu na onaj u podlozi za proizvodnju eritritola. Za razliku od uzgoja u podlozi za proizvodnju eritritola, u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a kvasac je, uz eritritol, proizveo manitol i maltitol. U 46. satu uzgoja, proizvedena je najveća koncentracija manitola u iznosu od  $0,91 \text{ g L}^{-1}$ , a koeficijent pretvorbe je  $Y_{\text{manitol/S}} = 0,07 \text{ g g}^{-1}$ . Najveća koncentracija maltitola od  $0,23 \text{ g L}^{-1}$  postignuta je u 27. satu. Koeficijent konverzije supstrata u manitol je  $0,02 \text{ g g}^{-1}$ . Kvasac je potrošio dosta manje glicerola u ovoj podlozi u odnosu u podlozi za proizvodnju eritritola, točnije potrošio je  $12,14 \text{ g L}^{-1}$  što je  $67,52 \%$  od ukupne količine glicerola. Nakon 27. sata kao supstrat iskoristio je sav proizvedeni maltitol. Maksimalna koncentracija biomase bila je u 27. satu i iznosila je  $8,70 \text{ g L}^{-1}$ , a prinos biomase  $Y_{X/S} = 0,35 \text{ g g}^{-1}$ .

U obje podloge inokulumom je prenesen i etanol u koncentraciji od  $0,02 \text{ g L}^{-1}$ . Kvasac *Y. lipolytica* etanol je proizveo prilikom uzgoja inokuluma u mikroaerofilnim uvjetima, a u bioreктору ga je potrošio kao supstrat. Kvasac *Y. lipolytica* ne može proizvoditi etanol u aerobnim uvjetima kao što su bili u bioreктору prilikom uzgoja, ali može ga koristiti kao izvor ugljika pri koncentracijama do  $3 \%$ . U većim koncentracijama etanol djeluje toksično na stanice kvasca (Gonçalves i sur., 2014).

Egermeier i suradnici (2017) ispitivali su metaboličku prilagodljivost kvasca *Yarrowia lipolytica* prilikom rasta na glicerolu. Pri pH vrijednosti podloge od 3 jedinice u bioreктору kvasac *Y. lipolytica* DSM 21175 proizveo je  $25,40 \text{ g L}^{-1}$  manitola uz koeficijent konverzije supstrata u manitol od  $0,27 \text{ g g}^{-1}$  i  $1,00 \text{ g L}^{-1}$  eritritola uz koeficijent konverzije  $Y_{\text{eritritol/S}} = 0,01 \text{ g g}^{-1}$ . Također, proizvedeno je i  $0,60 \text{ g L}^{-1}$  limunske kiseline, a koeficijent konverzije supstrata u limunsku kiselinu je  $0,01 \text{ g g}^{-1}$ . Proizvedeno je  $20,90 \text{ g L}^{-1}$  biomase, a kao glavni supstrat koristili su čisti glicerol.

Kako je i bilo očekivano, više eritritola proizvedeno je u podlozi za proizvodnju eritritola. Optimalna hranjiva podloga za proizvodnju eritritola sadrži izvor dušika u obliku amonijevog sulfata, amonijevog klorida ili kvašičevog ekstrakta. Osim toga, jedan od najvažnijih spojeva



podloge je kalijev dihidrogenfosfat koji utječe na fiziologiju i metabolizam stanica kvasca, dok prisutnost NaCl-a u podlozi izaziva osmotski stres što potiče proizvodnju šećernih alkohola (Rywińska i sur., 2015).

**Tablica 7.** Pokazatelji uspješnosti uzgoja kvasca *Yarrowia lipolytica* DSM 21175 u „podlozi za proizvodnju eritritola“ i u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a

<b>Podloga</b>	<b>„Podloga za proizvodnju eritritola“</b>	<b>YPG + NaCl</b>
$X_{\max}$ [g L <sup>-1</sup> ]	3,72	8,70
$Y_{X/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,12	0,35
$\gamma$ (eritritol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	0,40	0,24
$\gamma$ (manitol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	/	0,91
$\gamma$ (maltitol) <sub>max</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	/	0,23
$Y_{\text{eritritol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,02	0,01
$Y_{\text{manitol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	/	0,07
$Y_{\text{maltitol}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	/	0,02

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Ne-*Saccharomyces* kvasci *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 mogu rasti i proizvoditi biomasu u podlozi s glicerolom u aerobnim uvjetima.

2. Kvasci *Y. lipolytica* DSM 21175, *C. lyxosophila* JCM 7532, *S. stipitis* JCM 10742 uzgojeni u YPD podlozi i u YPD podlozi s dodatkom natrijevog klorida proizveli su šećerni alkohol eritritol. Najveći prinos eritritola među testiranim kvascima određen je za kvasac *Y. lipolytica* DSM 21175 tijekom uzgoja u YPD podlozi s dodatkom NaCl-a.

3. Dodatak NaCl-a u YPD podlogu povećava prinos eritritola kod kvasca *Y. lipolytica* DSM 21175. U YPD podlozi s NaCl-om proizvedeno je 1,19 g L<sup>-1</sup> eritritola što je za oko 140 % više nego tijekom uzgoja u YPD podlozi bez dodatka NaCl-a ( $\gamma_{\text{eritritol}} = 0,49 \text{ g L}^{-1}$ ). Osim toga, dodatak natrijevog klorida u YPD podlogu utječe na smanjenje prinosa octene kiseline kod kvasca *Y. lipolytica* DSM 21175 za oko 38 % ( $\gamma_{\text{octena kis., YPD}} = 6,17 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{octena kis., YPD+NaCl}} = 3,80 \text{ g L}^{-1}$ ).

4. Kvasci *Y. lipolytica* DSM 21175, *C. lyxosophila* JCM 7532 i *S. stipitis* JCM 10742 tijekom uzgoja u YPG podlozi i u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a proizveli su relativno male koncentracije eritritola ( $\gamma_{\text{eritritol}} = 0,23 - 0,60 \text{ g L}^{-1}$ ).

5. Kvasac *Y. lipolytica* DSM 21175, osim eritritola, u YPG podlozi bez i s dodatkom NaCl-a proizvodi i manitol i maltitol. U YPG podlozi kvasac *Y. lipolytica* DSM 21175 proizvodi 2,23 g L<sup>-1</sup> manitola i 0,51 g L<sup>-1</sup> maltitola. Dodatak NaCl-a u YPG podlogu negativno utječe na prinos manitola, te je postignuta koncentracija manitola gotovo tri puta manja od prinosa u YPG podlozi i iznosi 0,78 g L<sup>-1</sup>. Dodatak NaCl-a nema utjecaj na prinos maltitola ( $\gamma_{\text{maltitol, YPG+NaCl}} = 0,55 \text{ g L}^{-1}$ ).

6. Kvasac *Y. lipolytica* DSM 21175 raste i proizvodi eritritol u „podlozi za proizvodnju eritritola“ i YPG podlozi uz dodatak NaCl-a tijekom šaržnog uzgoja pri pH vrijednosti podloge od 3 jedinice u mikroaerofilnim uvjetima. U „podlozi za proizvodnju eritritola“ proizvedeno je skoro dvostruko više eritritola u odnosu na uzgoj proveden u YPG podlozi s dodatkom NaCl-a te nisu detektirani drugi šećerni alkoholi. U YPG podlozi s dodatkom NaCl-a proizveden je i manitol u koncentraciji od 0,91 g L<sup>-1</sup> te maltitol u koncentraciji od 0,23 g L<sup>-1</sup>.

7. Kako bi se povećali prinosi i optimirala proizvodnja željenog šećernog alkohola tijekom uzgoja na podlogama s glicerolom potrebno je provesti daljnju optimizaciju procesa.

## 6. LITERATURA

Abbasi AR, Liu J, Wang Z, Zhao A, Ying H, Qu L, i sur. (2021) Recent Advances in Producing Sugar Alcohols and Functional Sugars by Engineering *Yarrowia lipolytica*. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 1–9.

Arora R, Sharma NK, Kumar S, Sani RK (2019) Lignocellulosic Ethanol: Feedstocks and Bioprocessing. U: Ray RC, Ramachandran S. (ured.) Bioethanol Production from Food Crops: Sustainable Sources, Interventions and Challenges, Elsevier Science, Amsterdam, str. 165–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6.00009-6>

Bilal M, Xu S, Iqbal HMN, Cheng H (2020) *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Crit Rev Food Sci Nutr* **61**, 535–552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1739000>

Broda M, Yelle DJ, Serwańska K (2022) Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. *Molecules* **27**, 1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>

Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR (2017) Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem Toxicol* **107**, 302–317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>

Darvishi F, Fathi Z, Ariana M, Moradi H (2017) *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochem Eng J* **127**, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.013>

Egermeier M, Russmayer H, Sauer M, Marx H (2017) Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Front Microbiol* **8**, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00049>

Erian AM, Egermeier M, Marx H, Sauer M (2022) Insights into the glycerol transport of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **39**, 323–336. <https://doi.org/10.1002/yea.3702>

Erian AM, Sauer M (2022) Utilizing yeasts for the conversion of renewable feedstocks to sugar alcohols - a review. *Bioresour Technol* **346**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126296>

Fickers P, Cheng H, Lin CSK (2020) Sugar alcohols and organic acids synthesis in *Yarrowia lipolytica*: Where are we? *Microorganisms* **8**, 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040574>

Geijer C, Ledesma-Amaro R, Tomas-Pejo E (2022) Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. *FEMS Yeast Res* **22**, 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab071>

- Ghezelbash GR, Nahvi I, Rabbani M (2012) Study of polyols production by *Yarrowia lipolytica* in batch culture and optimization of growth condition for maximum production. *Jundishapur J Microbiol* **5**, 546–549. <https://doi.org/10.5812/jjm.3524>
- Gonçalves FAG, Colen G, Takahashi JA (2014) *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *Sci World J* **2014**, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
- Guerfali M, Ayadi I, Sassi HE, Belhassen A, Gargouri A, Belghith H (2020) Biodiesel-derived crude glycerol as alternative feedstock for single cell oil production by the oleaginous yeast *Candida viswanathii* Y-E4. *Ind Crops Prod* **145**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112103>
- Jagtap SS, Bedekar AA, Singh V, Jin YS, Rao CV (2021) Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f for production of erythritol from glycerol. *Biotechnol Biofuels* **14**, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02039-0>
- JCM (2023) Microbe division. JCM-Japan Collection of Microorganisms, <https://jcm.brc.riken.jp/en/>. Pristupljeno 21. svibnja 2023.
- Johnson EA, Echavarri-Erasun C (2011) Yeast biotechnology. U: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (ured.) *The Yeast* (Fifth Edition), Elsevier Science, Amsterdam, str. 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Kręgiel D, Pawlikowska E, Antolak H (2017) Non-Conventional Yeasts in Fermentation Processes: Potentialities and Limitations. U: Lucas C, Pais C (ured.) *Old Yeasts - New Questions*, IntechOpen, London, str. 87–117. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70404>
- Kumar M, Sun Y, Rathour R, Pandey A, Thakur IS, Tsang DCW (2020) Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: Opportunities and challenges. *Sci Total Environ* **716**, 1–85. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137116>
- Ledesma-Amaro R, Nicaud JM (2016) *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Prog Lipid Res* **61**, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.001>
- Madzak C (2021) *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: How natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement. *J Fungi* **7**, 1–67. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>

- Mirończuk AM, Biegalska A, Dobrowolski A (2017) Functional overexpression of genes involved in erythritol synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels* **10**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0772-6>
- Onyema VO, Amadi OC, Moneke AN, Agu RC (2023) A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes – West African Natural Yeasts Contribution. *Food Chem Adv* **2**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100162>
- Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* **6**, 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Park YC, Oh EJ, Jo JH, Jin YS, Seo JH (2016) Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Curr Opin Biotechnol* **37**, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.006>
- Park YK, Ledesma-Amaro R (2023) What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends Biotechnol* **41**, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>
- Patra P, Das M, Kundu P, Ghosh A (2021) Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnol Adv* **47**, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>
- Petrovska B, Winkelhausen E, Kuzmanova S (1999) Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Can J Microbiol* **45**, 695–699. <https://doi.org/10.1139/cjm-45-8-695>
- Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res* **15**, 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Rakicka-Pustułka M, Miedzianka J, Jama D, Kawalec S, Liman K, Janek T, i sur. (2021) High value-added products derived from crude glycerol via microbial fermentation using *Yarrowia* clade yeast. *Microb Cell Fact* **20**, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01686-0>
- Rebello S, Abraham A, Madhavan A, Sindhu R, Binod P, Karthika Bahuleyan A, i sur. (2018) Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiol Lett* **365**, 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny222>
- Rywińska A, Juszczak P, Wojtatowicz M, Robak M, Lazar Z, Tomaszewska L, i sur. (2013) Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy* **48**, 148–166. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.11.021>

- Rywińska A, Marcinkiewicz M, Cibis E, Rymowicz W (2015) Optimization of medium composition for erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol* **45**, 515–529. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.940966>
- Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, Mirończuk AM (2018) Recent advances in biological production of erythritol. *Crit Rev Biotechnol* **38**, 620–633. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1380598>
- Soong YHV, Liu N, Yoon S, Lawton C, Xie D (2019) Cellular and metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for bioconversion of hydrophobic substrates into high-value products. *Eng Life Sci* **19**, 423–443. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800147>
- Spagnuolo M, Hussain MS, Gambill L, Blenner M (2018) Alternative substrate metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Front Microbiol* **9**, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01077>
- Su YK, Willis LB, Jeffries TW (2015) Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol Bioeng* **112**, 457–469. <https://doi.org/10.1002/bit.25445>
- Sutherland JB, Cornelison C, Crow SA (2014) *Candida: Yarrowia lipolytica (Candida lipolytica)*. U: Batt CA, Tortorello ML (ured.) *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Elsevier, Amsterdam, str. 374–378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00056-2>
- Tomaszewska L, Rywińska A, Gładkowski W (2012) Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**, 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1145-6>
- Tomaszewska-Hetman L, Rywińska A (2016) Erythritol biosynthesis from glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast: Effect of osmotic pressure. *Chem Pap* **70**, 272–283. <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0201>
- Vivek N, Sindhu R, Madhavan A, Anju AJ, Castro E, Faraco V, i sur. (2017) Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. *Bioresour Technol* **239**, 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.056>
- Yang LB, Zhan XB, Zheng ZY, Wu JR, Gao MJ, Lin CC (2014) A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresour Technol* **151**, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.031>

- Yang S, Pan X, Wang Q, Lv Q, Zhang X, Zhang R, i sur. (2022) Enhancing erythritol production from crude glycerol in a wild-type *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering. *Front Microbiol* **13**, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1054243>
- Yu LP, Wu FQ, Chen GQ (2019) Next-Generation Industrial Biotechnology-Transforming the Current Industrial Biotechnology into Competitive Processes. *Biotechnol J* **14**, 1–41. <https://doi.org/10.1002/biot.201800437>
- Zhang J, Reddy J, Buckland B, Greasham R (2003) Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: Studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnol Bioeng* **82**, 640–652. <https://doi.org/10.1002/bit.10608>
- ZIM (2023) Search. ZIM-Slovenian Collection of Industrial Microorganisms, <https://zim-collection.si/>. Pristupljeno 21. svibnja 2023.
- Zinjarde S, Apte M, Mohite P, Kumar AR (2014) *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnol Adv* **32**, 920–933. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.008>
- Zinjarde SS (2014) Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem* **152**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>
- Żymańczyk-Duda E, Brzezińska-Rodak M, Klimek-Ochab M, Duda M, Zerka A (2017) Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. U: Morata A. i Loira I. (ured.) Yeast - Industrial Application, IntechOpen, London, str. 1–40. <http://doi.org/10.5772/intechopen.70130>

## 7. PRILOZI

**Tablica 8.** Jednadžbe baždarnih pravaca korištenih za određivanje i kvantifikaciju produkata metabolizama kvasaca

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>spoj</b>	<b>jednadžba baždarnog pravca</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
5,080	glukoza	$A = 140381,12 \gamma_{\text{glukoza}} - 157,58$	1,000
5,963	manitol	$A = 140550 \gamma_{\text{manitol}} + 123,3$	0,9999
6,427	ksilitol	$A = 141414,03 \gamma_{\text{ksilitol}} + 799,15$	1,0000
6,564	eritritol	$A = 131066 \gamma_{\text{eritritol}} + 3870,60$	0,9999
6,927	mliječna kiselina	$A = 68594 \gamma_{\text{mliječna kiselina}} - 1912,5$	0,9998
7,292	glicerol	$A = 115438 \gamma_{\text{glicerol}} + 2603,5$	0,9999
7,683	octena kiselina	$A = 68165 \gamma_{\text{octena kiselina}} - 2189,8$	0,9999
10,074	etanol	$A = 484161 \gamma_{\text{etanol}} + 737,97$	0,9999



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja BRANIMIR BURIC 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