

# Utjecaj izvora i koncentracije dušika na rast i proizvode metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

---

**Buovac, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:159:063064>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2024.

Marko Buovac

**UTJECAJ IZVORA I  
KONCENTRACIJE DUŠIKA NA  
RAST I PROIZVODE  
METABOLIZMA KVASCA  
*Kluyveromyces marxianus* NBRC  
1777**

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

Diplomski rad izrađen je u okviru HRZZ projekta IP-2022-10-3075 "Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina" (Biorefinery-NFLRM), voditelj projekta prof. dr. sc. Božidar Šantek.

*Ovim putem posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Vlatki Petravić Tominac što me mentorirala tijekom izrade ovog rada te kroz studij. Također se zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Mariu Novaku na konstruktivnim kritikama i razgovorima tijekom mog rada. Posebice im se zahvaljujem na uloženom vremenu, trudu, prenesenom znanju, konstruktivnim kritikama, strpljivosti, a iznad svega ljudskosti te se nadam da sve što im nisam uspio vratiti istom mjerom da će im nadoknaditi dragi Bog.*

*Također, zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel, izv. prof. dr. sc. Mladenu Pavlečiću, dr. sc. Nenadu Marđetku i laboratorijskom tehničaru Igoru Livadi na pomoći i savjetima tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Hvala i prof. dr. sc. Jasni Mrvčić i dr. sc. Karli Hanousek Čiča na uloženom vremenu i prenesenom teoretskom i praktičnom znanju, koje ću nadam se iskoristiti u budućnosti, a posebno im hvala na susretljivosti i razumijevanju.*

*Želim se još zahvaliti i prof. dr. sc. Aniti Slavici i prof. dr. sc. Božidaru Šanteku, koji su mi zbog svog velikog znanja i odnosa prema meni, ne samo kao studentu, nego i čovjeku davali motivaciju za studiranje.*

*Svima gore navedenima želim puno zdravlja i sreće u životu i uspjeha u radu.*

*Najveća hvala mojoj obitelji koja mi je bila bezrezervna podrška tijekom cijelog školovanja. Hvala i prijateljima koji su dijelili sa mnom lijepe i manje lijepe trenutke.*

*„Nitko neće otparati krpe s novog odijela da je stavi na staro odijelo. Inače će i novo rasparati, a starom neće pristajati krpa s novoga. I nitko ne ulijeva novo vino u stare mješine. Inače će novo vino proderati mješine pa će se i ono proliti i mješine će propasti. Nego, novo vino neka se ulijeva u nove mješine! I nitko pijuć staro ne zaželi novoga. Ta veli se – valja i staro!“*

*[Evandjelje po Luki]*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## UTJECAJ IZVORA I KONCENTRACIJE DUŠIKA NA RAST I PROIZVODE METABOLIZMA

KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Marko Buovac, univ. bacc. ing. biotechn. 0058210796

**Sažetak:** Istražen je utjecaj izvora i koncentracije dušika na kvasac *K. marxianus* NBRC 1777. Uzgojem na triptonu kao jedinom izvoru dušika, najveći prinos biomase ( $1,99 \text{ g L}^{-1}$ ) i koeficijent konverzije supstrata (glukoze) u biomasu ( $0,20 \text{ g g}^{-1}$ ) postignuti su uzgojem na podlozi sastava  $22,73 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  triptona, dok je najveći prinos etanola ( $2,36 \text{ g L}^{-1}$ ) ostvaren uzgojem na podlozi s  $22,73 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $6 \text{ g L}^{-1}$  triptona. Zamjenom dijela triptona amonijevim solima uglavnom su se smanjili prinos biomase i proizvoda metabolizma. Međutim, uzgojem na podlozi s  $45,46 \text{ g L}^{-1}$  glukoze,  $5 \text{ g L}^{-1}$  triptona i  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog hidrogenfosfata i amonijevog sulfata ostvaren je prinos biomase  $2,59 \text{ g L}^{-1}$ . Kukuruzna močevina pokazala se kao najbolji izvor dušika za korišteni mikroorganizam pri istraženim uvjetima, jer je jedino njezinom primjenom radni mikroorganizam skoro potpuno potrošio glukozu, a postignuti su i najveći prinosi etanola. Najviše etanola ( $17,45 \text{ g L}^{-1}$ ) proizvedeno je u podlozi s  $45,46 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $20 \text{ g L}^{-1}$  kukuruzne močevine.

**Ključne riječi:** *Kluyveromyces marxianus*, kukuruzna močevina, amonijeve soli, tripton

**Rad sadrži:** 62 stranice, 19 slika, 6 tablica, 51 literaturni navod, 5 priloga

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

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

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Novak (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac (mentorica)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 25. ožujka 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemistry engineering**  
**Laboratory for Biochemistry engineering, industrial microbiology and beer and malt technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### INFLUENCE OF NITROGEN SOURCE AND CONCENTRATION ON GROWTH AND PRODUCTS OF METABOLISM OF YEAST *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

*Marko Buovac*, univ. bacc. ing. biotechn. 0058210796

**Sažetak:** The influence of the source and concentration of nitrogen on the yeast *K. marxianus* NBRC 1777 was investigated. With tryptone as a sole nitrogen source, the highest biomass yield (1.99 g L<sup>-1</sup>) and the highest conversion coefficient of substrate (glucose) to biomass (0.20 g g<sup>-1</sup>) were achieved by growing on a substrate containing 22.73 g L<sup>-1</sup> of glucose and 7.5 g L<sup>-1</sup> of tryptone, while the highest ethanol yield (2.36 g L<sup>-1</sup>) was achieved by cultivation on medium containing 22.73 g L<sup>-1</sup> of glucose and 6 g L<sup>-1</sup> of tryptone. By replacing part of tryptone with ammonium salts, the yields of biomass and metabolic products mainly decreased. However, growth in medium containing 45.46 g L<sup>-1</sup> glucose, 5 g L<sup>-1</sup> tryptone and 2.5 g L<sup>-1</sup> ammonium hydrogen phosphate and ammonium sulphate resulted in a biomass yield of 2.59 g L<sup>-1</sup>. Corn steep liquor (CSL) proved to be the best nitrogen source for the tested strain under the investigated conditions, since the working microorganism consumed glucose almost completely and the highest ethanol yields were achieved with CSL as the only nitrogen source. The highest ethanol concentration (17.45 g L<sup>-1</sup>) was produced in medium containing 45.46 g L<sup>-1</sup> of glucose and 20 g L<sup>-1</sup> of CSL.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxianus*, corn steep liquor, ammonium salts, tryptone

**Thesis contains:** 62 pages, 19 figures, 6 tables, 51 references, 5 supplements

**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:** Vlatka Petravić Tominac, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Nenad Marđetko, PhD, Senior Scientific Assistant

#### **Rewievers:**

1. Mario Novak, PhD, Associate Professor (president)
2. Vlatka Petravić Tominac, PhD, Full Professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate Professor (member)
4. Jasna Mrvčić, PhD, Full Professor (substitute)

**Thesis defended:** March 25<sup>th</sup>, 2024



## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. NE- <i>Saccharomyces</i> KVASCI .....	3
2.1.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	5
2.1.1.1. Metabolizam ugljika i proizvodi kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	8
2.1.1.2. Metabolizam dušika kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	12
2.2. KUKURUZNA MOČEVINA KAO ODRŽIVI IZVOR DUŠIKA .....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. MATERIJALI .....	18
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	18
3.1.2. Kemikalije .....	18
3.1.3. Kemijski sastav hranjivih podloga .....	19
3.1.3.1. Hranjiva podloga za čuvanje i održavanje kulture kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777.....	19
3.1.3.2. Hranjiva podloge za pripremu inokuluma kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777.....	19
3.1.3.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	19
3.1.4. Uređaji i oprema .....	21
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Čuvanje i održavanje radne kulture kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	22
3.2.2. Priprema inokuluma i propagacija kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	22
3.2.3. Priprema hranjivih podloga .....	23
3.2.3.1. Priprema hranjivih podloga za čuvanje i održavanje kulture kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777.....	23
3.2.3.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj inokuluma i propagaciju kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	23
3.2.3.3. Priprema hranjivih podloga za uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 na različitim izvorima dušika.....	24
3.2.4. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 na različitim izvorima dušika ....	24
3.2.5. Analitičke metode.....	26
3.2.5.1. Određivanje optičke gustoće spektrofotometrijski .....	26
3.2.5.2. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC).....	26
3.2.5.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase.....	27

3.2.6. Proračun pokazatelja uspješnosti provođenja procesa.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE I TRIPTONA.....	31
4.2. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE, TRIPTONU TE RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA AMONIJEVA HIDROGENFOSFATA I AMONIJEVA SULFATA.....	38
4.3. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE I KUKURUZNE MOČEVINE.....	47
5. ZAKLJUČAK.....	56
6. LITERATURA .....	57

# 1. UVOD

Usvajanje ekoloških i još uvijek ekonomski održivih praksi za proizvodnju biogoriva i kemikalija potaknuto je razvojem biorafinerija u posljednjih 30 godina (Baptista i Domingues, 2022). Proizvodnja biogoriva i biokemikalija koristeći mikroorganizme i njihove metaboličke puteve, s pripadajućim enzimima kao biokatalizatorima kemijskih reakcija, zahtjeva manji utrošak energije nego ostali procesi konverzije. Glavni izazov ka komercijalizaciji biogoriva i drugih kemikalija je prijenos mikrobnog procesa iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo, uglavnom zbog činjenice da proizvodni sojevi često ne ispunjavaju zahtjeve komercijalne proizvodnje (Lacerda i sur., 2020). Kvasac je učinkovit proizvođač bioetanola, a većina istraživanja primjenom genetičkih modifikacija provedena je s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*. Nekonvencionalni, ne-*Saccharomyces* kvasci imaju određene karakteristike koje se ne mogu lako postići genetskim manipulacijama, a kao što su na primjer rast na različitim izvorima ugljika (ksiloza, arabinoza, glicerol), tolerancija na etanol, tolerancija na niske pH vrijednosti, termotolerancija i tolerancija na inhibitore (Lacerda i sur., 2020; Dellomonaco i sur., 2010).

Kukuruzna močevina (engl. *corn steep liquor, CSL*) je nusproizvod postupka za izdvajanje škroba iz kukuruza. Sadrži visoke koncentracije organskih tvari i to uglavnom proteina, aminokiselina, enzima, minerala, vitamina, reducirajućih šećera, organskih kiselina i drugih hranjivih tvari. Ako se kao nusproizvod ne koristi već se ispušta u sustav za pročišćavanja otpadnih voda, to značajno povećava opterećenje i troškove. S druge strane, zahvaljujući svom kemijskom sastavu CSL je vrijedna sirovina koja se može ponovno upotrijebiti u biotehnološkoj industriji za dobivanje proizvoda visoke dodane vrijednosti (Zhou i sur., 2022).

Velika specifična brzina rasta, termotolerancija, sposobnost rasta na različitim ugljikohidratima te GRAS status (engl. *Generally Regarded as Safe*) karakteristike su ne-*Saccharomyces* kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Uz navedeno, zbog sposobnosti asimilacije pentozna, *K. marxianus* ima potencijal postati alternativa kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u biorafinerijskim postrojenjima koja koriste obnovljive izvore ugljika poput lignocelulozne biomase (Donzella i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj izvora dušika i koncentracije dušika prvenstveno na rast, a uz to i na proizvode metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. Eksperimenti su provedeni u laboratorijskom mjerilu, a kao izvor ugljika korištena je glukoza pri različitim koncentracijama. Kao izvori dušika korišteni su tripton, kombinacija triptona s amonijevim solima (amonijev hidrogenfosfat i amonijev sulfat) te kukuruzna močevina. Na temelju dobivenih rezultata uspoređeni su parametri uspješnosti vođenja procesa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. NE-*Saccharomyces* KVASCI

Broj opisanih i istraženih vrsta kvasaca raste svake godine, međutim, biotehnoška i industrijska primjena ograničena je na mali broj vrsta koje uglavnom pripadaju vrsti *Saccharomyces cerevisiae* i njezinim bliskim srodnicima (Karim i sur., 2020). Kvasac *S. cerevisiae* je favorizirani radni mikroorganizam zbog svoje dugotrajne upotrebe u tradicionalnim industrijskim fermentacijskim procesima (npr. pivo, vino, jabukovača, sake, destilirana alkoholna pića, pekarski proizvodi i druga fermentirana hrana). Ostali industrijski biotehnoški procesi u kojima se upotrebljava kvasac *S. cerevisiae* su proizvodnja bioetanola, jednostaničnih proteina, krmiva i stočne hrane, industrijskih enzima i metabolita male molekulske mase. Također, do danas je akumulirano veliko znanje o fiziologiji, molekularnoj biologiji i genetici kvasca *S. cerevisiae* (Deparis i sur., 2017; Johnson, 2013a). Međutim, kvasac *S. cerevisiae* ima i neke nedostatke, kao što je nemogućnost korištenja ekonomičnijih i održivijih supstrata poput ksiloze, arabinoze i glicerola). Također, *S. cerevisiae* ne može tolerirati visoke temperature ( $>34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i niske pH vrijednosti medija ( $<3$ ) pa je stoga ograničena njegova primjena u proizvodnji biogoriva druge generacije (Lacerda i sur., 2020). Iako određeni rekombinantni sojevi kvasca *S. cerevisiae* mogu fermentirati pentoze, prethodnim tretmanom biomase nastaju hidrolizati visoke osmolarnosti koji sadrže velike koncentracije inhibitora. Ovi spojevi negativno utječu na proces fermentacije, stoga su potrebni robusni sojevi s visokom otpornošću na stres. Do sada je opisano preko 2000 vrsta kvasca, a neke od njih mogle bi ponuditi rješenje za ova ograničenja zbog svoje visoke tolerancije na uvjete stresa prisutne u reaktoru za bioetanol druge generacije koji se proizvodi iz lignoceluloznih hidrolizata (Marđetko i sur., 2018; Radecka i sur., 2015). Nekonvencionalni (ne-*Saccharomyces*) kvasci, kao što su *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Issatchenkia orientalis* i *Pichia pastoris*, imaju mnoge fiziološke, metaboličke i regulacijske prednosti kojima mogu prevladati ova ograničenja (Lacerda i sur., 2020). U tablici 1 prikazana je usporedba maksimalnih tolerancija na izvore stresa za kvasac *S. cerevisiae* i neke ne-*Saccharomyces* kvasce.

Ne-*Saccharomyces* kvasce nalazimo u askomicetama i bazidiomicetama, a veliki dio njih ima GRAS status, zbog čega imaju dodatni potencijal za industrijsku upotrebu, a neki se i

koriste (Drumonde-Neves i sur., 2021; Singh i Gaur, 2021; Johnson, 2013a,b). U tablici 2 navedeni su neki ne-*Saccharomyces* kvasci od biotehnološkog značaja.

**Tablica 1.** Usporedba maksimalnih tolerancija na izvore stresa između *Saccharomyces cerevisiae* i nekih ne-*Saccharomyces* kvasaca (Lacerda i sur., 2020)

Mikroorganizam	Maksimalne tolerancije na izvore stresa					
	glukoza [% w/v]	c(NaCl) [mol L <sup>-1</sup> ]	Temperatura [°C]	φ(etanol) [% v/v]	γ(5-HMF <sup>a</sup> ) [g L <sup>-1</sup> ]	pH [-]
<i>S. cerevisiae</i>	40	0,4	39	10	3	3
<i>Y. lipolytica</i>	30	2,0	35	5	2	3,5
<i>K. marxianus</i>	40	1,5	52	6	3,84	3,5
<i>P. pastoris</i>	40	1,6	41	6	-	3
<i>I. orientalis</i>	48	0,85	45	10	7	2

<sup>a</sup>5-HMF – 5-hidroksimetil furfural

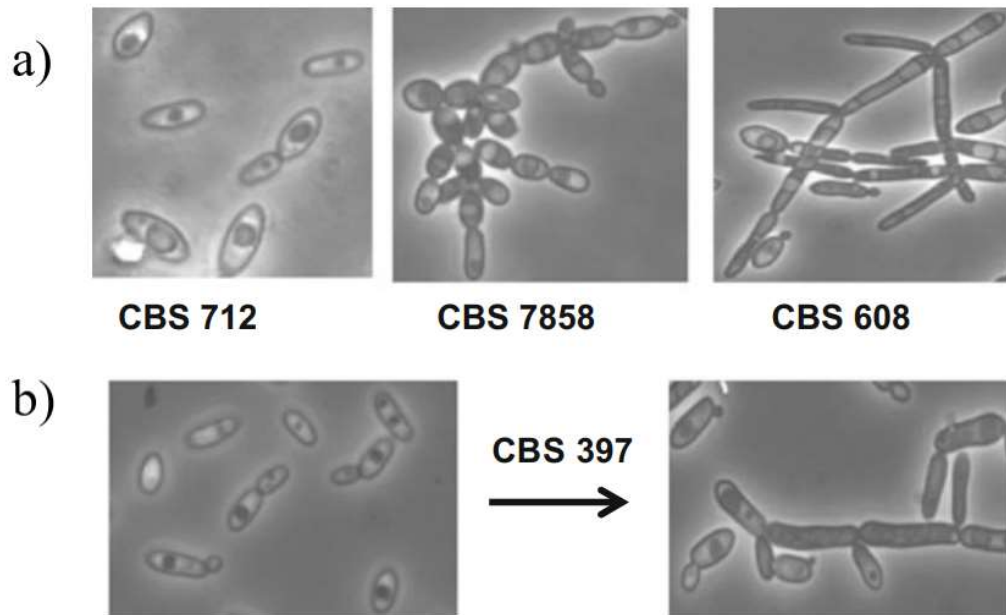
**Tablica 2.** Glavni biotehnološki značajni askomicetni i bazidiomicetni kvasci (Johnson, 2013a,b)

Askomicete	Bazidiomicete
<i>Candida</i> spp.	<i>Cryptococcus</i> spp. (nepatogeni)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Rhodotorula</i> spp.
<i>Hansenula</i> spp.	<i>Rhodospiridium</i> spp.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Trichosporin</i> spp.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Xantophyllomyces dendrorhous</i>
<i>Lipomyces</i> spp.	<i>Phaffia rhodozyma</i>
<i>Pichia stipitis</i>	
<i>Pichia</i> spp.	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
<i>Saccharomycopsis</i> spp.	
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	

### 2.1.1. *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces marxianus* je haploidni, homotalični, termotolerantni kvasac te pripada obitelji kvasaca *Saccharomycetaceae* (Nurcholis i sur., 2020; Mo i sur., 2019). Izoliran je iz širokog spektra prirodnih staništa kao što su fermentirani mliječni proizvodi, kefirna zrnca, otpadne vode iz šećerne industrije, biljke (Karim i sur., 2020). Ovisno o soju kvasca *K. marxianus* i sastavu hranjive podloge može imati različitu morfologiju (pojedinačne stanice, pseudohife i hife). Također, određeni sojevi imaju sposobnost promjene morfologije ovisno o uvjetima u kojima rastu, a što je prikazano na slici 1 (Varela i sur., 2017). *Kluyveromyces marxianus* je blisko srodan kvascu *Kluyveromyces lactis*, koji predstavlja modelni Crabtree-negativni kvasac (Lertwattanasakul i sur., 2015). Oba kvasca mogu asimilirati laktozu, za razliku od većine ostalih kvasaca pa tako i kvasca *S. cerevisiae*. *K. marxianus* ima brojne prednosti u odnosu na *K. lactis* i/ili *S. cerevisiae* (Nurcholis i sur., 2020). U tablici 3 prikazane su usporedbe važnijih fizioloških karakteristika između *K. marxianus*, *K. lactis* i *S. cerevisiae*.

Kvasac *K. marxianus* ima respiracijsko-fermentativni tip metabolizma, tj. proizvodi energiju putem oksidativne fosforilacije nakon citratnog ciklusa te fermentacijom ugljikohidrata u etanol. Pripada skupini Crabtree-negativnih kvasaca (preferabilna respiracija ispred fermentacije). Takav tip metabolizma rezultira velikom specifičnom brzinom rasta (do sada najveća od opisanih za kvasce) što može biti koristan fenotip za industrijsku proizvodnju onih spojeva čije je nastajanje vezano uz rast biomase (Karim i sur., 2020; Fonseca i sur., 2007). Budući da se tradicionalno nalazi u fermentiranim mliječnim proizvodima kao što su sir i kefir, *K. marxianus* je dobio QPS status (engl. *Qualified Presumption of Safety*) u EU, odnosno GRAS status u SAD-u, što definira ovaj kvasac sigurnim za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Varela i sur., 2019). Pokazao se kao dobar producent enzima poput  $\beta$ -galaktozidaze,  $\beta$ -glukozidaze, inulinaza, lipaza i pektinaza (Bilal i sur., 2022). Osim navedenog, *K. marxianus* proizvodi glicerol, octenu kiselinu, etil-acetat i šećerne alkohole (ksilitol i arabitol) (Pentjuss i sur., 2017).



**Slika 1.** Rast tri različita soja kvasca *K. marxianus* na identičnoj hranjivoj podlozi (Varela i sur., 2017):

- a) neki sojevi kvasca *K. marxianus* mogu rasti kao pojedinačne stanice (soj CBS 712), pseudohife (soj CBS 7858) i hife (soj CBS 608)
- b) neki sojevi kvasca *K. marxianus* mijenjaju morfologiju pri različitim uvjetima rasta, kao npr. soj CBS 397



**Tablica 3.** Usporedba važnijih fizioloških karakteristika *K. marxianus* s karakteristikama modelnih kvasaca *K. lactis* i *S. cerevisiae* (Karim i sur., 2020)

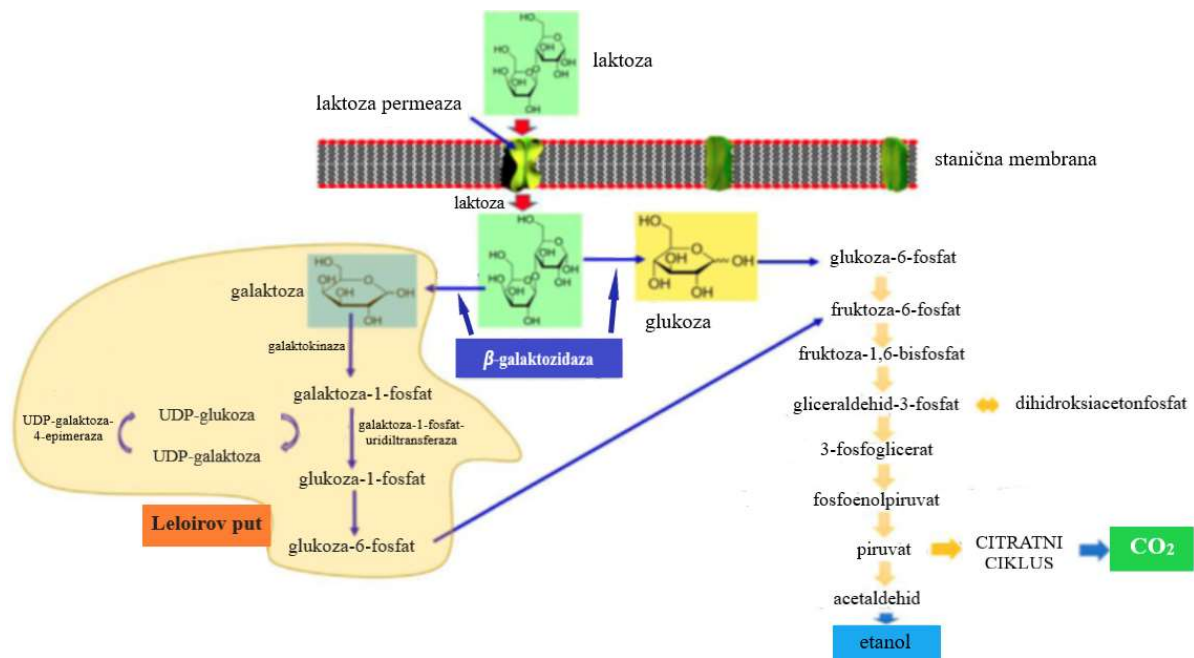
Karakteristike	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>K. marxianus</i>
Energetski metabolizam	Alkoholna fermentacija (Crabtree-pozitivan)	Respiracijski metabolizam (Crabtree-negativan)	Respiracijsko-fermentativni; respiracijski; fermentativni (Crabtree-negativan)
Generacijsko vrijeme	80 min	80 min	70 min
Metabolički put iskorištenja glukoze	Uglavnom glikoliza	Pentoza fosfatni put i glikoliza	Embden-Meyerhof-Pamasov put; Preferirano stvaranje energije, bilo izravnim metabolizmom putem citratnog ciklusa i oksidativne fosforilacije ili fermentacijom u etanol; Sposobnost istovremene fermentacije i respiracije
Osjetljivost na represiju glukozom	Velika osjetljivost	Mala osjetljivost	Niska osjetljivost jer se fermentacijski i oksidativni metabolizam mogu odvijati istovremeno, ali varijabilno ovisno o soju
Struktura genoma i ploiditet	Haploid, diploid ili poliploid	Uglavnom haploid koji može formirati nestabilni diploid (diploid se ubrzo vraća u haploidnu fazu)	Manje poznato, ali su zapaženi haploid, diploid i triploid
Homologna rekombinacija	Odlična	Dobra	Uglavnom slaba, iako neka istraživanja navode da je dobra
Prednosti fenotipa	Visoka proizvodnja bioetanol; Visoki kapacitet homogene rekombinacije; Odlično poznata fiziologija i genomika; Povoljan za napredne alate sintetičke biologije	Sposobnost rasta na laktozi; Visoka sposobnost sekrecije proteina	Sposobnost rasta na širokom rasponu ugljikohidrata; Velika specifična brzina rasta; Termotolerantnost; Visoka proizvodnja etil acetata; Sposobnost sekrecije proteina

### 2.1.1.1. Metabolizam ugljika i proizvodi kvasca *Kluyveromyces marxianus*

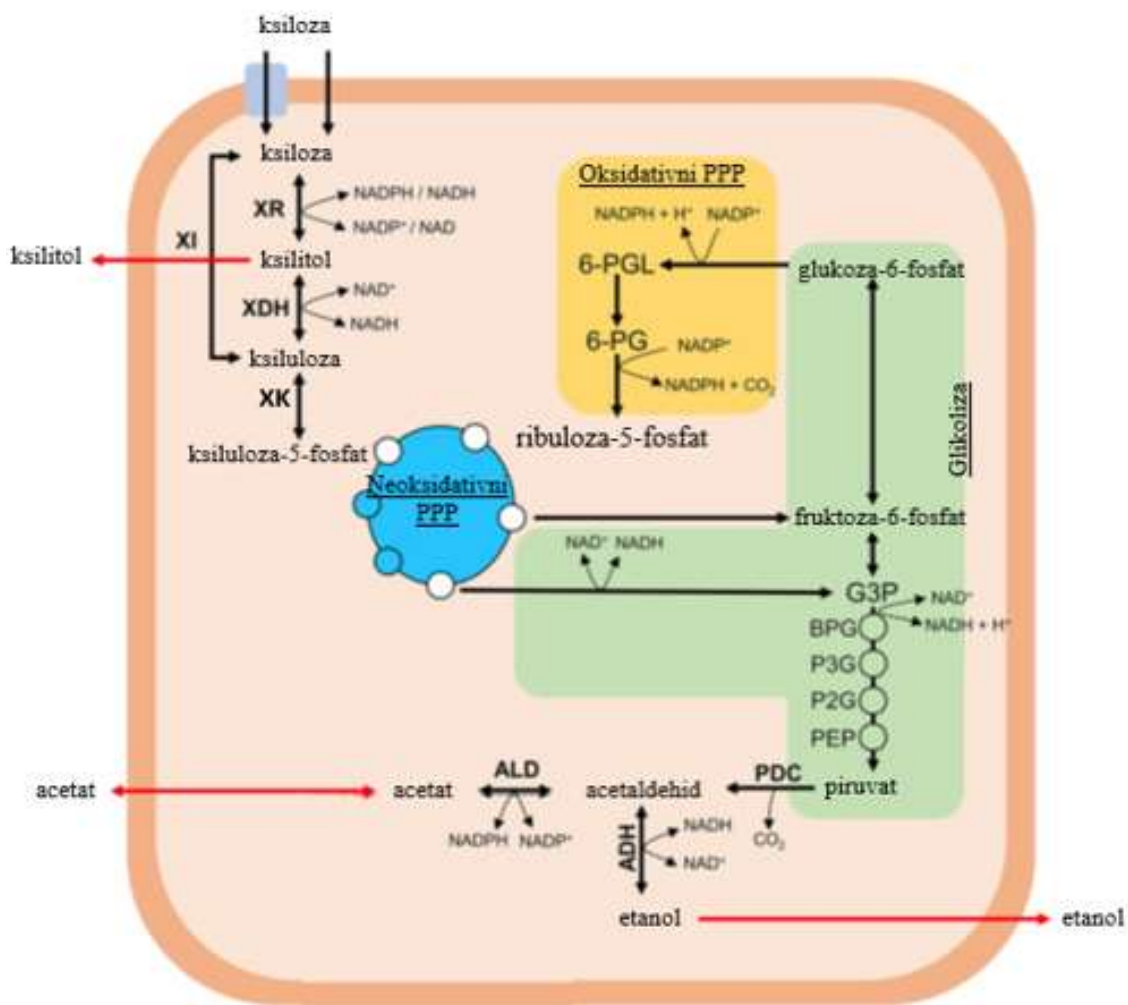
Biotehnološki vrlo zanimljivo svojstvo kvasca *K. marxianus* je sposobnost asimilacije laktoze i njezinog korištenja kao izvora ugljika, po čemu se razlikuje od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Većina kvasaca vrste *K. marxianus* svrstava se u laktoza-pozitivne kvasce i ima genski par LAC12-LAC4. LAC12 kodira permeazu laktoze koja je neophodna za unos laktoze u stanicu, dok LAC4 kodira  $\beta$ -galaktozidazu, koja hidrolizira laktozu na galaktozu i glukozu. Zbog polimorfizma u genu LAC12 učinkovitost asimilacije laktoze varijabilna je ovisno o soju kvasca *K. marxianus* (Karim i sur., 2020). Enzimi  $\beta$ -galaktozidaze su među najčešće korištenima u prehrambenoj industriji. Kataliziranjem hidrolize laktoze na glukozu i galaktozu, enzim laktaza se koristi za obradu sirutke i mlijeka kako bi se smanjila koncentracija laktoze, što je osobito korisno u osoba koje imaju intoleranciju na laktozu (Bilal i sur., 2022). U industrijskom mjerilu, proizvodnja  $\beta$ -galaktozidaza provodi se korištenjem mikroorganizama s GRAS statusom. Od kvasaca su to vrste *Kluyveromyces marxians*, *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces fragilis*, a uz njih se koriste plijesni *Aspergillus niger* i *Aspergillus oryzae*. Izdvajanje i pročišćavanje  $\beta$ -galaktozidaze iz sirovog ekstrakta može se postići membranskim tehnikama, ionskom izmjenom, gel-permeacijskom kromatografijom, taloženjem cinkovim kloridom, protamin-sulfatom i amonijevim sulfatom (Nath i sur., 2014). Sirutka je i jeftina sirovina za proizvodnju bioetanola, a sadrži oko 4,8% laktoze (Ariyanti i sur., 2014). Na slici 2 prikazan je transport i metabolizam laktoze do etanola kod kvasca *K. marxianus*.

Zbog visoke specifične brzine rasta, sposobnosti asimilacije širokog raspona ugljikohidrata (npr. glukoze, galaktoze, ksiloze, arabinoze, laktoze, inulina), termotolerancije (do 52 °C), otpornosti na toksine (hidroksimetilfurfural i octena kiselina), širok raspon pH vrijednosti (pH 2,5 – 9), lučenja hidrolitičkih enzima i visokog prinosa etanola pri povišenim temperaturama, *K. marxianus* ima veliki potencijal za proizvodnju bioetanola iz obnovljivih izvora sirovina kao što su lignocelulozne (Ha-Tran i sur., 2020; Radecka i sur., 2015). Predobradom lignoceluloznih sirovina između ostalog nastaje ksiloza koju *K. marxianus* može metabolizirati. Međutim, većina kvasaca koji asimiliraju ksilozu, uključujući *K. marxianus*, ima metabolički put ksiloze u kojem ksiloza reduktaza preferira NADPH naspram NADH kao koenzim, dok ksilitol dehidrogenaza preferira NAD<sup>+</sup>. Stoga fermentacija ksiloze u etanol kod kvasaca predstavlja izazov zbog redoks neravnoteže u uvjetima ograničenja kisikom (Leonel i sur., 2021). Na slici 3 prikazan je metabolizam ksiloze kod kvasaca. Poboljšanje metabolizma ksiloze, kako bi se dobili visoki prinosi i produktivnost etanola, moguće je postići metodama

metaboličkog inženjerstva. Različite kombinacije ksiloza reduktaze i ksilitol dehidrogenaze iz različitih mikroorganizama eksprimirane su u kvascu *K. marxianus* NBRC 1777. Najboljim se pokazao soj nazvan YZJ020 kod kojeg je eksprimirana ksiloza reduktaza iz plijesni *Neurospora crassa* i ksilitol dehidrogenaza iz kvasca *Scheffersomyces stipitis* te dvije kopije gena *XYL3* za ksilulokinazu iz kvasca *K. marxianus*. Oba heterologno eksprimirana enzima preferirali su NADPH kao koenzim. Osim toga, sposobnost fermentacije ksiloze i redoks-ravnoteža rekombinantnih sojeva značajno su poboljšani povećanom ekspresijom nekoliko nizvodnih gena, uključujući gene za pentoza-fosfatni put, gen za alkohol dehidrogenazu i gen za piruvat dekarboksilazu (Ochoa-Chacón i sur., 2021).



**Slika 2.** Transport i metabolizam laktoze do etanola kod kvasca *K. marxianus* (Bilal i sur., 2022)



<b>XI</b> ksiloza izomeraza	<b>G3P</b> gliceraldehid-3-fosfat
<b>XR</b> ksiloza reduktaza	<b>BPG</b> 2,3-bisfosfoglicerat
<b>XDH</b> ksilitol dehidrogenaza	<b>P3G</b> 3-fosfoglicerat
<b>XK</b> ksiluloza kinaza	<b>P2G</b> 2-fosfoglicerat
<b>PDC</b> piruvat dekarboksilaza	<b>PEP</b> fosfoenolpiruvat
<b>ADH</b> alkohol dihidrogenaza	<b>6-PGL</b> 6-fosfoglukonolakton
<b>ALD</b> aldehyd dihidrogenaza	<b>6-PG</b> 6-fosfoglukonat
<b>PPP</b> pentoza-fosfatni put	

Slika 3. Matabolizam ksiloze u kvasaca (Ochoa-Chacón i sur., 2021)

Svojstva kvasca *K. marxianus* kao što su termotolerancija i učinkovita proizvodnja etanola doveli su do razvoja fermentacije pri visokim temperaturama (engl. *high-temperature fermentation, HTF*). Prednosti takve fermentacije uključuju sprječavanje mikrobne kontaminacije, smanjenje troškova za hlađenje i enzimsku hidrolizu te mogućnost procesa simultane saharifikacije i fermentacije (engl. *simultaneous saccharification and fermentation, SSF*), a HTF omogućuje i koncentriranje etanola destilacijom pri niskim tlakom (Nurcholis i sur., 2020). Simultana saharifikacija i fermentacija sprječava inhibiciju hidrolitičkih enzima njihovim krajnjim produktima budući da se isti istovremeno troše mikrobnom fermentacijom (Sharma i sur., 2021).

*K. marxianus* može rasti na nekoliko polisaharida uključujući pektin i inulin. Ekstracelularnim enzimima inulinazama i pektinazama polimeri se hidroliziraju u monomere koje kvasac može metabolizirati. Rast *K. marxianus* na nusproizvodima bogatim saharozom i inulinom odvija se zahvaljujući aktivnosti ekstracelularnih enzima (Karim i sur., 2020; Trapala i sur., 2020).

Inulinaza je u novije vrijeme postala interesantna jer se široko koristi za hidrolizu inulina koji se nalazi u sastavu jeruzalemske artičoke, korijena cikorije i gomolja dalije te se može iskoristiti za proizvodnju bioetanola, fruktoze i fruktooligosaharida, koji su važni proizvodi prehrambene i farmaceutske industrije. Producenti enzima inulinaze su kvasci *Cryptococcus aureus* i *Kluyveromyces marxianus*, plijesni *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. te bakterije rodova *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Xanthomonas* i *Pseudomonas*. Međutim, plijesan *A. niger* i kvasac *K. marxianus* opisani su kao radni mikroorganizmi s najviše potencijala za proizvodnju inulinaze. Pritom kvasac *K. marxianus* ima najveću sposobnost proizvodnje inulinaze uz komercijalno prihvatljive prinose (Bilal i sur., 2022) te se najveći prinosi ovog enzima postižu na temperaturama između 37 i 42 °C, što odgovara optimalnoj temperaturi rasta ovog kvasca (Karim i sur., 2020).

Pektinaze hidroliziraju pektine, heteropolisaharide koji čine glavne strukturne elemente stijenki biljnih stanica, stoga su pektinaze našle svoju primjenu u proizvodnji sokova i vina. Ove enzime uglavnom proizvode biljke i različiti mikroorganizmi uključujući bakterije, kvasce i plijesni. Među njima su pektinaze kvasca posljednje vrijeme od velikog interesa. Zahvaljujući uvjetima rasta i genetičkim svojstvima, pektinolitički kvasci mogu proizvoditi različite vrste enzima. Uvelike je istraživana efekt temperature, pH vrijednosti i supstrata na kvasce vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*, *Torulopsis kefir* i *Kluyveromyces marxianus* pri čemu je promatran utjecaj na proizvodnju pektinolitičkih enzima i to

poligalakturonaze (PG), pektinesteraze (PE), pektin lijaze (PL) i pektat lijaze (PaL) (Bilal i sur., 2022).

Proizvodnja spojeva arome putem biotehnoloških procesa ima značajnu ulogu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i kemijskoj industriji zbog sve veće potražnje za prirodnim dodacima hrani i drugim proizvodima biološkog podrijetla. Aromatski alkoholi poput 2-feniletanola (2-PE) i 2-feniletil acetata (2-PEA), koji su nositelji mirisa i okus ruže koriste se u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Kvasac *K. marxianus* posjeduje veliki potencijal za proizvodnju različitih spojeva arome kao što su 2-feniletanol, alkoholi, furanoni, voćni esteri, ketoni, karboksilne kiseline i aromatski ugljikovodici (Karim i sur., 2020).

*K. marxianus* ima i probiotička svojstva kao što su protuupalni kapacitet otpornost na žučne kiseline, sposobnost preživljavanja prolaska kroz gastrointestinalni trakt i dobro raste na različitim podlogama (Romanin i sur., 2016).

#### 2.1.1.2. Metabolizam dušika kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Stanice kvasca prepoznaju vrstu i dostupnost dušikovih spojeva te aktivno prilagođavaju transkripciju, metabolizam i biosintezu tako da ih usklade s uvjetima u kojima se nalaze. Broach (2012) opisuje kontrolu rasta ovisnu o izvorima dušika. U uvjetima limitacije dušikom, rast stanica usporava primarno zbog smanjenja biogeneze ribosoma i translacije, što dovodi do produljenja G1 faze staničnog ciklusa. U ekstremnim slučajevima nedostatka dušika, stanice prestaju rasti čak i ako su izvori drugih biogenih elemenata u suvišku te ulaze u stanje mirovanja specifično za manjak dušika. Za razliku od auksotrofnih stanica, koje ne mogu rasti na podlozi bez određenih aminokiselina, stanice u stanju mirovanja zadržavaju vijabilnost dulje vrijeme potiskujući katabolizam, čime se smanjuje i potrošnja glukoze.

Katabolička represija izvorom dušika (engl. *nitrogen catabolite repression, NCR*) također je opisana u literaturi (Broach, 2012). Dok stanice kvasca kao jedini izvor dušika mogu koristiti razne spojeve, vidljiva je hijerarhijska preferencija za izvore dušika. Većina laboratorijskih sojeva kvasaca preferira glutamin ili amonijak, ali će koristiti i druge izvore dušika, iako uz smanjenu brzinu rasta. Štoviše, kod kvasaca je opisana katabolička represija dušikom, pri kojoj preferirani izvori dušika potiskuju ekspresiju gena potrebnih za unos i katabolizam manje preferiranih izvora dušika (Broach, 2012).

Metabolizam dušika najviše je istraživana na kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, a *Kluyveromyces marxianus* ima s njim mnoge sličnosti, a u istraživanju koje su proveli Rollero i sur. (2019) navedene su neke od razlika. Transport amonijevih iona u stanice kvasca *K. marxianus* značajno je sporiji nego kod *S. cerevisiae*, budući da *K. marxianus* posjeduje samo jedan gen koji kodira za transporter amonijevih iona, dok *S. cerevisiae* posjeduje tri transportera. Iako nema dostupnih kinetičkih podataka za kvasac *K. marxianus*, prisutnost samo jednog transportera, koji vjerojatno ima nizak afinitet za amonijeve ione može objasniti njihov sporiji transport u stanicu. S druge strane, *K. marxianus* pokazuje veću potrošnju arginina tijekom ranih faza fermentacije što je u skladu s većom ekspresijom gena koji kodira za Can1p transporter u toj fazi rasta. Rollero i sur. (2019) su postavili hipotezu da je to kompenzacija za slab ulazak amonijevih iona u stanicu i osigurava dovoljan ulaz dušika u stanicu kvasca *K. marxianus*. Gen koji kodira opću aminokiselinsku permeazu Gap1p eksprimira se jednako kod oba kvasca, što sugerira da se razlike specifične za vrstu pojavljuju na razini pojedinačnih aminokiselina. *K. marxianus* sporije metabolizira metionin nego *S. cerevisiae*, osobito u ranim fazama fermentacije. Gen UGA4, koji kodira transport  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline (engl. *gamma-aminobutyric acid*, *GABA*), pojačano je reguliran u kvascu *K. marxianus* te ovaj kvasac može potrošiti više GABA od kvasca *S. cerevisiae*, osobito na kraju faze rasta. Kao što je već primijećeno kod *S. cerevisiae*, *K. marxianus* također samo djelomično upotrebljava većinu egzogenih aminokiselina za izravnu ugradnju u proteine, neovisno o njihovoj dostupnosti. Stoga je značajan katabolizam asimiliranih dušikovih spojeva popraćen *de novo* sintezom proteinogenih aminokiselina. Čak i ako se čini da ovaj ciklus razgradnje/ponovne izgradnje aminokiselina nije energetski povoljan, mogu se pretpostaviti određene prednosti. Izravna ugradnja aminokiselina u proteine zahtijevala bi vrlo strogu regulaciju, što bi bilo energetski neisplativije za kvasce od kontinuiranog održavanja *de novo* biosinteze aminokiselina.

Rezultati koje su objavili Rollero i sur. (2019) ukazuju da se sudbina svake pojedine aminokiseline razlikuje u kvascima *S. cerevisiae* i *K. marxianus*. Ovaj fenomen može se ilustrirati primjerom egzogenog arginina u *K. marxianus*. Kako je ranije utvrđeno za kvasac *S. cerevisiae*, arginin u proteinima kvasca *K. marxianus* također uglavnom potječe iz okoline stanice tj. hranjive podloge i uglavnom je egzogenog podrijetla. Ipak, egzogeno podrijetlo arginina u *K. marxianus* manje je nego kod kvasca *S. cerevisiae* (tj. 70 % u *K. marxianus* te >90 % za *S. cerevisiae*) iako je ukupna potrošnja arginina veća. To sugerira da *K. marxianus* može koristiti arginin za *de novo* sintezu aminokiselina i/ili ga pohraniti u vakuoli tijekom ranih faza fermentacije i kasnije ga može ponovno mobilizirati. Ova posljednja hipoteza je poduprta

činjenicom da je većina gena koji kodiraju vakuolarne permeaze za aminokiseline bila jače eksprimirana u *K. marxianus*, a slabije eksprimirana ili nije bilo promjene u *S. cerevisiae*. Zanimljivo je da je *de novo* sinteza arginina također bila veća u *K. marxianus* tijekom ranih faza fermentacije. Kod *S. cerevisiae*, citoplazmatski arginin vrši negativnu kontrolu nad genima ARG1/3/4/5/6/8 koji su odgovorni za biosintezu arginina, dok je prema rezultatima Rollero i sur. (2019) ova regulacija drugačija kod *K. marxianus*.

Metabolizam leucina i valina sličan je kod kvasaca *S. cerevisiae* i *K. marxianus*. Leucin je gotovo u potpunosti usmjeren u sintezu proteina, vjerojatno zato što njegov katabolizam rezultira stvaranjem  $\alpha$ -ketoizokaproata, koji se ne može dalje metabolizirati ili konvertirati u druge  $\alpha$ -ketokiseline. SPS put detektira dostupnost aminokiselina u okolini i regulira unos aminokiselina u stanicu (Ljungdahl i Daignan-Fornier, 2012; Ljungdahl, 2009). Geni koji kodiraju dva specifična prijenosnika leucina, BAP2 i BAP3, pod kontrolom su SPS-a i aktiviraju se čim se leucin detektira u podlozi (Rollero i sur., 2019). Egzogeni valin se samo djelomično izravno ugrađuje u biomasu i kod *K. marxianus* i kod *S. cerevisiae*, budući da se katabolizmom ove aminokiseline osiguravaju prekursori za druge biosintetske puteve. U kvascu *S. cerevisiae* se izrazito mali dio glutamina izravno integrira u biomasu, što je u skladu s njegovom ulogom ključnog intermedijera središnjeg metabolizma dušika i konverzijom u glutamat, a zatim u  $\alpha$ -ketoglutarat, preko kojega se dušik može preraspodijeliti u druge aminokiseline (Rollero i sur., 2019).



## 2.2. KUKURUZNA MOČEVINA KAO ODRŽIVI IZVOR DUŠIKA

Urod kukuruza u svijetu iznosi više od 1 milijarde tona svake godine, što čini oko 35 % ukupnog svjetskog prinosa žitarica. Povećanje iskorištenja sirovine i sekundarnih proizvoda njene prerade može uvelike doprinijeti učinkovitijem i održivom gospodarenju kukuruza kao resursa (Zhou i sur., 2022). Kukuruzna močevina (engl. *corn steep liquor*, *CSL*) je sekundarni proizvod dobiven tijekom procesa ekstrakcije škroba iz kukuruza. Zrna kukuruza podvrgavaju se procesu namakanja (engl. *steeping*) u kontroliranim uvjetima pri čemu se omekšavaju i razgrađuju, što olakšava kasnije mljevenje (Wahjudi i sur., 2023). Azizi-Shotorkhoft i sur. (2016) navode primjer proizvodnje kukuruzne močevine pri kojoj je temperatura tople vode tijekom 48 sati močenja kukuruza iznosila 52 °C pri čemu su u vodi bile prisutne male količine otopljenog sumporova(IV) oksida. Voda preostala nakon namakanja koncentrirana je uparavanjem tako da je dobivena kukuruzna močevina sadržavala 45 – 55 % (w/w) suhe tvari. Sumporov(IV) oksid koristi se za cijepanje disulfidnih veza proteina i za razgradnju proteinske matrice endosperma kukuruza kako bi se olakšalo odvajanje škroba od netopljivih proteina (Wahjudi i sur., 2023; Jiao i sur., 2022; Azizi-Shotorkhoft i sur., 2016).

Zhou i sur. (2022) navode da CSL sadrži 40 – 50 % (w/w) otopljene čvrste tvari među kojima prevladavaju različite aminokiseline i reducirajući šećeri. Wahjudi i sur. (2023) ističu biotehnoški potencijal kukuruzne močevine zbog njezine niske cijene i sastava povoljnog za formuliranje hranjivih podloga za uzgoj mikroorganizama obzirom da je pored aminokiselina i reducirajućih šećera bogat mineralima, vitaminima, organskim kiselinama, enzimima i raznim kemijskim elementima (Wahjudi i sur., 2023).

Zbog viška sulfita, većina tvornica ne može u potpunosti iskoristiti CSL te ga tretiraju kao otpadnu vodu i ispuštaju u okoliš, čime se istodobno rasipaju resursi i onečišćuje okoliš. CSL se može promatrati kao kisela otpadna voda koja sadrži visoke koncentracije organskih tvari te je njezino pročišćavanje skupo i zahtjevno. Kružno gospodarenje kukuruznom močevinom smanjuje troškove i povećava vrijednost prerade kukuruza, ali sastav CSL može jako varirati ovisno o sirovini, procesu dobivanja i sezoni (Zhou i sur., 2022; Azizi-Shotorkhoft i sur., 2016). Trenutno je većina kukuruznih močevina dostupnih na tržištu standardizirana prema uobičajenim parametrima kontrole kvalitete, kao što su suha tvar (>40 %), sirovi proteini (>40 %), sulfiti (<0,3 %) i kiselost (<14 %) (Gao i sur., 2011). Azizi-Shotorkhoft i sur. (2016) navode primjer CSL koji sadrži 520 g suhe tvari/kg. Pritom je prisutno 899 g organske tvari/kg s.tv., 420 g sirovih proteina/kg s.tv., 365 g topljivih proteina/kg s.tv., 467 g slobodnih

ugljikohidrata/kg s.tv., 148 g škroba/kg s.tv., 200 g mliječne kiseline/kg s.tv. te 3,87 g sumpora/kg s.tv. uz pH vrijednost 3,86.

CSL se obično koristi kao dodatak stočnoj hrani te u biotehnologiji kao jeftin izvor dušika, ugljika ili vitamina u proizvodnji glutamata, antibiotika, mliječne kiseline, hijaluronske kiseline i drugih biotehnoloških proizvoda (Wahjudi i sur., 2023; Zhou i sur., 2022). Najistaknutiji primjer mikrobnog bioprocasa s kukuruznom močevinom u industrijskom mjerilu je proizvodnja antibiotika pomoću plijesni *Penicillium chrysogenum*. CSL je 1940-ih godina dodan prvi put te je povećao produktivnost procesa za oko 20 % (Hofer i sur., 2018).

Tan i sur. (2016) razmatrali su mogućnosti biotehnološke primjene CSL mjesto skupljeg kvašćevog ekstrakta za proizvodnju jantarne kiseline pomoću bakterije *Actinobacillus succinogenes*. Udio dušika u kukuruznoj močevini usporediv je s onim u kvašćevom ekstraktu, tj. imaju slične udjele ukupnog dušika i aminodušika. Ukupni aminodušik karakteriziraju mali peptidni lanci (manje od tri aminokiseline), čijim se metabolizmom troši malo energije za sintezu proteina neophodnih za rast mikroorganizama. Za usporedbu, ukupni dušik, izražen kao postotak u suhoj tvari kvašćevog ekstrakta iznosi 10 – 11,8 %, a u CSL-u 7,7 – 8,2 %. K tome je udio amino dušika u kvašćevom ekstraktu 4,5 – 5,8 %, a u CSL-u 2,9 – 3,3 %. Prednost kukuruzne močevine naspram kvašćevog ekstrakta kao izvora dušika u biotehnološkoj proizvodnji je pet puta manja cijena (200 \$/toni suhe tvari u odnosu na 1000 \$/toni suhe tvari) (Tan i sur., 2016).

CSL bi se mogao koristiti kao zamjena za skupi kvašćev ekstrakt kao izvor organskog dušika i vitamina u proizvodnji limunske kiseline pomoću kvasca *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b. CSL stimulira potrošnju supstrata i sintezu limunske kiseline. Na glukozu kao izvoru ugljika je umjesto kvašćevog ekstrakta korištena kukuruzna močevina te je time postignuto povećanje prinosa limunske kiseline od 1,24 puta (Liu i sur., 2015). Zamjena kvašćevog ekstrakta kukuruznom močevinom radi ekonomičnije proizvodnje jantarne kiseline pomoću bakterije *Actinobacillus succinogenes* usporediva je po prinosu proizvoda. Međutim, u odnosu na kvašćev ekstrakt, povećane su koncentracije mravlje i octene kiseline, koje otežavaju izdvajanje proizvoda (Tan i sur., 2016). U industrijskoj proizvodnji organskih kiselina, mliječne bakterije, producenti mliječne kiseline, poznate su po specifičnim nutritivnim zahtjevima. Zbog kompleksnosti medija za njihov uzgoj oko 30 % ukupnih troškova procesa otpada na cijenu hranjive podloge. Proizvodnja mliječne kiseline visoke čistoće putem fermentacije bakterijama

mliječne kiseline s CSL-om kao ekonomičnom i alternativnom sirovinom ima veliki potencijal za prijenos u industrijsko mjerilo (Zhou i sur., 2022).

Visoka produktivnost mliječne kiseline šaržnim uzgojem s pritokom supstrata pomoću *Lactobacillus acidophilus* na obrađenom agroindustrijskom otpadu (CSL i bagasa kasave) obećava jeftiniju i održivu proizvodnju mliječne kiseline, ali su prethodno potrebna istraživanja u većem mjerilu i rješavanje problema izdvajanja i pročišćavanja proizvoda (Macedo i sur., 2020). Kukuruzna močevina korištena je i za proizvodnju manitola pomoću *Lactobacillus intermedius*, proizvodnju etanola pomoću sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ili vrsta *Clostridium* te *Zymomonas mobilis* i proizvodnju butanola pomoću *Clostridium beijerinckii* i *Clostridium acetobutylicum* (Risso i sur., 2020).

Biosurfaktanti ekstrahirani iz CSL-a mogu se koristiti u proizvodnji mliječnih proizvoda. Njihovim dodatkom u jogurt može se potaknuti rast probiotičke bakterije *Lactobacillus casei*. Fitinska kiselina, također poznata kao inozitol heksafosfat, može se vezati s ionima kalcija u kalcijev fitat, koji ima vrlo dobar terapijski učinak na neke probavne teškoće i rahitis. Ekstrakcija biljnog kalcija iz CSL-a ima jednostavan, kratak i jeftin postupak te je tehnologija za ekstrakciju kalcijevog fitata iz kukuruzne močevine relativno dobro razrađena (Jiao i sur., 2022).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Za potrebe izrade diplomskog rada korišten je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Radna kultura čuvana je pri 4 °C na čvrstoj kompleksnoj YPD podlozi (engl. *Yeast Extract-Peptide-Dextrose*), u Petrijevim zdjelicama.

##### 3.1.2. Kemikalije

U tablici 4 i 5 navedene su korištene kemikalije za izradu diplomskog rada, njihov stupanj čistoće te proizvođač istih.

**Tablica 4.** Stupanj čistoće i naziv proizvođača kemikalija korištenih za pripremu hranjivih podloga tijekom izrade diplomskog rada

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
glukoza monohidrat	≥99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kukuruzna močevina (CSL)*	45 % suhe tvari (sirovi proteini 32 % od s.tv.)	Dynamite Baits, Engleska
tripton	za upotrebe u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
kvašičev ekstrakt	za upotrebe u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
agar	za upotrebe u biotehnologiji	Biolife, Italija
amonijev hidrogenfosfat	≥99 %	Honeywell, SAD
amonijev sulfat	≥99 %	Honeywell, SAD

\* Ostali sastojci CSL [% u suhoj tvari]: sirove masti 0,74 %, sirova vlakna 0,50 %, sirovi pepeo 20 %, fosfor 3,08 %, kalcij 0,04 %, natrij 0,75 %.

**Tablica 5.** Stupanj čistoće i naziv proizvođača kemikalija korištenih za UPLC analizu uzoraka tijekom izrade diplomskog rada

<b>Kemikalija</b>	<b>Stupanj čistoće</b>	<b>Proizvođač</b>
sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
cinkov sulfat heptahidrat	≥99 %	Kemika, Hrvatska

### 3.1.3. Kemijski sastav hranjivih podloga

#### 3.1.3.1. Hranjiva podloga za čuvanje i održavanje kulture kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Za čuvanje i održavanje kulture radnog mikroorganizma, kvasca *K. marxianus* NBRC 1777, korištena je hranjiva podloga sastava: 20 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (što odgovara 18,18 g L<sup>-1</sup> glukoze), 20 g L<sup>-1</sup> triptona, 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta te 20 g L<sup>-1</sup> agara.

#### 3.1.3.2. Hranjiva podloge za pripremu inokuluma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Za pripremu inokuluma i propagaciju kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 korištena je podloga sastava 20 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (što odgovara 18,18 g L<sup>-1</sup> glukoze), 20 g L<sup>-1</sup> triptona te 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta.

#### 3.1.3.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

U ovom diplomskom radu istraživana je utjecaj raznih izvora dušika na rast kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u Erlenmeyerovim tikvicama na tresilici. Kao izvor ugljika korišten je glukoza monohidrat pri različitim koncentracijama (15 g L<sup>-1</sup>; 25 g L<sup>-1</sup>; 50 g L<sup>-1</sup>), što je odgovaralo 13,64 g L<sup>-1</sup>; 22,73 g L<sup>-1</sup> i 45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze, a kao izvori dušika primijenjeni su tripton, anorganske soli (amonijev hidrogenfosfat i amonijev sulfat) te kukuruzna močevina. Kemijski sastavi podloga za uzgoj prikazani su u tablici 6.

**Tablica 6.** Sastav hranjivih podloga za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na glukozi monohidratu kao izvoru ugljika te različitim izvorima dušika

Podloga (oznaka)	$\gamma$ (glukoza monohidrat) [g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma$ (triptona) [g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma$ (DAS) <sup>a</sup> [g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma$ (DAP) <sup>b</sup> [g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma$ (CSL) <sup>c</sup> [g L <sup>-1</sup> ]
Podloga 1 (P1)	15	6	-	-	-
Podloga 2 (P2)		7,5	-	-	-
Podloga 3 (P3)		10	-	-	-
Podloga 4 (P4)	25	6	-	-	-
Podloga 5 (P5)		7,5	-	-	-
Podloga 6 (P6)		10	-	-	-
Podloga 7 (P7)	50	6	-	-	-
Podloga 8 (P8)		7,5	-	-	-
Podloga 9 (P9)		10	-	-	-
Podloga 10 (P10)	15	5	1	1	-
Podloga 11 (P11)			2,5	2,5	-
Podloga 12 (P12)			5	5	-
Podloga 13 (P13)	25		1	1	-
Podloga 14 (P14)			2,5	2,5	-
Podloga 15 (P15)			5	5	-
Podloga 16 (P16)	50		1	1	-
Podloga 17 (P17)			2,5	2,5	-
Podloga 18 (P18)			5	5	-
Podloga 19 (P19)	15	-	-	-	10
Podloga 20 (P20)		-	-	-	15
Podloga 21 (P21)		-	-	-	20
Podloga 22 (P22)	25	-	-	-	10
Podloga 23 (P23)		-	-	-	15
Podloga 24 (P24)		-	-	-	20
Podloga 25 (P25)	50	-	-	-	10
Podloga 26 (P26)		-	-	-	15
Podloga 27 (P27)		-	-	-	20

<sup>a</sup> DAS - amonijev sulfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (engl. *diammonium sulfate*, *DAS*)

<sup>b</sup> DAP - amonijev hidrogenfosfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (engl. *diammonium phosphate*, *DAP*)

<sup>c</sup> CSL - kukuruzna močevina (engl. *corn steep liquor*, *CSL*)

#### 3.1.4. Uređaji i oprema

- tresilica Certomat RM (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka)
- spektrofotometar Cary 100, UV-VIS proizvođača Agilent Technologies i staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka)
- centrifuga s hlađenjem Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD) za izdvajanja biomase iz hranjive podloge.
- centrifuga bez hlađenja CF-10 High-Performance (Njemačka) za pripremu uzoraka za UPLC-analizu
- sustav za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (engl. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC), UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Uz to je korištena analitička kolona Rezex ROA - Organic Acid H+, Phenomenex dimenzija 150 × 7,8 mm s odgovarajućom pretkolonom
- analitička vaga (ALC210.4; Acculab, SAD)
- tehnička vaga (ET – 1211; Tehnica, Slovenija)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- sušionik (ST-50; Instrumentaria, Hrvatska)
- vrtložna miješalica (LLG – uniTEXTER 1; LLG – Labware, Njemačka)
- hladnjaci i zamrzivač za potrebe čuvanja uzoraka
- plamenici
- stakleno i plastično laboratorijsko posuđe

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Čuvanje i održavanje radne kulture kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Kvasac *K. marxianus* NBRC 1777, porastao na YPD podlozi u Petrijevim zdjelicama, precijepljen je na svježje YPD podloge, čiji je postupak pripreme opisan u Poglavlju 3.2.3.1. Nacijepljene Petrijeve zdjelice inkubirane su u termostatu (30 °C/48 h), nakon što je kultura porasla, omotane su parafinskom vrpcom i čuvane u hladnjaku na 4 °C do 30 dana, a potom je radna kultura ponovo precijepljena radi održavanja.

### 3.2.2. Priprema inokuluma i propagacija kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Sastav podloga za uzgoj inokuluma i propagaciju kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 naveden je u Poglavlju 3.1.3.2., a njihova priprema opisana u Poglavlju 3.2.3.2. Podloge su bile istog sastava kao podloge za održavanje i čuvanje kulture, ali bez dodatka agara, tekuća kompleksna YPD podloga (engl. *Yeast Extract-Peptone-Dextrose*). Za sve uzgoje kvasca provedene s različitim sastavom podloge, priprema inokuluma i propagacija provedene su na isti način.

Nakon nacijepljivanja kvasca na svježju čvrstu YPD podlogu u Petrijevim zdjelicama i inkubacije (30 °C/48 h), mala količina porasle kulture kvasca je ezom aseptično prenesena u četiri staklene epruvete s 10 mL tekuće YPD podloge koje su potom termostatirane (30 °C/24h). U sljedećem koraku je sadržaj dviju epruveta (ukupno 20 mL) homogeniziran pomoću vrtložne miješalice i neposredno nakon toga aseptično prenesen u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL s 200 mL YPD tekuće podloge. Na taj način su sve četiri epruvete prenesene u veći volumen u ukupno dvjema Erlenmeyerovim tikvicama. Dvije tikvice su korištene za propagaciju inokuluma na tresilici (30 °C/150 rpm/24 h), a na kraju propagacije odabrana je samo jedna od njih i korištena kao inokulum za uzgoj.



### 3.2.3. Priprema hranjivih podloga

#### 3.2.3.1. Priprema hranjivih podloga za čuvanje i održavanje kulture kvasca

##### *Kluyveromyces marxianus NBRC 1777*

Za jednu litru podloge za čuvanje i održavanje radne kulture kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na tehničkoj vagi odvagano je 20 g glukoze monohidrata, 20 g triptona i 10 g kvašćevog ekstrakta koji su potom preneseni u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 1 L i menzurom je dodana 1 L demineralizirane vode. Sastojci podloge otopljeni su pomoću magnetne miješalice.

Po 250 mL pripravljene podloge je zatim pomoću menzure razdijeljeno u četiri manje Erlenmeyerove tikvice volumena 500 mL. U svaku tikvicu je dodano po 5 g agara odvagano pomoću tehničke vage tako da koncentracija bude 20 g agara L<sup>-1</sup>. Nakon dodavanja agara ponovo je provedena homogenizacija u tikvicama pomoću magnetske miješalice. Potom su tikvice s podlogom začepljene vatenim čepovima te sterilizirane u autoklavu (120 °C/20 minuta). Nakon sterilizacije, podloga je aseptično prelivena u Petrijeve zdjelice te ostavljena da se ohladi i skruti 24 h prije nacjepljivanja.

#### 3.2.3.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj inokuluma i propagaciju kvasca

##### *Kluyveromyces marxianus NBRC 1777*

Za svaki od provedenih pokusa pripravljene su po četiri epruvete s metalnim čepom i 10 mL tekuće YPD podloge te po dvije Erlenmeyerove tikvice od 500 mL s vatenim čepom i 200 mL tekuće YPD podloge.

Za fazu umnožavanja kvasca u staklenim epruvetama pripravljeno je 200 mL YPD podloge u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL. U skladu sa sastavom YPD podloge navedenim u Poglavlju 3.1.3.2., za pripravu 200 mL podloge je na tehničkoj vagi odvagano 4 g glukoze monohidrata, 4 g triptona i 2 g kvašćevog ekstrakta koji su potom preneseni u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL, menzurom je dodano 200 mL demineralizirane vode i sastojci su otopljeni miješanjem na magnetnoj miješalici. Po 10 mL hranjive podloge je graduiranom pipetom prebačeno u epruvete koje su potom začepljene metalnim čepovima i sterilizirane u autoklavu (120 °C/20 minuta). Time je dobiveno 20 epruveta sa sterilnom tekućom YPD podlogom, a postupak pripreme je ponovljen kada su podloge u epruvetama potrošene.

Za fazu propagacije kvasca u tikvicama, od jedne litre YPD podloge pripravljeno je po pet Erlenmeyerovih tikvica od 500 mL s 200 mL YPD podloge. To je provedeno tako da je u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 1 L dodano 20 g glukoze monohidrata, 20 g triptona i 10 g kvašćevog ekstrakta koji su prethodno odvagani tehničkom vagom te je menzurom dodana 1 L demineralizirane vode, a sastojci su otopljeni pomoću magnetne miješalice. Po 200 mL podloge je zatim iz velike tikvice menzurom prebačeno u pet manjih Erlenmeyerovih tikvica volumena 500 mL koje su potom začepljene vatenim čepovima i sterilizirane u autoklavu (120 °C/20 minuta). Postupak pripreme hranjivih podloga za propagaciju ponavljan je po potrošnji istih.

### 3.2.3.3. Priprema hranjivih podloga za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na različitim izvorima dušika

Ispitivanje utjecaja različitih izvora i koncentracija dušika pri različitim koncentracijama glukoza monohidrata na rast kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 proveden je na hranjivim podlogama čiji su sastavi prikazani u tablici 6.

Pripremljeno je ukupno 27 različitih hranjivih podloga tako da su u Erlenmeyerove tikvice od 500 mL prenesene prethodno izračunate i odvagane mase odgovarajućih sastojaka hranjivih podloga (glukoza monohidrat, tripton, anorganske soli, kukuruzna močevina) u skladu s koncentracijama prikazanim u tablici 6 te je potom menzurom dodano po 200 mL demineralizirane vode. Nakon otapanja sastojaka pomoću magnetske miješalice, tikvice s hranjivim podlogama su začepljene vatenim čepovima i sterilizirane u autoklavu (120 °C/20 minuta).

### 3.2.4. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na različitim izvorima dušika

Provedeno je ukupno 27 uzgoja: tri različite koncentracije glukoze i tri izvora dušika pri tri različite koncentracije za svaki od njih, u skladu s planom pokusa prikazanim u tablici 6 navedenoj u Poglavlju 3.1.3.3., a priprema hranjivih podloga prikazana u Poglavlju 3.2.3.3.

Prije inokulacije uzeto je po 4 mL uzorka svake pojedine sterilne hranjive podloge za slijepu probu za OD<sub>600</sub> i kasniju analizu. Hranjive podloge volumena 200 mL u

Erlenmeyerovim tikvicama od 50 mL nacijepljene su s 20 mL inokuluma, tj. s 10 % (v/v) (Poglavlje 3.2.2.). Uzorak u nultom satu uzgoja uzet je neposredno nakon nacijepljanja radi određivanja sastava podloge i koncentracije biomase u nultom satu uzgoja.

Uzgoj je proveden na tresilici (30 °C/150 rpm) i trajao je 24 sata. Pritom je tijekom prvih 8 sati svakih sat vremena aseptično uzimano po 4 mL uzorka. Nakon 8. sata uzgoja, uzorkovanje je provedeno tek nakon 24. sata uzgoja. U uzorcima su određivani optička gustoća ( $OD_{600}$ ), suha tvar te glukoza i produkti metabolizma. Tijekom uzgoja s kukuruznom močevinom kao izvorom dušika, volumen uzorka je iznosio 4,5 mL.

Po uzimanju svakog uzorka, najprije je određena optička gustoća ( $OD_{600}$ ) pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Volumen uzorka koji je korišten za određivanje optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) vraćen je u plastičnu kivetu za uzorkovanje te se s ukupnim volumenom uzorka od 4 mL postupalo kako je navedeno dalje u tekstu.

Uzorci su nakon određivanja  $OD_{600}$  centrifugirani (7000 rpm/5 °C/7 minuta) pomoću centrifuge Thermo Scientific SL 8R. Odvojeni supernatant je zamrznut i čuvan pri -20 °C te naknadno odmrznut i analiziran tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC) kako bi se odredile promjene koncentracija supstrata i produkata. Nakon odvajanja supernatanta, talog je sušen pri 105 °C do konstantne mase te je poslužio za gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase. Uzorcima uzgoja gdje je kukuruzna močevina bila izvor dušika (podloge 19-27) nije bilo moguće gravimetrijski odrediti koncentraciju biomase zbog taloga iz kukuruzne močevine.

Prije određivanju optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) uzoraka izuzetih iz uzgoja gdje je kukuruzna močevina bila izvor dušika (podloge 19-27), bilo je potrebno pripremiti odgovarajuće razrjeđenje zbog nečistoća prisutnih u CSL-u kao izvoru dušika. Od izuzetog uzorka (4,5 mL); 0,5 mL je razrijeđeno s 4,5 mL demineralizirane vode (10×) te je tako razrijeđenom uzorku mjerena optička gustoća ( $OD_{600}$ ). S preostalih 4 mL, koji su kasnije korišteni za UPLC analizu postupalo se kao i s uzorcima izuzetim iz uzgoja gdje CSL nije bio izvor dušika, a što je opisano u tekstu iznad.

### 3.2.5. Analitičke metode

Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 spektrofotometrijski je praćena optička gustoća podloge, gravimetrijski je određena koncentracija biomase, a kemijska analiza sastava hranjive podloge provedena je UPLC metodom.

#### 3.2.5.1. Određivanje optičke gustoće spektrofotometrijski

Rast biomase kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u uzorcima izuzimanim tijekom uzgoja indirektno je praćen određivanjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm ( $OD_{600}$ ) pomoću spektrofotometra Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies). Neposredno prije mjerenja, uzorak je homogeniziran na vrtložnoj miješalici te je 2,5 mL uzorka preneseno u staklenu kivetu za mjerenje optičke gustoće.

#### 3.2.5.2. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC) korištena je za praćenje promjene koncentracija izvora ugljika (glukoze) i produkata (etanol, glicerol, octena kiselina te alkoholni šećeri ksilitol i arabitol) tijekom uzgoja. Sustav za UPLC analizu opisan je u Poglavlju 3.1.4., a uz to je korištena analitička kolona Rezex ROA - Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex dimenzija 150 × 7,8 mm s odgovarajućom pretkolonom. Kao mobilna faza korištena je otopina sumporne kiseline koncentracije 0,0025 mol L<sup>-1</sup>, koja je pripravljena razrjeđivanjem 139 μL 96 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u 1 L demineralizirane vode, podvrgnuta vakuum-filtraciji i potom dekarbonizirana u ultrazvučnoj kupelji tijekom 20 minuta.

Priprema uzoraka za UPLC analizu započeta je tako da su uzorci supernatanta najprije odmrznuti na sobnoj temperaturi, a zatim su u odgovarajućim omjerima razrijeđeni otopinom cinkova sulfata heptahidrata, koncentracije 100 g L<sup>-1</sup> (56,15 g L<sup>-1</sup> cinkova sulfata), koji je ujedno i služio za taloženje proteina. Pripadajuća razrjeđenja otopinom cinkova sulfata detaljnije su prikazana u tablici priloga 2. Nakon razrjeđivanja, uzorci su snažno izmiješani tijekom 20-tak sekundi pomoću vrtložne miješalice i ostavljeni 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se provela reakcija između dodanog cinkovog sulfata i proteina te ostalih prisutnih

nečistoća. Centrifugiranjem uzorka pomoću centrifuge CF-10 High-Performance (10000 rpm/sobna temperatura/10 minuta) izdvojeni su istaloženi proteini, a supernatant je odliven i pomoću šprice profiltriran kroz mikrobiološki filter promjera pora 0,2 µm u staklenu vialu.

Po 10 µL prethodno pripremljenog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi 60 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Analiza nije provedena u paralelama. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa OpenLAB CDS. Koncentracije supstrata i produkata u uzorcima izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca prikazanih u prilogu 1.

### 3.2.5.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase

U kivete, koje su prethodno osušene na 105 °C, ohlađene i izvagane, otpipetirano je 4 mL uzorka izuzetog tijekom uzgoja te je provedeno centrifugiranje pomoću centrifuge Thermo Scientific SL 8R (7000 rpm, 5 °C, 7 min). Potom je supernatant odvojen dekantiranjem, a biomasa je ostala kao talog na dnu kivete. Kivete s biomasom su zatim sušene 4 h na 50 °C i dosušivane na 105 °C do konstantne mase. Zatim su ohlađene u eksikatoru (45 minuta) i izvagane pomoću analitičke vage. Koncentracija biomase u uzorku (X) izračunata je prema jednadžbi 1:

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

gdje je

$m_{ok}$  masa kivete s osušenom biomasom [g],

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

$V_{uz}$  volumen uzorka [mL].

### 3.2.6. Proračun pokazatelja uspješnosti provođenja procesa

- Potrošnja supstrata ( $Y_S$ ):

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

gdje je

$Y_S$  potrošnja supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$S_0$  početna koncentracija supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$S$  konačna koncentracija supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ].

- Prinos biomase ( $Y_X$ ):

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

gdje je

$Y_X$  prinos biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$X_0$  početna koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$X$  konačna koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ].

- Prinos biomase u uzorcima koji sadrže CSL ( $Y_{X(\Delta OD)}(10 \times \text{razrj.})$ ):

$$Y_{X(\Delta OD)}(10 \times \text{razrj.}) = X - X_0 \quad [4]$$

gdje je

$Y_{X(\Delta OD)}(10 \times \text{razrj.})$  prinos biomase [-],

$X_0$  vrijednost  $OD_{600}$  10 puta razrijeđenog uzorka s početka uzgoja [-]

$X$  vrijednost  $OD_{600}$  10 puta razrijeđenog uzorka s kraja uzgoja [-].

- Prinosi produkata ( $Y_P$  (etanol);  $Y_P$  (glicerol);  $Y_P$  (octena kis.);  $Y_P$  (arabitol);  $Y_P$  (ksilitol)):

$$Y_P = P - P_0 \quad [5]$$

gdje je

$Y_P$  prinos produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$P_0$  početna koncentracija produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$P$  konačna koncentracija produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ].

- Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ):

$$Y_{X/S} = \frac{Y_X}{Y_S} \quad [6]$$

gdje je

$Y_{X/S}$  koeficijent konverzije supstrata u biomasu [ $\text{g g}^{-1}$ ],

$Y_X$  prinos biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$Y_S$  potrošnja supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ].

- Koeficijent konverzije supstrata u produkt ( $Y_{P/S}$ ):

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} \quad [7]$$

gdje je

$Y_{P/S}$  koeficijent konverzije supstrata u produkt [ $\text{g g}^{-1}$ ],

$Y_P$  prinos produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$Y_S$  potrošnja supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ].

- Produktivnost (Pr):

$$Pr = \frac{Y_P}{t_{uk}} \quad [8]$$

gdje je

Pr produktivnost [ $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ],

$Y_P$  prinos produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$t_{uk}$  ukupno vrijeme trajanja uzgoja [h].

- Iskorištenje glukoze tijekom uzgoja ( $I_{glukoza}$ ):

$$I_{glukoza} = \frac{Y_{S(glukoza)}}{S_0} \cdot 100 \quad [9]$$

gdje je

$I_{glukoza}$  iskorištenje glukoze tijekom uzgoja [%],

$Y_{S(glukoza)}$  potrošnja supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ],

$S_0$  početna koncentracija glukoze u podlozi [ $\text{g L}^{-1}$ ].

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istražen je utjecaj početne koncentracije glukoze kao izvora ugljika te izvora dušika i njegove početne koncentracije na rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. Pored toga, određene su koncentracije proizvedenog etanola i drugih detektiranih proizvoda. Kao izvor ugljika u podlozi odabrana je glukoza, a kao izvori dušika primijenjeni su tripton, anorganske soli (amonijev hidrogenfosfat i amonijev sulfat) te kukuruzna močevina (tablica 6, podloge P1-P27).

Saini i sur. (2017) koristili su podloge s 50, odnosno 100 g L<sup>-1</sup> glukoze te 20 g L<sup>-1</sup> peptona i 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta za uzgoj kvasca *K. marxianus* MTCC 4139. U jednoj seriji eksperimenata provedenih u ovom diplomskom radu, kao izvor dušika je umjesto peptona korišten tripton kao jedini izvor dušika u sličnim koncentracijama kao u Saini i sur. (2017) (tablica 6, podloge P1-P9).

U drugoj seriji eksperimenata je primijenjena kombinacija triptona s anorganskim solima koje zamjenjuju jedan dio organskog izvora dušika. Primjer istraživanja anorganskih soli kao izvora dušika za rast kvasca *K. marxianus* objavili su Ai i sur. (2022) koji su istraživali koncentracije amonijevog sulfata do 10 g L<sup>-1</sup> u sintetskoj podlozi te Braga i sur. (2013) koji su za proizvodnju  $\beta$ -galaktozidaze pomoću *K. marxianus* CCT 7082 i *K. marxianus* ATCC 16045 koristili 8,8 g L<sup>-1</sup> amonijeva sulfata u podlozi s 28,2 g L<sup>-1</sup> laktoze i 17 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta.

Kukuruzna močevina, kao kompleksna sirovina povoljne cijene i bogata izvorima dušika te nizom drugih sastojaka pogodnih za biotehnošku primjenu (Wahjudi i sur., 2023; Zhou i sur., 2022; Tan i sur., 2016; Liu i sur., 2015) istražena je u trećoj seriji eksperimenata budući da se ne može doći do dovoljne količine podataka o utjecaju ove sirovine na rast biomase kvasca *K. marxianus*. O primjeni CSL-a pronađen je samo rad Furlan i sur. (2000), koji su formulirali jeftinu hranjivu podlogu za proizvodnju  $\beta$ -D-galaktozidaze pomoću kvasca *K. marxianus* CDB 002 te je usporedili s uobičajenom podlogom koja sadrži laktozu kao primarni induktor sinteze ovog enzima. Umjesto kvašćevog ekstrakta, primijenili su CSL kao jeftin dodatak u rasponu 50 – 200 g L<sup>-1</sup> CSL u kombinaciji s trščanom melasom uz aeraciju 2 vvm. Za rast biomase nakon 25 sati pokazala se najbolja kombinacija 200 g L<sup>-1</sup> CSL (20 % w/v) i 100 g L<sup>-1</sup> trščane melase. Podloga koja je sadržavala kombinaciju 100 g L<sup>-1</sup> CSL i 100 g L<sup>-1</sup> trščane melase pokazala se najboljom za proizvodnju enzima, a tijekom tog procesa proizveden je i etanol te je zamijećena njegova potrošnja prema kraju fermentacije. Postignuta proizvodnja željenog enzima je bila 20 % veća nego na klasičnoj podlozi s laktozom.

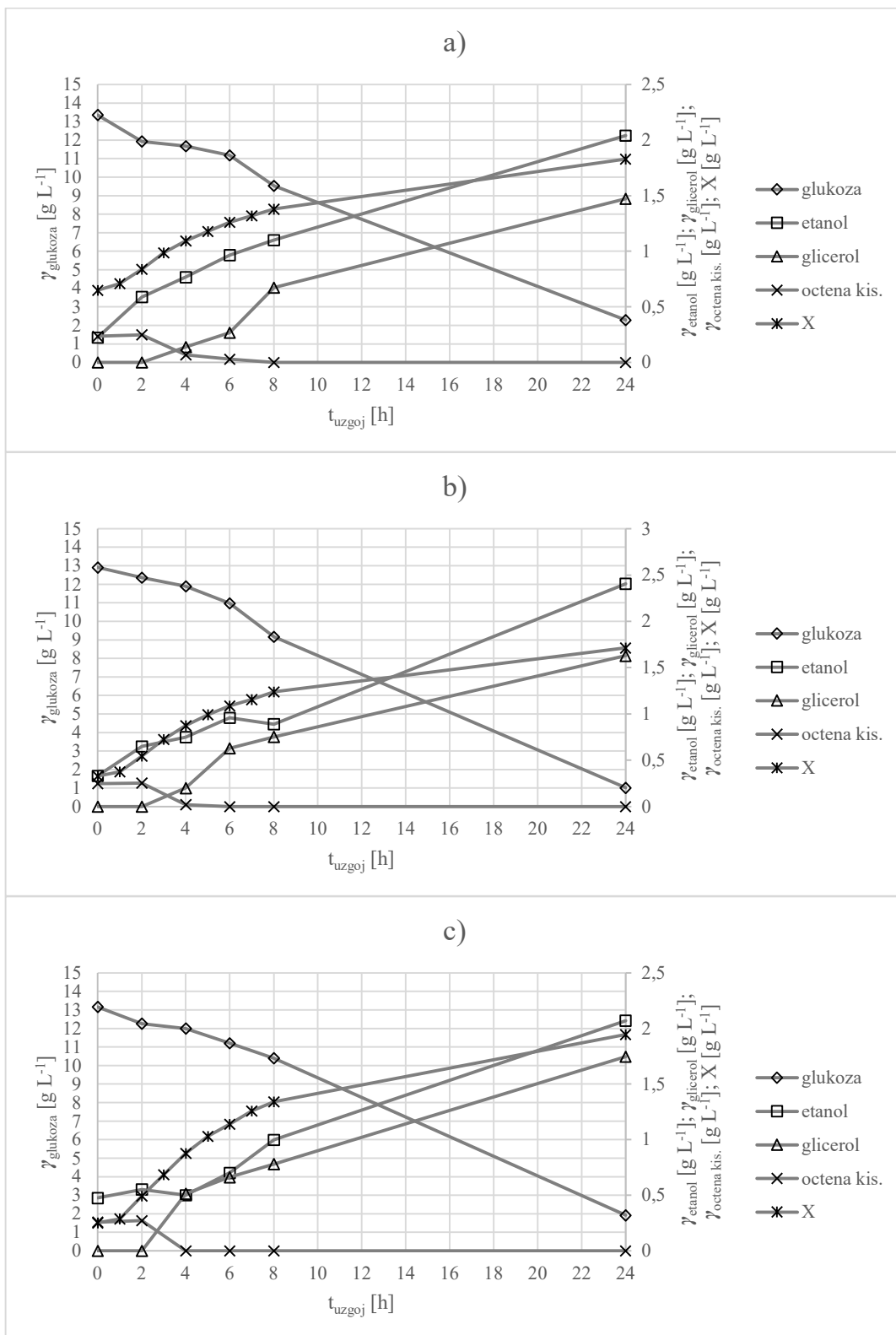


Početni sastavi hranjivih podloga u ovom radu prikazani su u *Poglavlju 3.1.3.3.* u tablici 6. Priprema hranjivih podloga opisana je u *Poglavlju 3.2.3.3.*, a tijekom uzgoja u *Poglavlju 3.2.4.* Spektrofotometrijsko određivanje optičke gustoće, kao indirektnog pokazatelja rasta biomase opisano je u *Poglavlju 3.2.5.1.*, a gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase u *Poglavlju 3.2.5.3.* Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC) u svrhu određivanja potrošnje supstrata i nastajanja produkata opisana je u *Poglavlju 3.2.5.2.* Na temelju dobivenih rezultata, grafički je prikazana promjena koncentracije biomase, supstrata i produkata u ovisnosti o vremenu uzgoja (slike 4-6, 9-11 i 15-17). Također, izračunati su pokazatelji uspješnosti procesa (prilozi 3-5) te su njihove usporedbe grafički prikazane (slike 7-9, 12-14 te 18-19). Rezultati i diskusija vezani uz uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 izneseni su u tekstu koji slijedi.

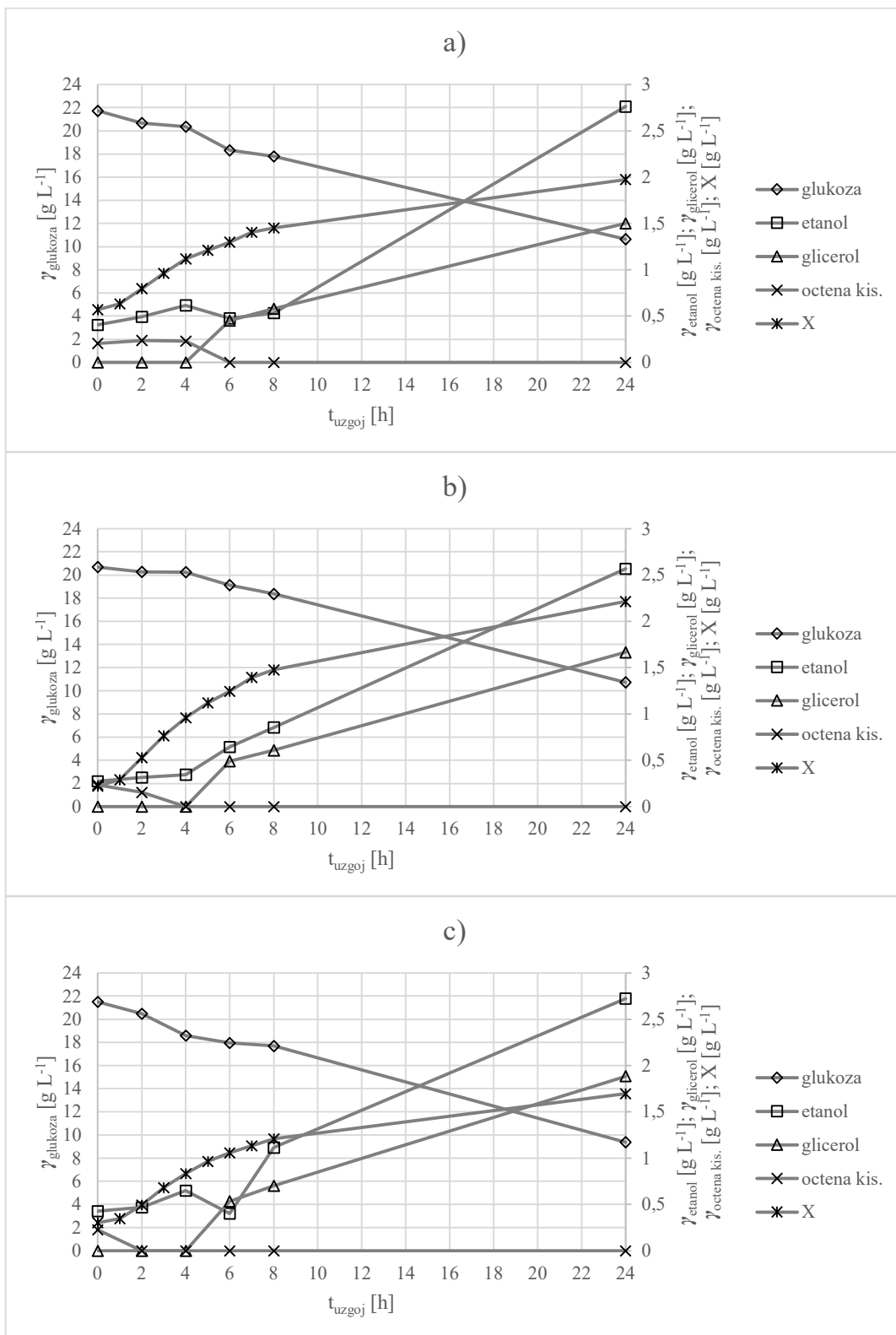
Izvor ugljika u svim eksperimentima (tablica 6) bila je glukoza (13, 64 g L<sup>-1</sup>; 22,73 g L<sup>-1</sup>; 45,46 g L<sup>-1</sup>), dodana u obliku glukoza monohidrata, korištenog u tri različite koncentracije (15 g L<sup>-1</sup>; 25 g L<sup>-1</sup>; 50 g L<sup>-1</sup>). Tripton je kao samostalan izvor dušika korišten pri koncentracijama 6 - 10 g L<sup>-1</sup> (tablica 6, podloge 1-9, poglavlje 4.1.). U kombinaciji triptona (5 g L<sup>-1</sup>) i anorganskih soli kao izvora dušika korišteni su amonijev hidrogenfosfat i amonijev sulfat pri čemu su obje soli dodane u jednakim koncentracijama koje su iznosile 1 - 5 g L<sup>-1</sup> (tablica 6, podloge 10-18, poglavlje 4.2.). Kukuruzna močevina primijenjena je u koncentracijama 10 - 20 g L<sup>-1</sup> (tablica 6, podloge 19-27, poglavlje 4.3.), što je znatno manje nego u Furlan i sur. (2000).

#### **4.1.UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE I TRIPTONA**

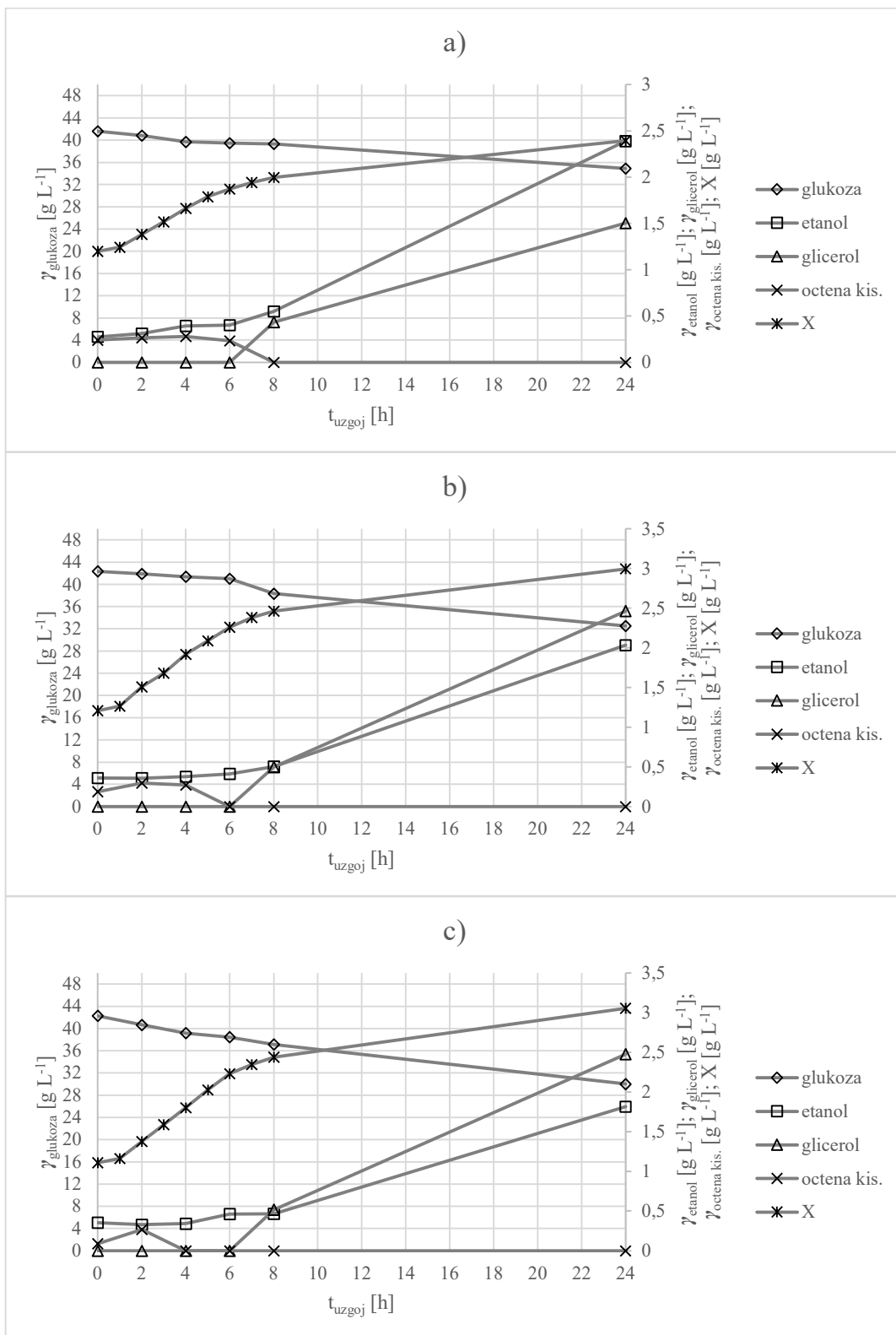
Grafički prikazi promjene koncentracije biomase tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 te utroška supstrata i koncentracije produkata u hranjivim podlogama koje su sadržavale od 15 do 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata te 6, 7,5 i 10 g L<sup>-1</sup> triptona prikazani su na slikama 4-6. Pripadajući parametri uspješnosti vođenja procesa za navedene eksperimente prikazani su u prilogu 3, a grafička usporedba potrošnje supstrata te prinosa biomase i produkata na slikama 7 i 8.



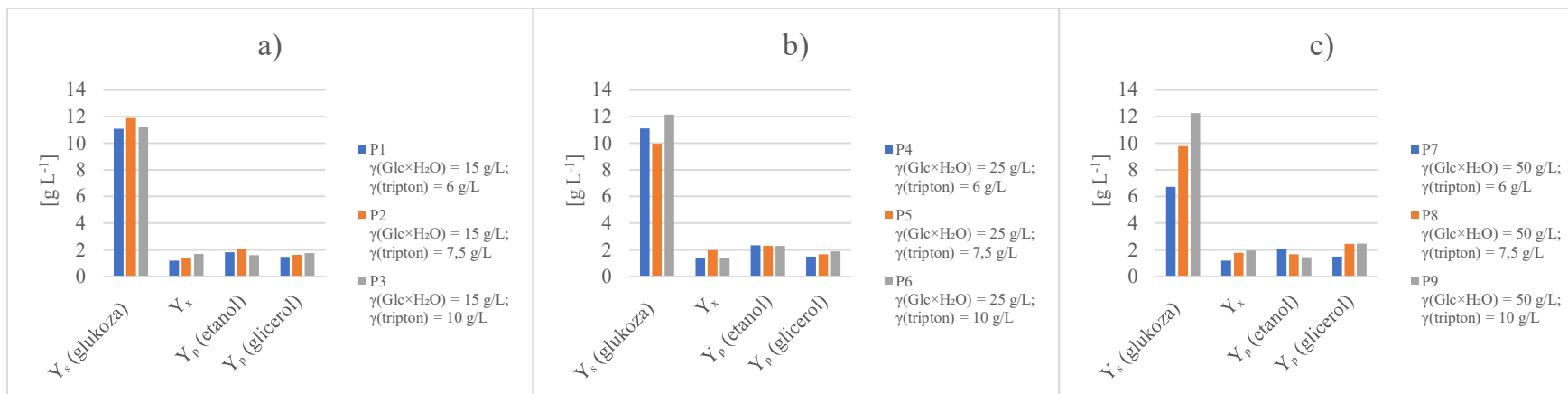
**Slika 4.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 15 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (13,64 g L<sup>-1</sup> glukoze): podloga P1 s 6 g L<sup>-1</sup> triptona (a); podloga P2 sa 7,5 g L<sup>-1</sup> triptona (b); podloga P3 s 10 g L<sup>-1</sup> triptona (c)



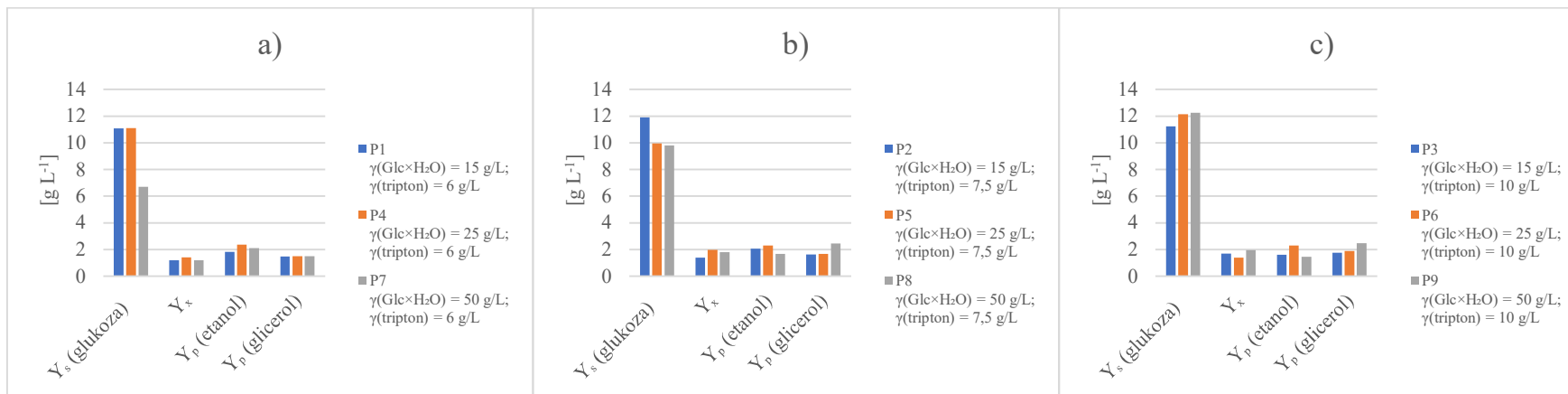
**Slika 5.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (22,73 g L<sup>-1</sup> glukoze): podloga P4 s i 6 g L<sup>-1</sup> triptona (a); podloga P5 sa 7,5 g L<sup>-1</sup> triptona (b); podloga P6 s 10 g L<sup>-1</sup> triptona (c)



**Slika 6.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze): podloga P7 s 6 g L<sup>-1</sup> triptona (a); podloga P8 sa 7,5 g L<sup>-1</sup> triptona (b); podloga P9 s 10 g L<sup>-1</sup> triptona (c)



**Slika 7.** Usporedba potrošnje glukoze na kraju procesa, prinosa biomase i produkata za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na tri različite početne koncentracije glukoza monohidrata ( $\text{Glc} \times \text{H}_2\text{O}$ ) uz tri različite početne koncentracije triptona



**Slika 8.** Usporedba potrošnje glukoze na kraju procesa, prinosa biomase i produkata za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na tri različite početne koncentracije triptona uz promjenu početne koncentracije glukoza monohidrata ( $\text{Glc} \times \text{H}_2\text{O}$ )

U istraživanju rasta odabranog soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na različitim početnim koncentracijama glukoze i triptona najveći prinos biomase ( $Y_X$ ) od  $1,99 \text{ g L}^{-1}$  i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) od  $0,20 \text{ g g}^{-1}$  dobiveni su uzgojem na podlozi 5 (slika 5b). Najveći prinos etanola ( $Y_{P(\text{etanol})}$ ) od  $2,36 \text{ g L}^{-1}$  dobiven je uzgojem na podlozi 4 (slika 5a), dok je najveći koeficijent konverzije supstrata u etanol ( $Y_{P/S(\text{etanol})}$ ) od  $0,31 \text{ g g}^{-1}$  postignut uzgojem na podlozi 7 s dvostruko većom početnom koncentracijom glukoze (slika 6a). Iz slika 4-6 vidljivo je da je radni mikroorganizam proizveo i određene količine glicerola. Octena kiselina detektirana je u nultom satu svakog uzgoja, a njena je koncentracija do kraja svakog uzgoja pala na nulu. Smanjenje koncentracije acetata može se pripisati sposobnosti kvasca *K. marxianus* da esterifikacijom acetata s etanolom proizvede hlapljivi spoj etil-acetat (Löser i sur., 2015) koji nije moguće detektirati UPLC metodom. Prema Martynova i sur. (2016) u kvascima se octena kiselina sintetizira iz acetaldehida. Crabtree-negativni kvasci (uključujući *K. marxianus*) proizvode acetat u uvjetima ograničenja kisika, npr. tijekom alkoholne fermentacije, ili pri visokim koncentracijama biomase kada postaje otežana distribucija dovoljnih koncentracija kisika za sve stanice u cijelom mediju. Kako je navedeno u tekstu ranije, u ovom istraživanju acetat je detektiran u nultom satu uzgoja pa se fenomen opisan od strane Martynova i sur. (2016) vjerojatno odvio tijekom pripreme i propagacije inokuluma te je acetat dodan u hranjive podloge zajedno s kvaščevom biomasom.

Ni u jednom uzgoju nije potrošena sva glukoza, a povećanjem početne koncentracije glukoze pada postotak iskorištene glukoze (prilog 3). Najveći postotak utrošene glukoze (92 %) postignut je uzgojem na podlozi 2 (slika 4b), a najmanji (16 %) uzgojem na podlozi 7 (slika 6a). Za uzgoj kod kojeg je postignut najveći prinos biomase ( $Y_X$ ) i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ), na podlozi 5, potrošnja glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) iznosila je  $9,96 \text{ g L}^{-1}$  (slika 5b), tj. tijekom tog uzgoja potrošeno je 48 % glukoze. Potrošnja supstrata ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) za uzgoj kod kojeg je postignut najveći prinos etanola, na podlozi 4, iznosila je  $11,09 \text{ g L}^{-1}$  (slika 5a), tj. potrošeno je 51 % glukoze. Pri visokim početnim koncentracijama glukoze ( $45,46 \text{ g L}^{-1}$ ) povećanjem koncentracije triptona značajno rastu potrošnja supstrata ( $6,72 - 12,26 \text{ g L}^{-1}$ ) i prinos biomase ( $1,19 - 1,95 \text{ g L}^{-1}$ ), dok prinos etanola pada ( $2,11 - 1,46 \text{ g L}^{-1}$ ), što je jasno vidljivo na slici 7c. *K. marxianus* je kvasac čiji je metabolizam tipa respiratorne fermentacije, dakle proizvodi energiju oksidativnom fosforilacijom nakon citratnog ciklusa i fermentacijom ugljikohidrata u etanol. Pri visokim koncentracijama ugljikohidrata pokazuje jak Crabtree-negativan učinak za razliku od *S. cerevisiae* kod kojeg se pri tim uvjetima piruvat u većoj mjeri usmjerava ka proizvodnji etanola, a ne0 biomase (Karim i sur., 2020).

Na slikama 4-6 vidljivo je da je radni mikroorganizam ušao u eksponencijalnu fazu rasta nakon prvog sata uzgoja. Također, vidljivo je i da je porast koncentracije etanola s vremenom u prvih osam sati uzgoja manji u podlogama s većom početnom koncentracijom glukoze.

Pri svim koncentracijama glukoze je povećanjem koncentracije triptona rastao prinos glicerola (slika 7). Uzgojem na podlogama s 15 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (13,64 g L<sup>-1</sup> glukoze) prinos glicerola je bio 1,47 - 1,75 g L<sup>-1</sup> (slika 7a), na podlogama s 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (22,73 g L<sup>-1</sup> glukoze) iznosio je 1,50 - 1,88 g L<sup>-1</sup> (slika 7b), a na podlogama s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze) bio je 1,50 - 2,48 g L<sup>-1</sup> (slika 7c). Povećanjem koncentracije glukoze pri istim koncentracijama triptona, prinos glicerola je podjednak za podloge s 6 g L<sup>-1</sup> triptona i iznosi oko 1,5 g L<sup>-1</sup>. Uzgojem na podlogama sa 7,5 i 10 g L<sup>-1</sup> triptona prinos glicerola je podjednak na podlogama s 15 i 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (1,63 i 1,67 g L<sup>-1</sup>, odnosno 1,75 i 1,88 g L<sup>-1</sup>), dok je na podlogama s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata zapažen porast do 2,46 g L<sup>-1</sup>, tj. 2,48 g L<sup>-1</sup> (slika 8), a to su ujedno i najveći zapaženi prinosi glicerola za ovu seriju uzgoja. Glicerol je jedan od najvažnijih sekundarnih produkata biokonverzije ugljikohidrata u etanol te ima značajnu fiziološku ulogu u metabolizmu kvasca, uključujući osmoregulaciju i održavanje unutarstanične redoks ravnoteže (Guo i sur., 2011). Za podloge s 15 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (13,64 g L<sup>-1</sup> glukoze) glicerol je detektiran u četvrtom satu uzgoja, za podloge s 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (22,73 g L<sup>-1</sup> glukoze) u šestom, a za podloge s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze) u osmom satu (slike 4-6).

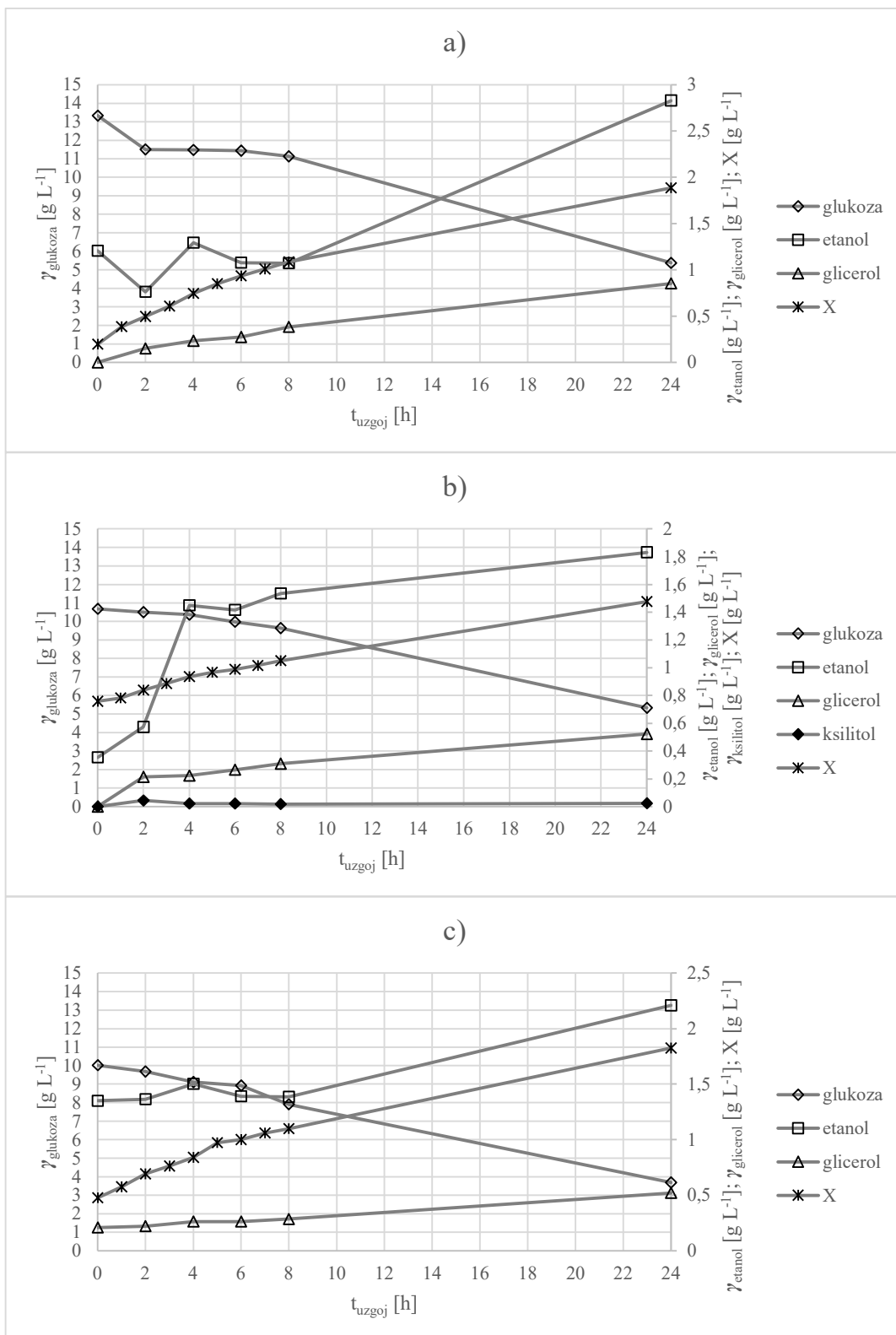
Kaselj (2023) je istraživala utjecaj izvora ugljika na rast i proizvodnju šećernih alkohola odabranih sojeva kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. Tijekom provedbe eksperimenta, uzgajala je kvasac u Erlenmeyerovim tikvicama (30 °C, 250 rpm) pri tri različite početne koncentracije glukoze (10, 15 i 20 g L<sup>-1</sup>) uz kvašćev ekstrakt (10 g L<sup>-1</sup>) i pepton (20 g L<sup>-1</sup>) kao izvore dušika. Njezini rezultati pokazali su da ovaj kvasac ostvaruje najveću specifičnu brzinu rasta (0,10 h<sup>-1</sup>) prilikom rasta na podlozi s koncentracijom glukoze 15 g L<sup>-1</sup>. Direktnom konverzijom šećera u alkohol, uzgojem na podlozi s 20 g L<sup>-1</sup> glukoze, ostvaren je najveći prinos etanola te je iznosio 0,93 g L<sup>-1</sup>, dok je prinos glicerola iznosio 0,34 g L<sup>-1</sup>. Prilikom svakog uzgoja potrošena je sva glukoza u podlozi. Uzgojem na podlogama s 15 i 20 g L<sup>-1</sup> glukoze ostvaren je manji prinos ostalih proizvoda metabolizma – octene kiseline, u odnosu na uzgoj u podlozi s 10 g L<sup>-1</sup> glukoze. To je protumačeno time što je veća količina kvašćeve biomase proizvedena tijekom uzgoja te je kvasac nakon potpunog utroška šećera iz podloge kao izvore ugljika počeo trošiti proizvode vlastitog metabolizma. Zhang i sur. (2020) navode da *K. marxianus* može asimilirati i metabolizirati glicerol kao izvor ugljika, a s druge strane da ga stanice kvasca mogu proizvesti

u svrhu osmoadaptacije i održavanje redoks-ravnoteže kao odgovor na temperaturni i oksidativni stres. U istraživanju Kaselj (2023) kvasac *K. marxianus* NBRC je nakon potrošene glukoze metabolizirao glicerol. Za usporedbu, u ovoj seriji eksperimenata glukoza nije potrošena do kraja te koncentracija glicerola nije padala tijekom uzgoja istog soja kvasca *K. marxianus*.

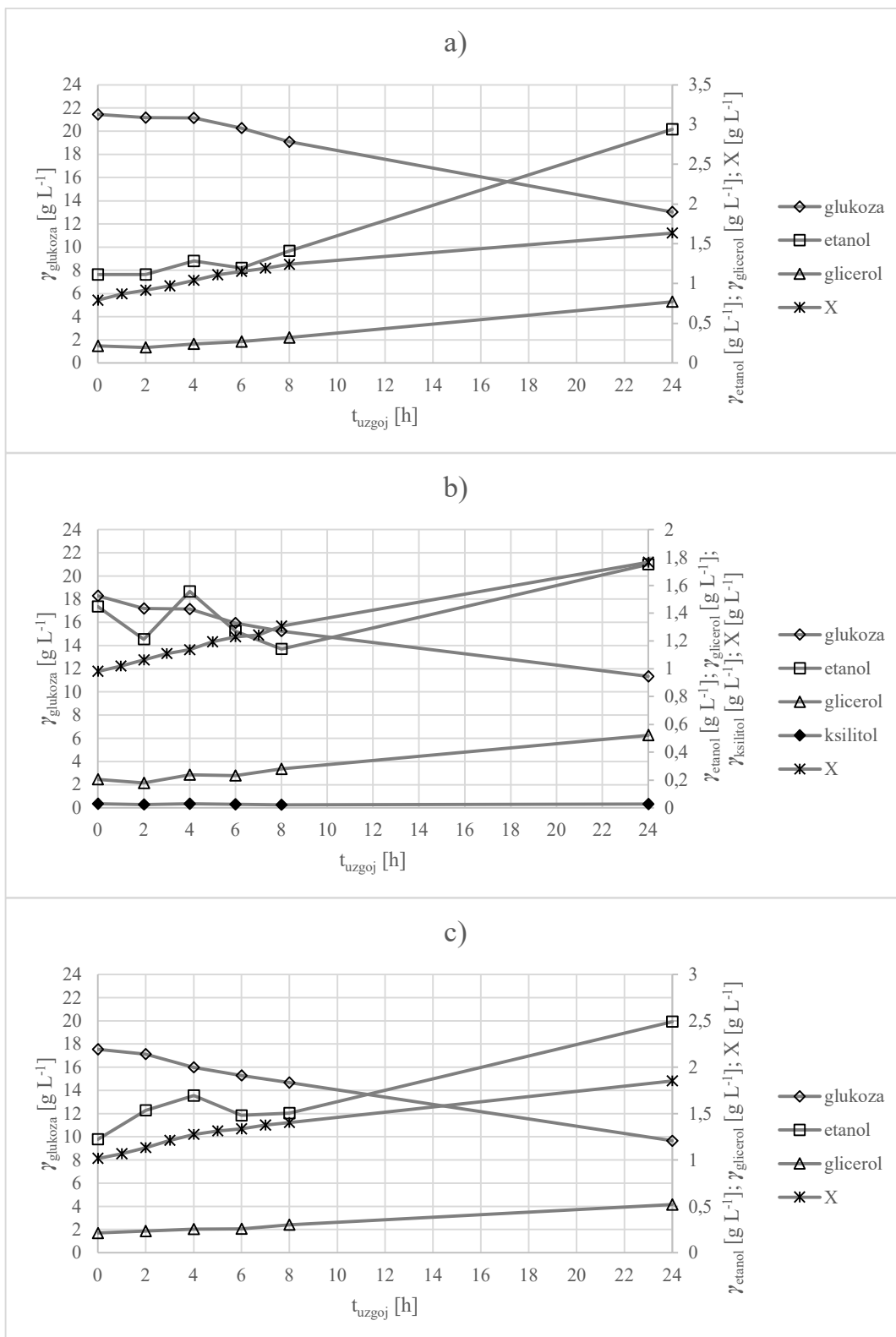
#### **4.2. UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE, TRIPTONU TE RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA AMONIJEVA HIDROGENFOSFATA I AMONIJEVA SULFATA**

Cilj ove serije eksperimenata bio je istražiti kako na rast radnog mikroorganizma utječe zamjena dijela organskog izvora dušika jeftinijim anorganskim solima. Sastavi podloga prikazani su u tablici 6 (podloge 10-18). Početne koncentracije glukoze ostale su iste kao u prethodnom eksperimentu. Koncentracija triptona smanjena je u svim uzgojima na  $5 \text{ g L}^{-1}$ , a koncentracije anorganskih soli (amonijeva hidrogenfosfata i amonijeva sulfata) su se razlikovale (po  $1 \text{ g L}^{-1}$ ;  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  odnosno  $5 \text{ g L}^{-1}$  za svaku sol). Grafički prikazi koncentracija biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja prikazani su na slikama 9-11. Pokazatelji uspješnosti vođenja procesa tablično su prikazani u prilogu 4, a njihova grafička usporedba na slikama 12 i 13. Na slici 14 prikazana je usporedba parametara uspješnosti uzgoja kvasca na triptonu kao samostalnom izvoru dušika i kombinaciji triptona s amonijevim solima pri različitim koncentracijama glukoze.

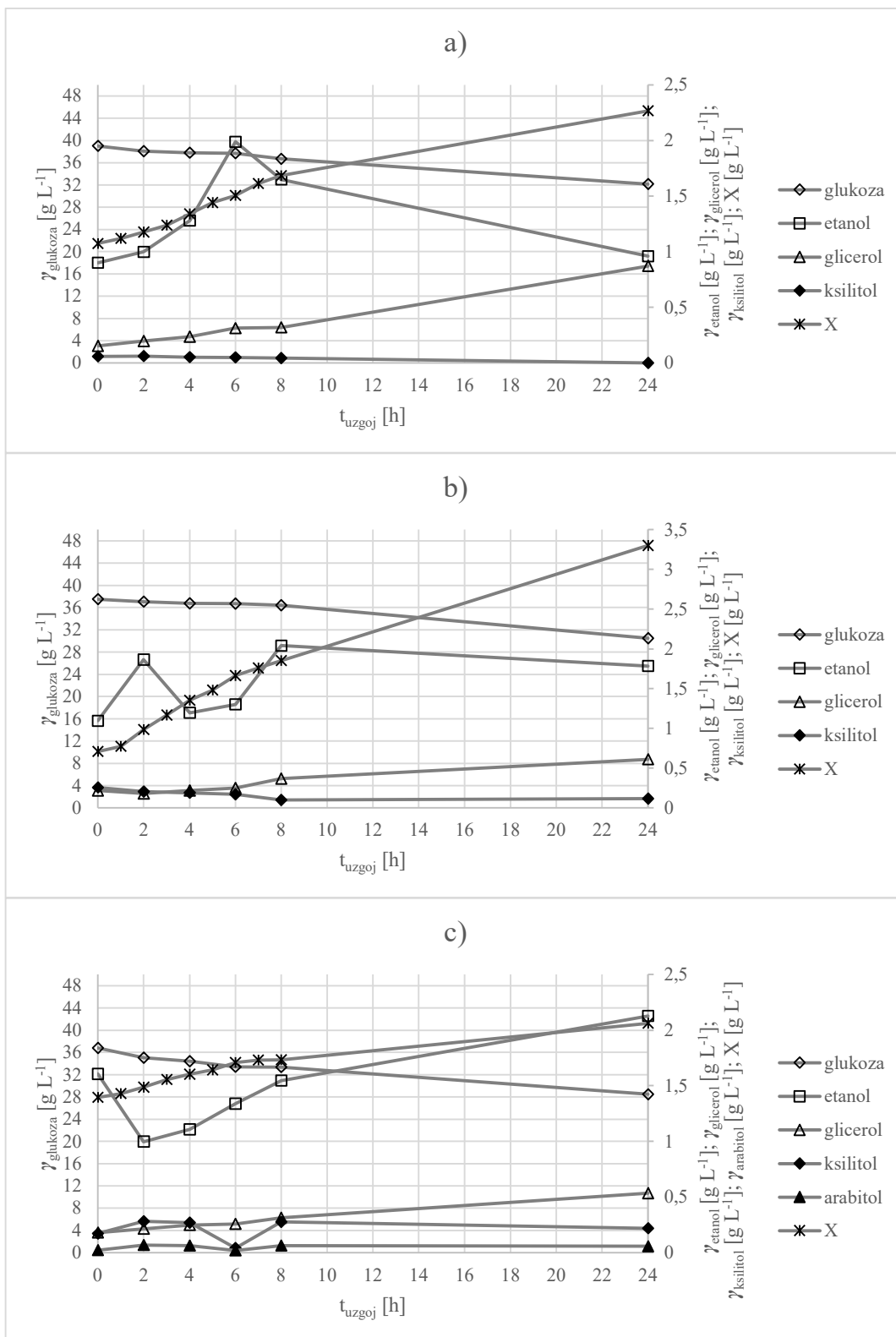




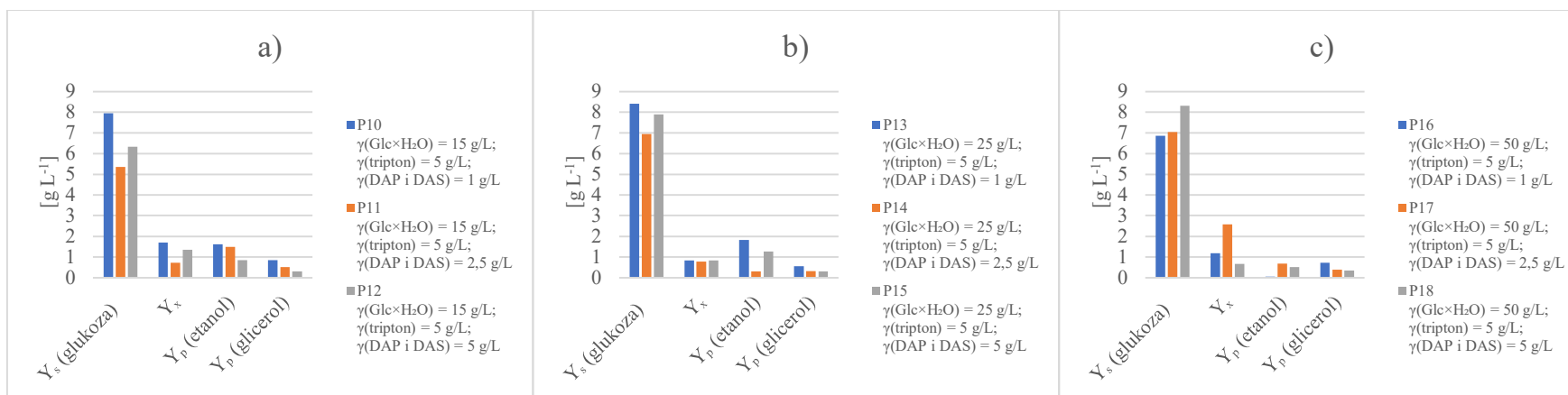
**Slika 9.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 15 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (13,64 g L<sup>-1</sup> glukoze) i 5 g L<sup>-1</sup> triptona: podloga P10 s 1 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (a); podloga P11 s 2,5 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (b); podloga P12 s 5 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (c)



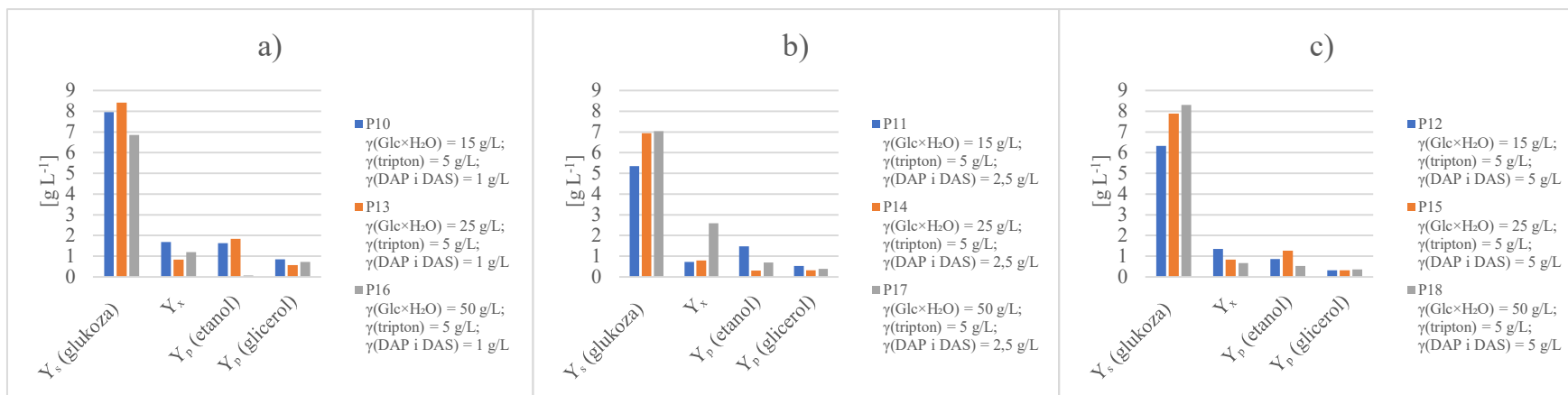
**Slika 10.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (22,73 g L<sup>-1</sup> glukoze) i 5 g L<sup>-1</sup> triptona: podloga P13 s i 1 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (a); podloga P14 s 2,5 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (b); podloga P15 s 5 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (c)



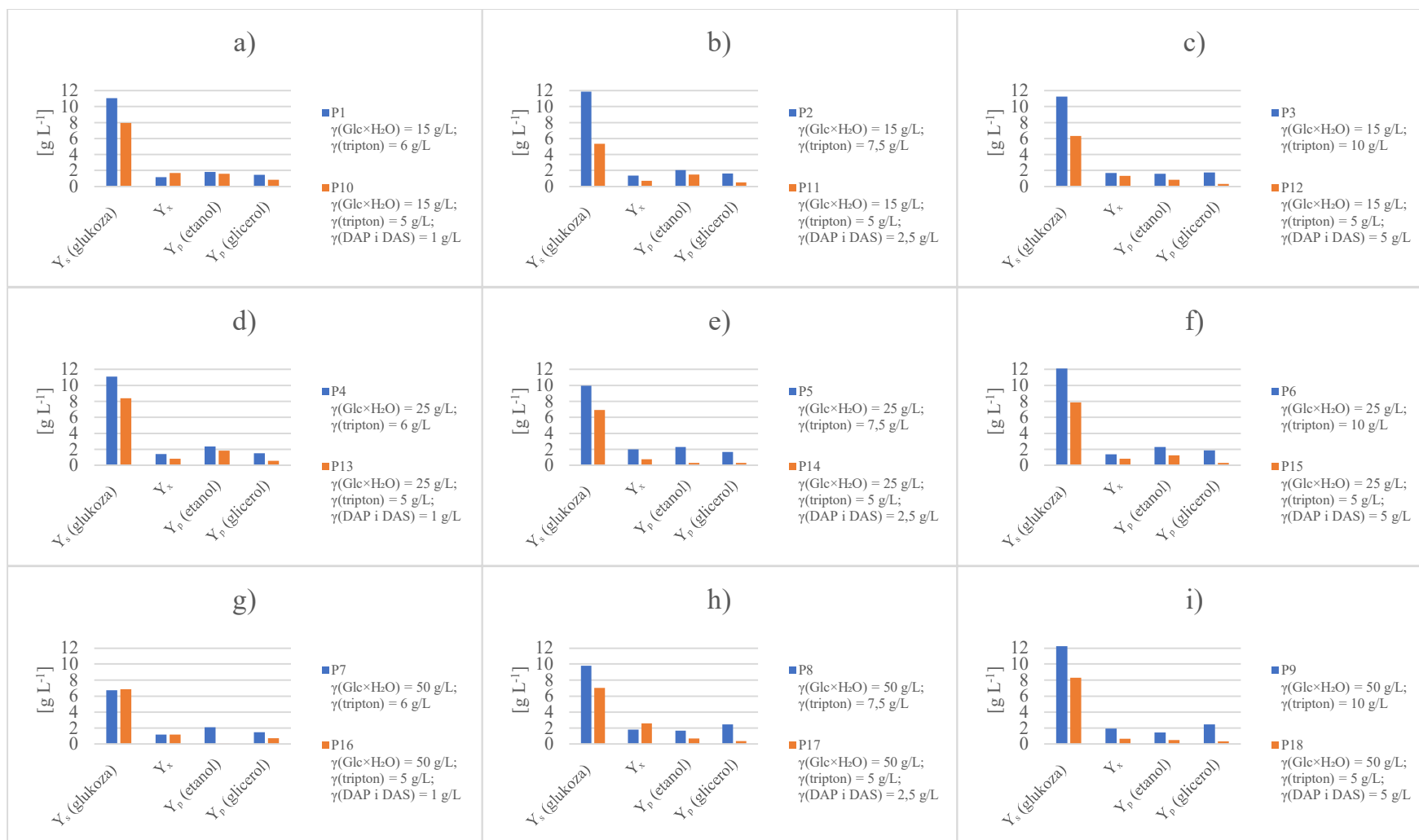
**Slika 11.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze) i 5 g L<sup>-1</sup> triptona: podloga P16 s 1 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (a); podloga P17 s 2,5 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (b); podloga P18s 5 g L<sup>-1</sup> DAP i DAS (c)



**Slika 12.** Usporedba potrošnje glukoze na kraju procesa, prinosa biomase i produkata za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 uz tri različite početne koncentracije glukoza monohidrata ( $\text{Glc} \times \text{H}_2\text{O}$ ), konstantnu koncentraciju triptona te tri različite koncentracije amonijevih soli



**Slika 13.** Usporedba potrošnje glukoze na kraju procesa, prinosa biomase i produkata za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 uz tri različite početne koncentracije glukoza monohidrata ( $\text{Glc} \times \text{H}_2\text{O}$ ), konstantnu koncentraciju triptona te tri različite početne koncentracije amonijevih soli



**Slika 14.** Usporedba parametara uspješnosti uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na triptonu kao samostalnom izvoru dušika i kombinaciji triptonu s anorganskim solima (amonijev hidrogenfosfat i amonijev sulfat) pri različitim koncentracijama glukoza monohidrata ( $\text{Glc} \times \text{H}_2\text{O}$ )

Najveći prinos biomase ( $Y_X$ ) od  $2,59 \text{ g L}^{-1}$  i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ) od  $0,37 \text{ g g}^{-1}$  dobiveni su uzgojem na podlozi 17 (slika 11b). Najveći prinos etanola ( $Y_{P(\text{etanol})}$ ) od  $1,83 \text{ g L}^{-1}$  postignut je uzgojem na podlozi 13, pri čemu je potrošeno i najviše glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ), tj.  $8,41 \text{ g L}^{-1}$  (slika 10a). Najveći koeficijent konverzije supstrata u etanol ( $Y_{P/S(\text{etanol})}$ ) od  $0,28 \text{ g g}^{-1}$  postignut je uzgojem na podlozi 11 (slika 9b).

Uz etanol, kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 proizveo je i određene količine glicerola, a najveći prinos od  $0,85 \text{ g L}^{-1}$  postignut je uzgojem na podlozi 10 (slika 9a). Pritom su također, kao proizvodi detektirani šećerni alkoholi ksilitol i arabitol, no njihovi prinosi uglavnom su zanemarivi, a najveći su postignuti uzgojem na podlozi s najvišom koncentracijom glukoze i amonijevih soli (podloga 18) (slika 11c). Pri tim uvjetima prinos ksilitola ( $Y_{P(\text{ksilitol})}$ ) iznosio je  $0,05 \text{ g L}^{-1}$ , a prinos arabitola ( $Y_{P(\text{arabitol})}$ )  $0,03 \text{ g L}^{-1}$ .

Kao i kod uzgoja na triptonu kao jedinom izvoru dušika, ni u jednim uvjetima uzgoja nije potrošena sva glukoza, dapače iskorištenja glukoze (prilog 4) su bila veća uzgojem na triptonu kao samostalnom izvoru dušika. U budućim istraživanjima trebalo bi pratiti uzgoj duži vremenski period, tj. do potpune potrošnje izvora ugljika kako bi se dobio i jasniji uvid utjecaja izvora i koncentracije dušika na metabolizam radnog mikroorganizma. Povećanjem početne koncentracije glukoze pada postotak iskorištene glukoze (slika 13, prilog 4), kao što je bio slučaj i za uzgoje bez amonijevih soli. Postoji nekoliko razloga zašto je inhibicija supstratom biološki relevantan regulacijski mehanizam. Prvo, u mnogim slučajevima maksimalna brzina enzimskih reakcija se postiže pri koncentracijama supstrata manjim od onih koje su prisutne u prirodnim staništima mikroorganizama, što ukazuje da ti enzimi djeluju uz inhibiciju supstratom. Drugo, mnogi enzimi imaju specijalizirana mjesta na kojima se druga molekula supstrata može vezati i djelovati kao alosterički inhibitor. Treće, inhibicija supstratom ima ključnu regulacijsku ulogu u nizu metaboličkih puteva (Reed i sur., 2010). U ovoj seriji eksperimenata, provedenoj s podlogama P10-P18, najveći postotci utrošene glukoze postignuti su uzgojem na podlogama s najvećim koncentracijama amonijevih soli ( $5 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog hidrogenfosfata i  $5 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog sulfata). Pri koncentraciji glukoza monohidrata od  $15 \text{ g L}^{-1}$  ( $13,64 \text{ g L}^{-1}$  glukoze), uzgojem na podlozi 12 iznosio je 63 % (slika 9c), što je ujedno i najviše za ovu seriju uzgoja, no za 22 % manje nego uzgojem na podlozi u kojoj je korišten tripton kao jedini izvor dušika (podloga 3) (slika 4c). Najmanje iskorištenje glukoze tijekom dvadesetčetverosatnog uzgoja iznosilo je samo 18 %, potrošeno je  $6,86 \text{ g L}^{-1}$  glukoze, a postignuto je na podlozi 16 (slika 11a). Za uzgoj kod kojeg je postignut najveći prinos biomase ( $Y_X$ ) i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ), na podlozi 17, potrošnja glukoze

iznosila je  $7,04 \text{ g L}^{-1}$  (slika 11b) tj. tijekom tog uzgoja potrošeno je 19 % glukoze. Potrošnja glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) za uzgoj kod kojeg je postignut najveći prinos etanola, na podlozi 13, iznosila je  $8,41 \text{ g L}^{-1}$  (slika 10a), što je ujedno i najveća potrošnja supstrata, a iznosi 39 % utrošene glukoze.

Na slikama 9-11 vidljivo je da su etanol i glicerol detektirani u nultom satu skoro svih uzgoja ove serije osim u podlozi P10, što znači da ih je kvasac proizveo tijekom propagacije inokuluma te su inokulacijom zajedno s biomasom dodani u podlogu. Također, na spomenutim grafičkim prikazima vidljive su fluktuacije koncentracije etanola u prvih 8 sati uzgoja, osobito za uzgoje na podlogama 10, 14, 17 i 18, čiji su grafički prikazi prikazani na slikama 9a, 10b te 11b,c. To može biti posljedica grešaka prilikom uzorkovanja i/ili provedbe analize. Pri istoj koncentraciji glukoze, zapaženo je da povećanje koncentracije amonijevih soli dovodi do pada prinosa glicerola. Ovo je osobito uočeno pri koncentraciji glukoza monohidrata  $15 \text{ g L}^{-1}$  (Slika 12.) Povećanjem koncentracije amonijevih soli pri istim koncentracijama glukoze na navedenoj slici nisu uočeni trendovi glede prinosa biomase.

Na slici 14 prikazana je usporedba parametara uspješnosti uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 uz tripton kao samostalan izvor dušika, odnosno uz kombinaciju triptona s anorganskim solima (amonijev hidrogenfosfat i amonijev sulfat) pri različitim koncentracijama glukoze. Slika 14a prikazuje usporedbu parametara uspješnosti pri uzgoju radnog mikroorganizma na podlozi P1 ( $15 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata tj.  $13,64 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $6 \text{ g L}^{-1}$  triptona) i podlozi P10 (ista koncentracija glukoze uz  $5 \text{ g L}^{-1}$  triptona,  $1 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog hidrogenfosfata i  $1 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog sulfata). Zamjena dijela organskog dušika anorganskim solima rezultirala je 43 % većim prinosom biomase, dok je prinos etanola ( $Y_{P(\text{etanol})}$ ) niži 11%. Potrošnja glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) niža je kada se dio organskog izvora dušika (tripton) zamijeni amonijevim solima, osim u jednom slučaju ovog istraživanja. Uzgojem na podlozi P7 ( $50 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata tj.  $45,46 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $6 \text{ g L}^{-1}$  triptona) i podlozi P16 (ista koncentracija glukoze uz  $5 \text{ g L}^{-1}$  triptona,  $1 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog hidrogenfosfata i  $1 \text{ g L}^{-1}$  amonijevog sulfata) potrošnja supstrata je podjednaka ( $6,72 \text{ g L}^{-1}$ , odnosno  $6,86 \text{ g L}^{-1}$ ), što je grafički prikazano na slici 14g. Također je pri tim uvjetima prinos biomase ( $Y_X$ ) isti za oba slučaja ( $1,19 \text{ g L}^{-1}$ ), dok je prinos etanola ( $Y_{P(\text{etanol})}$ ) u podlozi P16 zanemariv kad se usporedi s podlogom P7 s triptonom kao jedinim izvorom dušika. Za sve ostale slučajeve, kada je dio triptona zamijenjen amonijevim solima, potrošnja glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) se smanjila. Prinosi etanola i glicerola ( $Y_{P(\text{etanol})}$ ;  $Y_{P(\text{glicerol})}$ ) također su pali zamjenom dijela triptona amonijevim solima. Najveći prinos biomase ( $Y_X$ ), od  $2,59 \text{ g L}^{-1}$ , postignut je, kako je navedeno i ranije u tekstu, uzgojem na

podlozi P17 s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze), 5 g L<sup>-1</sup> triptona i 2,5 g L<sup>-1</sup> amonijevog hidrogenfosfata i amonijevog sulfata. Uzgojem na podlozi 8, pri istoj koncentraciji glukoze i 7,5 g L<sup>-1</sup> triptona (bez amonijevih soli), prinos biomase ( $Y_X$ ) manji je za 0,80 g L<sup>-1</sup> (slika 14h). Za sve ostale slučajeve, osim gore navedenih, a što je i vidljivo na slici 14, prinos biomase ( $Y_X$ ) je veći kada je izvor dušika samo tripton. To je u skladu s dijelom istraživanja Ai i sur. (2022), gdje zamjena amonijevih soli organskim izvorom dušika (glutamin ili asparagin) rezultira povećanjem koncentracije biomase. Prema navedenom radu, povećanje omjera kalijevih i amonijevih iona u hranjivoj podlozi pri višim temperaturama uzgoja rezultira povećanjem koncentracije biomase, a navedeno je detaljnije opisano u tekstu koji slijedi. Stoga se za daljnja istraživanja pri povišenim temperaturama može predložiti kombinacija amonijevih i kalijevih iona s organskim dušikom.

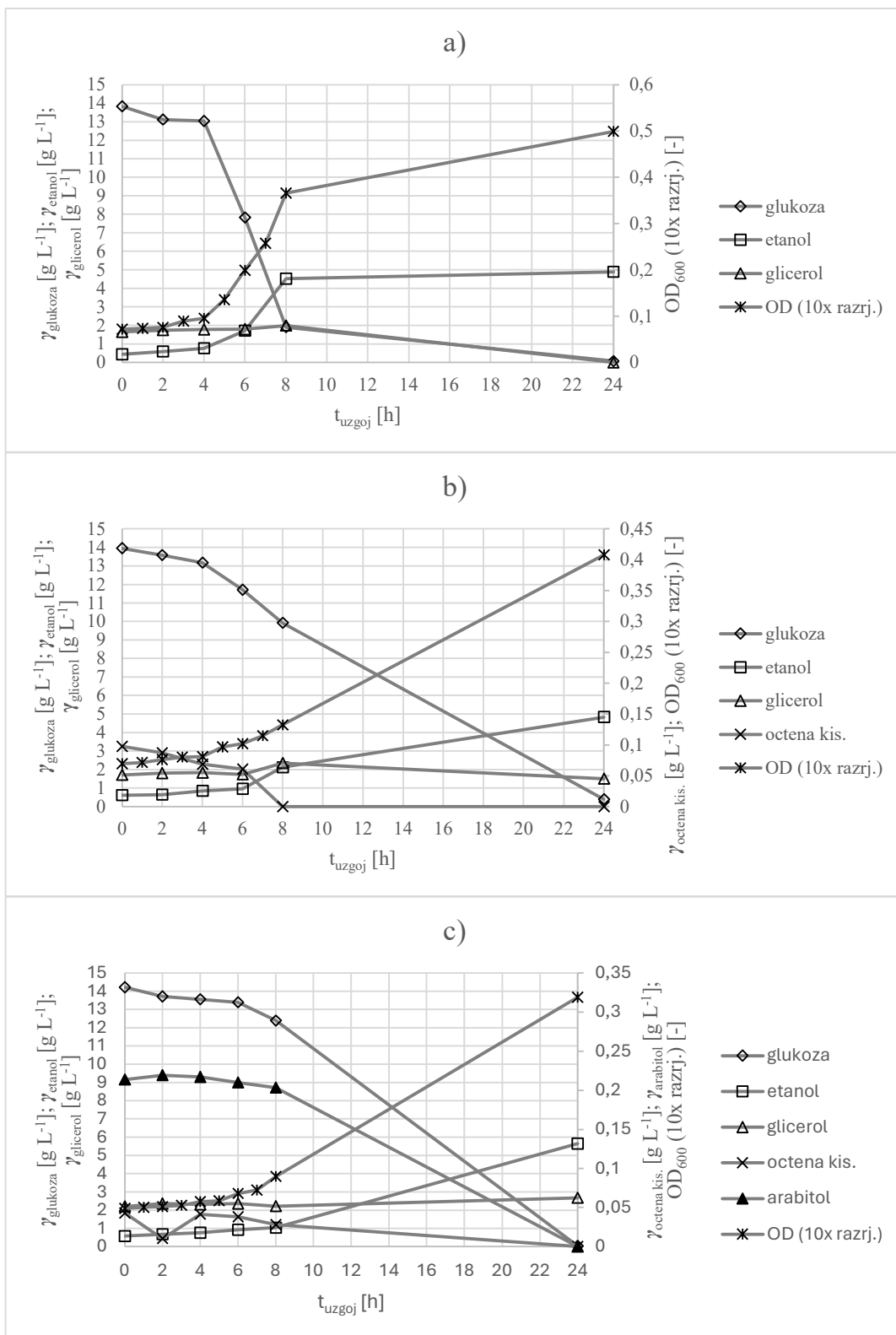
Ai i sur. (2022) istraživali su povezanost regulacije asimilacije i metabolizma amonijevih iona (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) s termotolerancijom kvasca *K. marxianus*. Naime, velike koncentracije amonijevih iona pri povišenim temperaturama povećavaju proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species, ROS*), toksičnih za stanice kvasca. U istraživanju je *K. marxianus* FIM-1 uzgajan je u laboratorijskom mjerilu u Erlenmeyerovim tikvicama pri 220 rpm te pri dvije različite temperature (30 i 45 °C). Uzgoji su provedeni na YPD podlozi (10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 20 g L<sup>-1</sup> glukoze i 20 g L<sup>-1</sup> polipeptona) i sintetskoj podlozi (10 g L<sup>-1</sup> glukoze, 5 g L<sup>-1</sup> amonijevog sulfata, 3 g L<sup>-1</sup> kalijevog dihidrogenfosfata; 0,244 g L<sup>-1</sup> magnezijevog sulfata, uz dodatak vitamina i elemenata u tragovima. Koncentracija i izvor dušika sintetske podloge mijenjani su tijekom provedbe eksperimenta, dok su ostali sastojci podloge ostali nepromijenjeni. Uzgojem pri 30 °C na YPD podlozi, optička gustoća (OD<sub>600</sub>), kao indirektni pokazatelj rasta biomase, otprilike je 2 puta veća nego pri uzgoju na sintetskoj podlozi. Kvasac *K. marxianus* FIM-1 uzgojem na sintetskoj podlozi pri 30 °C do 12. sata uzgoja metabolizira svu glukozu i pritom te proizvede preko 2 g L<sup>-1</sup> etanola te 0,1 g L<sup>-1</sup> glicerola (Ai i sur., 2022). Nakon potpunog utroška glukoze, kvasac nakon 12. sata počinje metabolizirati etanol i glicerol. Nadalje, ovi autori su istražili utjecaj koncentracije amonijevog sulfata (od 0 g L<sup>-1</sup> do 10 g L<sup>-1</sup>) u sintetskoj podlozi na rast kvasca pri 30 i 45 °C. Povećanje koncentracije amonijevog sulfata u sintetskoj podlozi pospješuje rast kvasca *K. marxianus* FIM-1. Međutim, pri koncentraciji amonijevog sulfata od 10 g L<sup>-1</sup>, dvostruko više od one koja se pokazala kao optimalna u datim uvjetima istraživanja Ai i sur. (2022), optička gustoća stanica (OD<sub>600</sub>) smanjuje se za 17,3 % pri 30 °C odnosno 42,1 % pri 45 °C, što upućuje na to da višak amonijevih iona inhibira rast kvasca i pri umjerenim temperaturama (30 °C). Zamjena amonijevog sulfata organskim



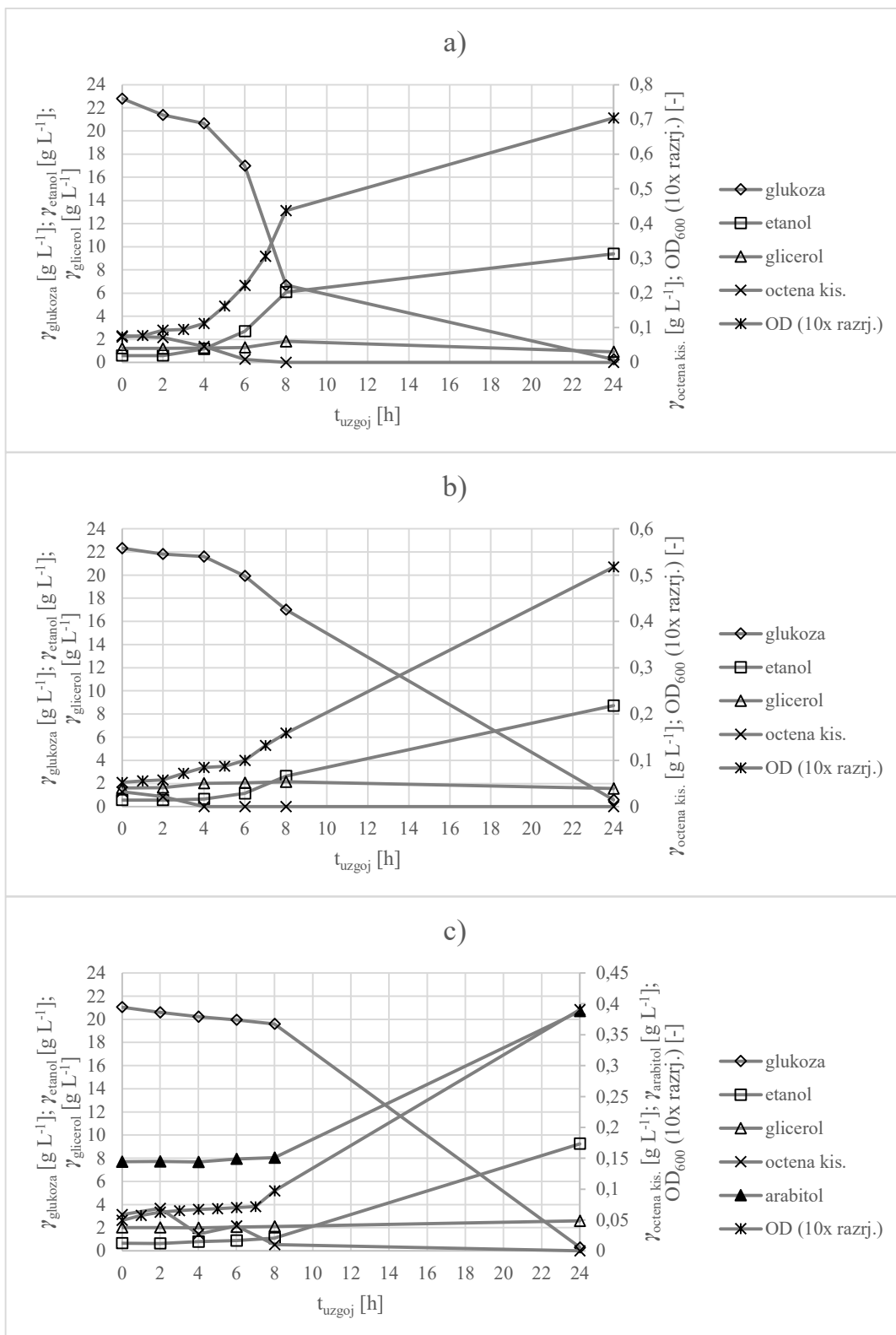
izvorom dušika ( $5 \text{ g L}^{-1}$  glutamina ili asparagina) rezultira većom koncentracijom biomase, što je osobito istaknuto pri većoj temperaturi tj. pri  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . U kvascima se unos  $\text{NH}_4^+$  iona natječe s transportom  $\text{K}^+$  iona, a povećanje koncentracije kalijevih iona može inhibirati unos  $\text{NH}_4^+$  i ublažiti toksičnost njegove visoke koncentracije. Pri  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , povećanje koncentracije  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s  $1,5$  na  $12 \text{ g L}^{-1}$  negativno utječe na rast odabranog soja FIM-1, no zanimljiviji je utjecaj pri višim temperaturama, konkretno pri  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , što rezultira utrostručenjem  $\text{OD}_{600}$  kada se koncentracija  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u sintetskoj podlozi poveća s  $1,5$  na  $12 \text{ g L}^{-1}$  (Ai i sur., 2022).

#### **4.3. UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE I KUKURUZNE MOČEVINE**

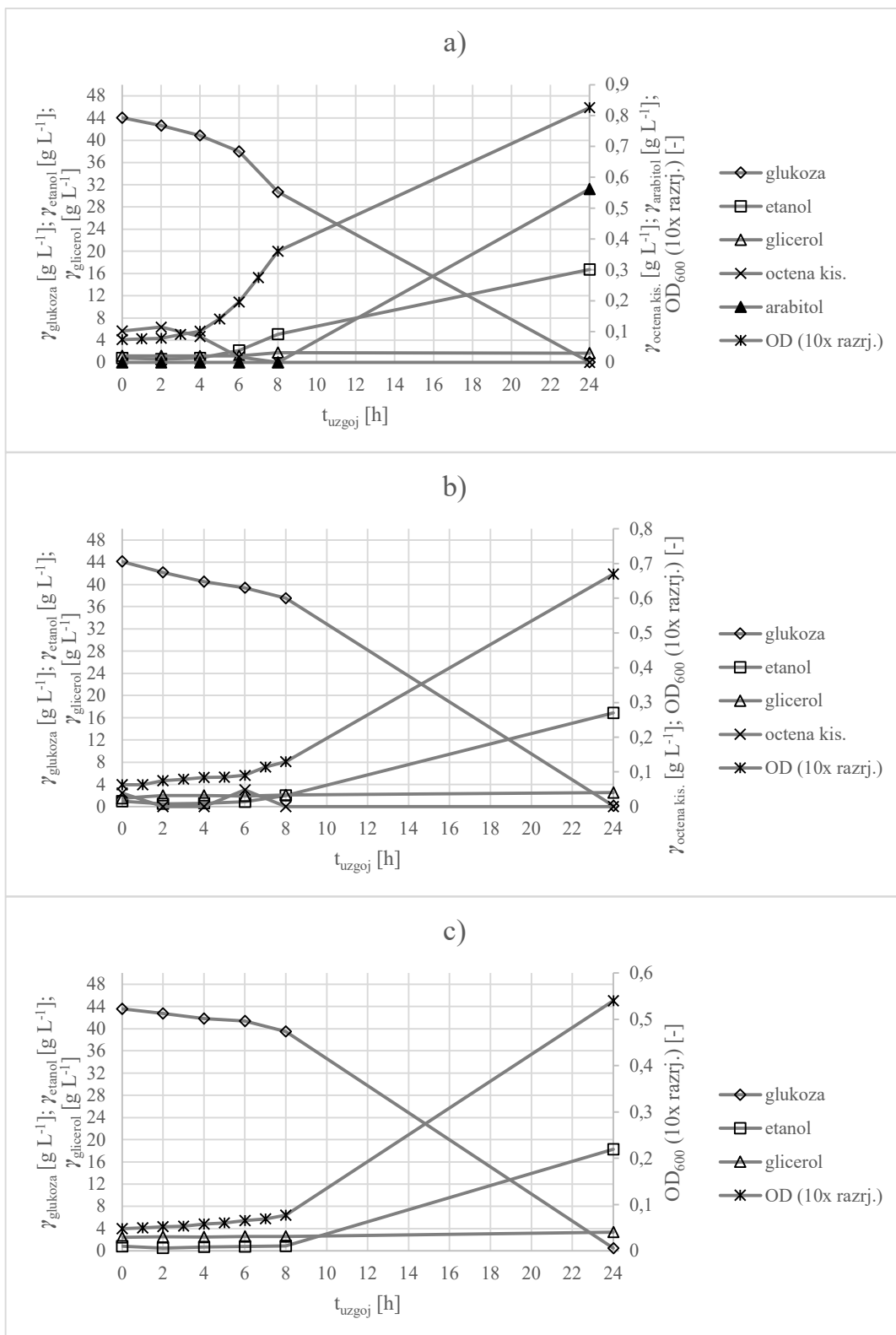
Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na kukuruznoj močevini proveden je kako bi se istražio rast radnog mikroorganizma na održivom i jeftinijem izvoru dušika. Grafički prikazi koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja na podlogama s  $15\text{-}50 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata i  $10\text{-}20 \text{ g L}^{-1}$  CSL-a prikazani su na slikama 15-17. Slike 18 i 19 prikazuju grafičku usporedbu parametara uspješnosti vođenja procesa, a brojčane vrijednosti parametara tablično su prikazane u prilogu 5.



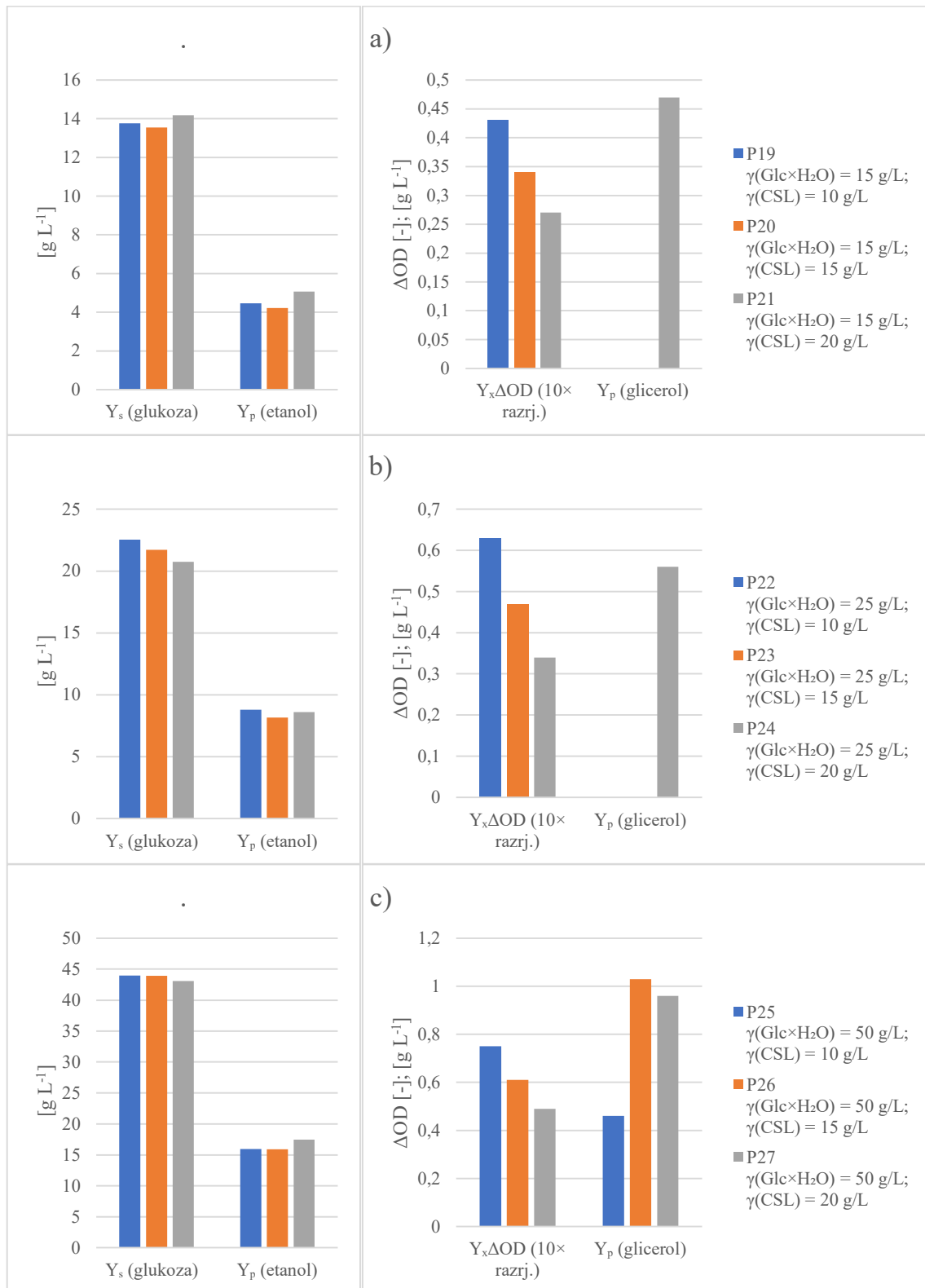
**Slika 15.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 15 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (13,64 g L<sup>-1</sup> glukoze): podloga P19 s 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a (a); podloga P20 s 15 g L<sup>-1</sup> CSL-a (b); podloga P21 s 20 g L<sup>-1</sup> CSL-a (c)



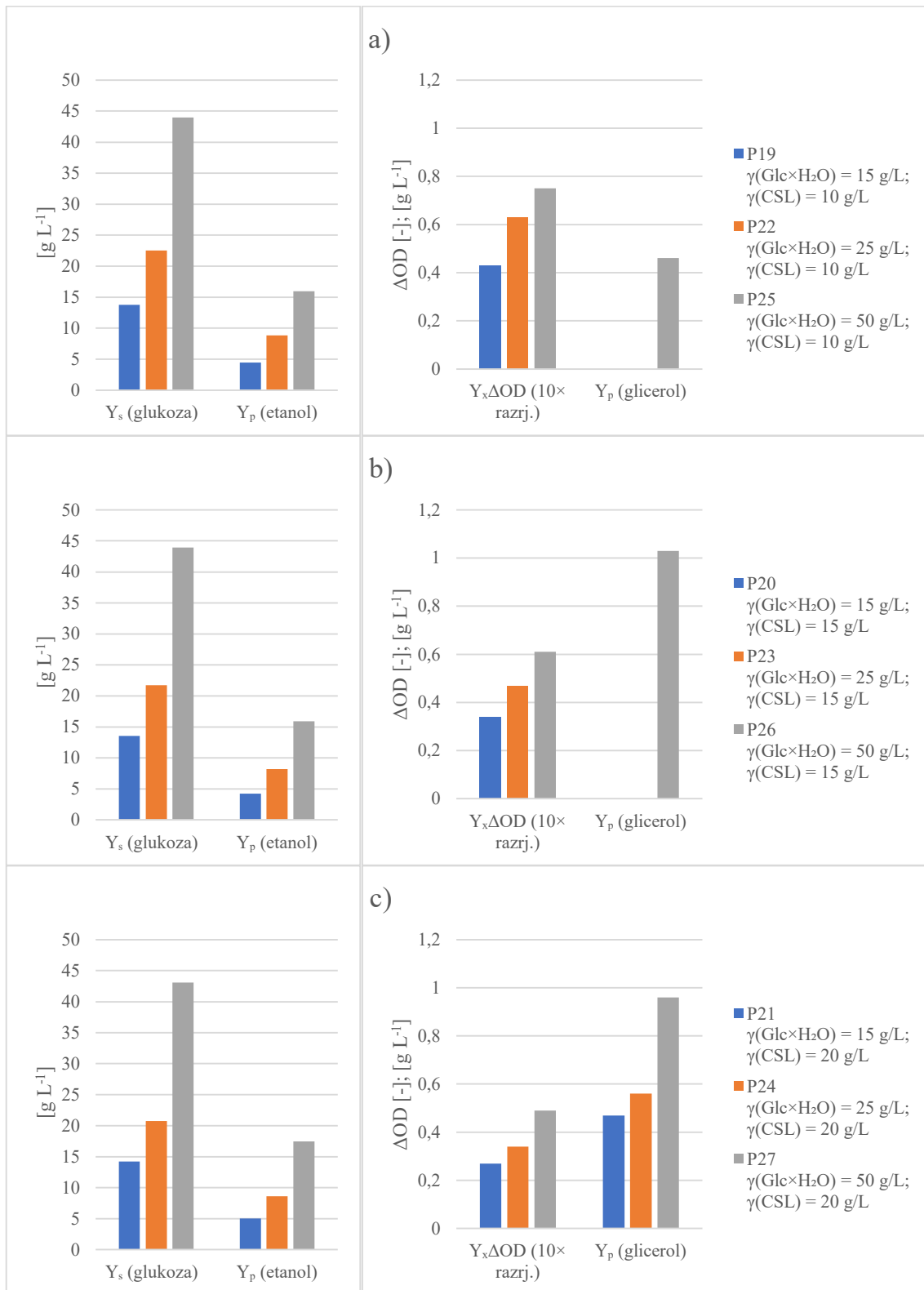
**Slika 16.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (22,73 g L<sup>-1</sup> glukoze): podloga P22 s 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a (a); podloga P23 s 15 g L<sup>-1</sup> CSL-a (b); podloga P24 s 20 g L<sup>-1</sup> CSL-a (c)



**Slika 17.** Koncentracije biomase, supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 50 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata (45,46 g L<sup>-1</sup> glukoze): podloga P25 s 10 g L<sup>-1</sup> CSL-a (a); podloga P26 s 15 g L<sup>-1</sup> CSL-a (b); podloga P27 s 20 g L<sup>-1</sup> CSL-a (c)



**Slika 18.** Usporedba potrošnje glukoze te prinosa biomase i produkata za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na tri različite početne koncentracije glukoza monohidrata (Glc×H<sub>2</sub>O) uz različite početne koncentracije CSL-a



**Slika 19.** Usporedba potrošnje glukoze te prinosa biomase i produkata za uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 za tri različite početne koncentracije CSL-a uz promjenu početne koncentracije glukoza monohidrata ( $\text{Glc}\times\text{H}_2\text{O}$ )

Budući da je gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase i spektrofotometrijsko određivanje optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) nerazrijeđenih uzoraka bilo onemogućeno zbog taloga prisutnog u kukuruznoj močevini, promjena koncentracije biomase praćena je mjerenjem optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) uzoraka razrijeđenih 10 puta. Prema tome, prinos biomase izražen je kao razlika uzoraka uzetih u posljednjem i nultom satu uzgoja razrijeđenih 10 puta ( $Y_{X(\Delta OD)} 10\times$  razrj.).

Za razliku od prethodno opisanih eksperimenata u ovom radu, u kojima su izvori dušika bili tripton odnosno kombinacija triptona s amonijevim solima, uzgojem na kukuruznoj močevini kao jedinom izvoru dušika znatno je povećano iskorištenje glukoze koja je skoro u potpunosti potrošena. Prema Liu i sur. (2015), sastojci kukuruzne močevine imaju pozitivan učinak na metabolizam ugljika te se kod kvasca *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b dodatkom CSL u podlogu povećava potrošnja glukoze. Tijekom 24 sata uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na različitim koncentracijama glukoze i CSL, radni mikroorganizam je metabolizirao gotovo svu glukožu. Primjerice, uzgojem na podlozi 25, početnog sastava  $50\text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata ( $45,46\text{ g L}^{-1}$  glukoze) i  $10\text{ g L}^{-1}$  CSL, kvasac je metabolizirao preko 99 % glukoze (slika 17a, prilog 5), što je ujedno i najveće iskorištenje izvora ugljika u ovom radu. Najmanje iskorištenje glukoze u ovoj seriji uzgoja, ali još uvijek vrlo visoko, koje je iznosilo preko 97 %, postignuto je uzgojem na podlozi 20, početnog sastava  $15\text{ g L}^{-1}$  glukoze monohidrata ( $13,64\text{ g L}^{-1}$  glukoze) i  $15\text{ g L}^{-1}$  CSL-a (slika 15b, prilog 5). Budući da je u svim eksperimentima provedenim uz dodatak CSL-a potrošena gotovo sva glukoza, potrošnja glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) proporcionalna je početnim koncentracijama glukoze, što je i vidljivo na slici 19, a najveća je izmjerena za podlogu 25 i iznosila je oko  $44\text{ g L}^{-1}$  (slika 17a), pri kojoj je postignuto i najveće iskorištenje glukoze. No, vidljivo je iz slika 15-17 da je potrošnja glukoze ( $Y_{S(\text{glukoza})}$ ) prvih osam sati uzgoja obrnuto proporcionalna početnoj koncentraciji CSL-a. Tako je uzgojem na podlogama s 15, 25, odnosno  $50\text{ g/L}$  glukoza monohidrata u prisutnosti  $10\text{ g L}^{-1}$  CSL-a u prvih osam sati radni mikroorganizam metabolizirao od  $11,92\text{ g L}^{-1}$  do  $16,13\text{ g L}^{-1}$  glukoze (slike 15a, 16a i 17a); na podlogama s  $15\text{ g L}^{-1}$  CSL-a od  $4,02\text{ g L}^{-1}$  do  $6,61\text{ g L}^{-1}$  (slike 15b, 16b i 17b) te na podlogama s  $20\text{ g L}^{-1}$  CSL-a od  $1,43\text{ g L}^{-1}$  do  $4,07\text{ g L}^{-1}$  glukoze (slike 15c, 16c i 17c).

Pri manjim početnim koncentracijama CSL-a i jednakim koncentracijama glukoze veći je i prinos biomase ( $Y_{X(\Delta OD)} 10\times$  razrj.), što je prikazano na slici 18. Uzgojem na podlogama s  $15\text{ g L}^{-1}$ ,  $25\text{ g L}^{-1}$  i  $50\text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata te povećanjem početne koncentracije CSL-a s 10 na  $20\text{ g/L}$ , prinos biomase ( $Y_{X(\Delta OD)} 10\times$  razrj.) pao je na 63%, 54% odnosno na 65% od početnog. Povećanjem početne koncentracije glukoze, pri istim koncentracijama CSL-a, prinos

biomase ( $Y_{X(\Delta OD)} 10\times$  razrj.) raste, što je vidljivo sa slike 19. Uzgojem na podlogama s  $10\text{ g L}^{-1}$  CSL-a te povećanjem početne koncentracije glukoze prinos biomase ( $Y_{X(\Delta OD)} 10\times$  razrj.) porastao je za 74% (P19, P22, P25); na podlogama s  $15\text{ g L}^{-1}$  CSL-a (P20, P23, P26) za 79 %; a na podlogama s  $20\text{ g L}^{-1}$  CSL-a (P21, P24, P27) za 81 %. Najveći prinos biomase ( $Y_{X(\Delta OD)} 10\times$  razrj.) kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 ostvario je na podlozi P25, početnog sastava  $50\text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata ( $45,46\text{ g L}^{-1}$  glukoze) i  $10\text{ g L}^{-1}$  CSL-a, a iznosio je 0,75; dok je najmanji iznosio 36 % od maksimalne vrijednosti i postignut je na podlozi P21, početnog sastava  $15\text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata ( $13,64\text{ g L}^{-1}$  glukoze) i  $20\text{ g L}^{-1}$  CSL-a.

U ovom istraživanju, kukuruzna močevina pokazala se kao najbolji izvor dušika za proizvodnju etanola pomoću kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. Iz literature je poznato da CSL pospješuje proizvodnju etanola i kod kvasca *S. cerevisiae* i bakterije *Clostridium* sp. (Zhou i sur., 2022). U našem radu je uzgojem na podlozi P27 s najvišim koncentracijama glukoze i CSL-a postignut prinos etanola ( $Y_P(\text{etanol})$ ) od  $17,45\text{ g L}^{-1}$ . To je otprilike 7,5 puta više nego najveći prinos etanola postignut uzgojem na glukozi i triptonu (P4), odnosno otprilike 9,5 puta više od najvećeg prinosa etanola postignutom na podlozi (P13) s glukozom i kombinacijom triptonu s amonijevim solima. Kako je vidljivo iz slike 19, prinos etanola raste s povećanjem početne koncentracije glukoze pri istim koncentracijama CSL. S druge strane, pri istim početnim koncentracijama glukoze i povećanjem koncentracije CSL-a razlike u prinosu etanola nisu toliko velike – na podlogama s  $15\text{ g L}^{-1}$  i  $25\text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata su manje od  $1\text{ g L}^{-1}$ , dok na podlogama s  $50\text{ g L}^{-1}$  odudara samo podloga s najvećim prinosom (za nešto više od  $1,5\text{ g L}^{-1}$  etanola), a što je vidljivo sa slike 18. Na slikama 15-17 jasno se vidi da je koncentracija prvih 6 do 8 sati uzgoja konstantna te su u posljednjem satu uzgoja detektirane veće vrijednosti. Za bolje razumijevanje procesa trebalo bi pratiti koncentraciju etanola češćim uzorkovanjem.

Radni mikroorganizam proizveo je glicerol još u fazi umnožavanja inokuluma te je na početku fermentacije bilo prisutno oko  $1,5\text{--}2,5\text{ g L}^{-1}$  glicerola (slike 15-17). Koncentracije glicerola uglavnom su ostale konstantne ili ga je kvasac metabolizirao do kraja uzgoja, osim na podlogama s najvećim koncentracijama CSL i glukoze, gdje je na kraju uzgoja zabilježen porast njegove koncentracije (podloge P21, P24 - P27). Najveći prinos glicerola ( $Y_P(\text{glicerol})$ ) kvasac je ostvario uzgojem na podlozi s  $50\text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata ( $45,46\text{ g L}^{-1}$  glukoze) i  $20\text{ g L}^{-1}$  CSL-a (P27), a iznosio je  $1,03\text{ g L}^{-1}$ . Uzgojem na podlozi s najmanje glukoze i najmanje CSL-a (P19), *K. marxianus* NBRC 1777 glicerol je potrošio do posljednjeg sata uzgoja.

U nultom satu uzgoja kod nekih podloga (slike 15-17) detektirana je i octena kiselina, u koncentracijama nižim od  $0,1\text{ g L}^{-1}$  te je do kraja uzgoja njena koncentracija pala na nulu.



Također, u nultom satu uzgoja na podlogama s 15 i 25 g L<sup>-1</sup> glukoza monohidrata i 20 g L<sup>-1</sup> CSL-a (P21, P24) detektiran je arabitol u koncentracijama od 0,21 g L<sup>-1</sup>, odnosno 0,14 g L<sup>-1</sup>. U prvom slučaju do kraja uzgoja arabitol se više nije mogao detektirati dok je u drugom slučaju njegova koncentracija porasla do 0,39 g L<sup>-1</sup>. U podlozi P25 je detektiran arabitol, no radilo se o zanemarivim koncentracijama (slike 15-17).

Kao primjer korištenja CSL kao komponente hranjive podloge za kvasac *K. marxianus* CDB 002 već su ranije spomenuti Furlan i sur. (2000), međutim njihovi su rezultati teško usporedivi s rezultatima za podloge s CSL-om koji su dobiveni u ovom radu. Razlike su u korištenim sojevima kvasca *K. marxianus*, izvorima ugljika, početnim koncentracijama izvora ugljika i CSL koje su kod njih istraživane u rasponu 50 – 200 g L<sup>-1</sup> u kombinaciji s trščanom melasom, uvjetima rasta te u ciljnom proizvodu koji je u našem slučaju prvenstveno biomasa te potom proizvedeni metaboliti, a u njihovom je  $\beta$ -D-galaktozidaza.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata tijekom provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Istraživanjem rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na različitim koncentracijama glukoze i triptona, najveći prinos biomase ( $1,99 \text{ g L}^{-1}$ ) i koeficijent konverzije glukoze u biomasu ( $0,20 \text{ g g}^{-1}$ ) postignuti su uzgojem na podlozi P5 ( $25 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata,  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  triptona).
2. Kombinacija triptona kao organskog izvora dušika s amonijevim solima kao anorganskim izvorima dušika uglavnom je dovela do smanjenja parametara uspješnosti vođenja procesa. No, uzgojem na podlozi P17 ( $50 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata,  $5 \text{ g L}^{-1}$  triptona,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  amonijev hidrogenfosfat,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  amonijev sulfat) postignut je prinos biomase  $2,59 \text{ g L}^{-1}$ , što je više nego na bilo kojoj podlozi s triptonom kao jedinim izvorom dušika.
3. Poznato je da kukuruzna močevina ima nisku cijenu i sastav povoljan za formuliranje hranjivih podloga za uzgoj mikroorganizama. U hranjivim podlogama s CSL proizvedene su znatno veće količine etanola, čiji je najveći prinos ( $17,45 \text{ g L}^{-1}$ ) postignut na podlozi P27 ( $50 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata i  $20 \text{ g L}^{-1}$  CSL). Zbog taloga prisutnog u kukuruznoj močevini javlja se analitički problem budući da se koncentracija biomase ne može odrediti gravimetrijski te je moguće pratiti porast biomase samo spektrofotometrijski, praćenjem optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) razrijeđenih uzoraka. Najveća  $OD_{600}$  izmjerena je u podlozi P25 ( $50 \text{ g L}^{-1}$  glukoza monohidrata i  $10 \text{ g L}^{-1}$  CSL).
4. Kao najbolji od istraženih izvora dušika za rast kvasca pokazala se kukuruzna močevina te jedino u njezinoj prisutnosti nije bilo limitacije dušikom te je glukoza tijekom uzgoja skoro potpuno potrošena. Potom slijedi tripton korišten kao jedini izvor dušika, pri čemu ni u jednoj od podloga s triptonom kao jedinim dušikovim izvorom nije potrošena sva glukoza. Najlošiji je rast biomase postignut u podlogama koje su kao izvor dušika sadržavale kombinaciju triptona i amonijevih soli te je u ovim podlogama na kraju uzgoja ostalo najviše nefermentirane glukoze.
5. Na većini istraženih hranjivih podloga najzastupljeniji proizvod metabolizma kvasca bio je etanol, a slijedio ga je glicerol, no koncentracije ovih spojeva bile su ekonomski neisplative jer su podloge u ovom radu optimirane prvenstveno za proizvodnju biomase kvasca.

## 6. LITERATURA

- Ai Y, Luo T, Yu Y, Zhou J, Lu H (2022) Downregulation of ammonium uptake improves the growth and tolerance of *Kluyveromyces marxianus* at high temperature. *MicrobiologyOpen*, **11**(3), e1290. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1290>
- Ariyanti D, Aini AP, Pinundi DS (2014) Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Procedia* **47**, 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.203>
- Azizi-Shotorkhoft A, Sharifi A, Mirmohammadi D, Baluch-Gharaei H, Rezaei J (2016) Effects of feeding different levels of corn steep liquor on the performance of fattening lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **100**(1), 109-117. <https://doi.org/10.1111/jpn.12342>
- Baptista M, Domingues L (2022) *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnol Adv* 108027. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108027>
- Bilal M, Ji L, Xu Y, Xu S, Lin Y, Iqbal H, i sur. (2022) Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a robust host for industrial biotechnology. *Front bioeng biotechnol* **10**, 851768. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>
- Braga ARC, Manera AP, da Costa Ores J, Sala L, Maugeri, F i Juliano Kalil, S (2013). Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified  $\beta$ -Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides. *Food Technol Biotechnol*, **51**(1), 45-52. <https://hrcak.srce.hr/99746>
- Broach JR (2012) Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* **192**(1), 73-105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R (2010) The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Factories* **9**(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-3>
- Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM (2017) Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* **17**(4), fox036. <https://doi:10.1093/femsyr/fox036>

- Donzella L, Varela JA, Sousa MJ, Morrissey JP (2021) Identification of novel pentose transporters in *Kluyveromyces marxianus* using a new screening platform. *FEMS Yeast Res.* **21**(4), foab026. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab026>
- Drumonde-Neves J, Fernandes T, Lima T, Pais C, Franco-Duarte R (2021) Learning from 80 years of studies: A comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Res.* **21**(3), foab017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>
- Fonseca GG, Gombert AK, Heinzle E, Wittmann C (2007) Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Res.* **7**(3), 422-435. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00192.x>
- Furlan SA, Schneider AL, Merkle R, de Fátima Carvalho-Jonas M, Jonas R (2000) Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of  $\beta$ -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* **22**(7), 589-593. <https://doi.org/10.1023/A:1005629127532>
- Gao Y, Yuan YJ (2011) Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-l-gulonic acid fermentation. *J. Agric Food Chem* **59**(18), 9845-9853. <https://doi.org/10.1021/jf201792u>
- Guo ZP, Zhang L, Ding ZY, Shi GY (2011) Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. *Metab Eng*, **13**(1), 49-59. <https://doi.org/10.1021/jf201792u>
- Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Huang CC (2020) *Kluyveromyces marxianus*: Current state of omics studies, strain improvement strategy and potential industrial implementation. *Fermentation* **6**(4), 124. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040124>
- Hofer A, Hauer S, Kroll P, Fricke J, Herwig C (2018) In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum*. *Process biochemistry* **70**, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.008>
- Jiao Y, Chen HD, Han H, Chang Y (2022) Development and Utilization of Corn Processing by-Products: A Review. *Foods* **11**(22), 3709. <https://doi.org/10.3390/foods11223709>

- Johnson, EA (2013a) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 503-517. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>
- Johnson, EA (2013b) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7563-7577. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5046-z>
- Karim A, Gerliani N, Aïder M. (2020) *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int. J. Food Microbiol.* **333**, 108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
- Kaselj M (2023) Utjecaj izvora ugljika na rast i proizvodnju šećernih alkohola tijekom uzgoja odabranih sojeva *Kluyveromyces* kvasaca (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Lacerda MP, Oh EJ, Eckert C (2020) The model system *Saccharomyces cerevisiae* versus emerging non-model yeasts for the production of biofuels. *Life* **10**(11), 299. <https://doi.org/10.3390/life10110299>
- Leonel LV, Arruda PV, Chandel AK, Felipe MGA, Sene L (2021) *Kluyveromyces marxianus*: A potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. *Crit Rev Biotechnol* **41**(8), 1131-1152. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1917505>
- Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, Suzuki Y, Rodrussamee N, Matsutani M, i sur. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnology for biofuels* **8**, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0227-x>
- Liu X, Wang X, Xu J, Xia J, Lv J, Zhang T, i sur. (2015) Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. *Ind Crops Prod* **78**, 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.029>
- Löser C, Urit T, Keil P, Bley T (2015). Studies on the mechanism of synthesis of ethyl acetate in *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 1131-1144. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6098-4>
- Ljungdahl PO (2009) Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* **37**(1), 242–247. <https://doi.org/10.1042/BST0370242>

- Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B (2012) Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**(3), 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Macedo JVC, de Barros Ranke FF, Escaramboni B, Campioni TS, Núñez EGF, de Oliva Neto P (2020) Cost-effective lactic acid production by fermentation of agro-industrial residues. *Biocatal Agric Biotechnol* **27**, 101706. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101706>
- Mardetko N, Novak M, Trontel A, Grubišić M, Galić M, Šantek B (2018) Bioethanol production from dilute-acid pre-treated wheat straw liquor hydrolysate by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biochem Eng Q* **32**(4), 483-499. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1409>
- Martynova J, Kokina A, Kibilds J i sur. (2016). Effects of acetate on *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 growth and metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 4585–4594. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7392-0>
- Mo W, Wang M, Zhan R, Yu Y, He Y, Lu H (2019) *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways. *Biotechnol biofuels bioprod* **12**(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1393-z>
- Nath A, Mondal S, Chakraborty S, Bhattacharjee C, Chowdhury R (2014) Production, purification, characterization, immobilization, and application of  $\beta$ -galactosidase: a review. *Asia-Pac J Chem Eng* **9**(3), 330-348. <https://doi.org/10.1002/apj.1801>
- Nurcholis M, Lertwattanasakul N, Rodrussamee N, Kosaka T, Murata M, Yamada M (2020) Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**(2), 475-488. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10224-3>
- Ochoa-Chacón A, Martínez A, Poggi-Varaldo HM, Villa-Tanaca L, Ramos-Valdivia AC, Ponce-Noyola T (2022) Xylose metabolism in bioethanol production: *Saccharomyces cerevisiae* vs non-*Saccharomyces* yeasts. *Bioenergy Res* **15**, 915-923. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>

- Pentjuss A, Stalidzans E, Liepins J, Kokina A, Martynova J, Zikmanis P i sur. (2017) Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol* **44**(8), 1177-1190. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1946-8>
- 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**(6), fov053. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Reed MC, Lieb A, Nijhout HF (2010) The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays* **32**(5), 422-429. <https://doi.org/10.1002/bies.200900167>
- Risso F, Rochón E, Cebreiros F, Ferrari MD, Lareo C (2020) Effect of corn steep liquor on butanol fermentation of eucalyptus cellulose enzymatic hydrolysate. *Ind Biotechnol* **16**(2), 99-106. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0036>
- Rollero S, Bloem A, Ortiz-Julien A, Bauer FF, Camarasa C, Divol B (2019) A comparison of the nitrogen metabolic networks of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Microbiol* **21**(11), 4076-4091. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14756>
- Romanin DE, Llopis S, Genovés S, Martorell P, Ramón VD, Garrote GL, i sur. (2016) Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in in vivo models. *Benef Microbes* **7**(1), 83-93. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0066>
- Saini P, Beniwal A, Malik RK, Vij S (2017) Comparative physiology of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* during batch cultivation on glucose as a sole carbon source. *Indian J Dairy Sci* **70**(4), 427-433. <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJDS/article/view/65948>
- Sharma S, Nair A, Sarma, SJ (2021) Biorefinery concept of simultaneous saccharification and co-fermentation: Challenges and improvements. *Chem Eng Process: Process Intensif.* **169**, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108634>

- Singh N, Gaur S (2021) GRAS fungi: A new horizon in safer food product. U: Dai X, Sharma M, Chen J (ured.) *Fungi in Sustainable Food Production*, Springer Nature Switzerland AG, Cham, str. 27-37. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64406-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64406-2_3)
- Tan JP, Jahim JM, Wu TY, Harun S, Mumtaz T (2016) Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. U: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **36**, (1), p. 012058. IOP Publishing Ltd. International Conference on Chemical and Bioprocess Engineering 9–12 December 2015, Kota Kinabalu, Malaysia. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012058>
- Trapala J, Bustos-Jaimes I, Manzanares P, Bárzana E, Montiel C (2020) Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse. *Protein Expr Purif* **176**, 105718. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105718>
- Varela JA, Gethins L, Stanton C, Ross P, Morrissey JP (2017) Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. *Yeast diversity in human welfare*, 439-453. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_17)
- Varela JA, Puricelli M, Montini N, Morrissey JP (2019) Expansion and diversification of MFS transporters in *Kluyveromyces marxianus*. *Front microbiol* **9**, 3330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03330>
- Wahjudi SMW, Petrzik T, Oudenne F, Lera Calvo C, Büchs J (2023) Unraveling the potential and constraints associated with corn steep liquor as a nutrient source for industrial fermentations. *Biotechnol Prog* **39**(6), e3386. <https://doi.org/10.1002/btpr.3386>
- Zhang B, Ren L, Wang H, Xu D, Zeng X i Li F (2020). Glycerol uptake and synthesis systems contribute to the osmotic tolerance of *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **140**, 109641. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109641>
- Zhou K, Yu J, Ma Y, Cai L, Zheng L, Gong W i sur. (2022) Corn steep liquor: green biological resources for bioindustry. *Appl Biochem Biotechnol* **194**(7), 3280-3295. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03904-w>



## PRILOZI

**Prilog 1.** Standardi korišteni za UPLC analizu

<b>tr [min]</b>	<b>SPOJ</b>	<b>JEDNADŽBA BAŽDARNOG PRAVCA</b>	<b>R<sup>2</sup> [-]</b>
5,480	glukoza	Area = 140381,12 $\gamma_{\text{glukoza}}$ - 157,58	1,0000
6,683	arabitol	Area = 133897,92 $\gamma_{\text{arabitol}}$ + 192,30	1,0000
6,827	ksilitol	Area = 141414,03 $\gamma_{\text{ksilitol}}$ + 799,15	1,0000
7,692	glicerol	Area = 115438 $\gamma_{\text{glicerol}}$ + 2603,5	0,9999
7,683	octena kiselina	Area = 57358 $\gamma_{\text{octena kis.}}$ + 697,25	0,98
9,374	etanol	Area = 484161 $\%(v/v)_{\text{etanol}}$ + 737,97	0,9999

**Prilog 2.** Priprema uzoraka za UPLC analizu (razrjeđivanje i taloženje otopinom cinkova sulfata)

<b>PODLOGA (oznaka)</b>	<b>Volumen uzorka za UPLC analizu [μL]</b>	<b>Volumen otopine cinkova sulfata [μL]</b>	<b>RAZRJEĐENJE</b>
Podloga 1 (P1)	500	1500	×4
Podloga 2 (P2)	500	1500	×4
Podloga 3 (P3)	500	1500	×4
Podloga 4 (P4)	500	1500	×4
Podloga 5 (P5)	500	1500	×4
Podloga 6 (P6)	500	1500	×4
Podloga 7 (P7)	400	1600	×5
Podloga 8 (P8)	400	1600	×5
Podloga 9 (P9)	400	1600	×5
Podloga 10 (P10)	750	750	×2
Podloga 11 (P11)	750	750	×2
Podloga 12 (P12)	750	750	×2
Podloga 13 (P13)	750	750	×2
Podloga 14 (P14)	750	750	×2
Podloga 15 (P15)	750	750	×2
Podloga 16 (P16)	500	1500	×4
Podloga 17 (P17)	500	1500	×4
Podloga 18 (P18)	500	1500	×4
Podloga 19 (P19)	500	1500	×4
Podloga 20 (P20)	500	1500	×4
Podloga 21 (P21)	500	1500	×4
Podloga 22 (P22)	500	1500	×4
Podloga 23 (P23)	500	1500	×4
Podloga 24 (P24)	500	1500	×4
Podloga 25 (P25)	400	1600	×5
Podloga 26 (P26)	400	1600	×5
Podloga 27 (P27)	400	1600	×5

**Prilog 3.** Parametri uspješnosti tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s različitim koncentracijama glukoze monohidrata (15 g L<sup>-1</sup>; 25 g L<sup>-1</sup>; 50 g L<sup>-1</sup>) i triptona (6 g L<sup>-1</sup>; 7,5 g L<sup>-1</sup>; 10 g L<sup>-1</sup>)

Parametri	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Sastav podloge	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 6 g L <sup>-1</sup> triptona	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 7,5 g L <sup>-1</sup> triptona	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 10 g L <sup>-1</sup> triptona	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 6 g L <sup>-1</sup> triptona	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 7,5 g L <sup>-1</sup> triptona	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 10 g L <sup>-1</sup> triptona	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 6 g L <sup>-1</sup> triptona	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 7,5 g L <sup>-1</sup> triptona	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 10 g L <sup>-1</sup> triptona
Y <sub>S</sub> (glukoza) [g L <sup>-1</sup> ]	11,07	11,90	11,24	11,09	9,96	12,13	6,72	9,80	12,26
Y <sub>X</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	1,18	1,38	1,70	1,41	1,99	1,39	1,19	1,79	1,95
Y <sub>P</sub> (etanol) [g L <sup>-1</sup> ]	1,82	2,07	1,60	2,36	2,29	2,30	2,11	1,67	1,46
Y <sub>P</sub> (glicerol) [g L <sup>-1</sup> ]	1,47	1,63	1,75	1,50	1,67	1,88	1,50	2,46	2,48
Y <sub>X/S</sub> [g g <sup>-1</sup> ]	0,11	0,12	0,15	0,13	0,20	0,11	0,18	0,18	0,16
Y <sub>P/S</sub> (etanol) [g g <sup>-1</sup> ]	0,16	0,17	0,14	0,21	0,23	0,19	0,31	0,17	0,12
Y <sub>P/S</sub> (glicerol) [g g <sup>-1</sup> ]	0,13	0,14	0,16	0,14	0,17	0,16	0,22	0,25	0,20
Pr <sub>X</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,05	0,06	0,07	0,06	0,08	0,06	0,05	0,07	0,08
Pr <sub>etanol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,08	0,09	0,07	0,10	0,10	0,10	0,09	0,07	0,06
Pr <sub>glicerol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,06	0,10	0,10
I <sub>glukoza</sub> [%]	82,85	92,14	85,43	51,02	48,11	56,40	16,15	23,15	28,99

\* Glc×H<sub>2</sub>O – glukoza monohidrat

**Prilog 4.** Parametri uspješnosti tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 5 g L<sup>-1</sup> triptona te različitim koncentracijama glukoza monohidrata (15 g L<sup>-1</sup>; 25 g L<sup>-1</sup>; 50 g L<sup>-1</sup>) i anorganskih soli amonijevoog hidrogenfosfata i amonijevoog sulfata (1 g L<sup>-1</sup>; 2,5 g L<sup>-1</sup>; 5 g L<sup>-1</sup>)

Parametri:	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18
Sastav podloge	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 1 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 2,5 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 5 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 1 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 2,5 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 5 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 1 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 2,5 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 5 g L <sup>-1</sup> triptona; 5 g L <sup>-1</sup> DAP i DAS
Y <sub>S</sub> (glukoza) [g L <sup>-1</sup> ]	7,95	5,35	6,33	8,41	6,94	7,89	6,86	7,04	8,31
Y <sub>X</sub> [g L <sup>-1</sup> ]	1,69	0,72	1,35	0,84	0,78	0,84	1,19	2,59	0,67
Y <sub>P</sub> (etanol) [g L <sup>-1</sup> ]	1,62	1,48	0,86	1,83	0,30	1,27	0,06	0,69	0,52
Y <sub>P</sub> (glicerol) [g L <sup>-1</sup> ]	0,85	0,52	0,31	0,56	0,32	0,31	0,72	0,39	0,35
Y <sub>X/S</sub> [g g <sup>-1</sup> ]	0,21	0,13	0,21	0,10	0,11	0,11	0,17	0,37	0,08
Y <sub>P/S</sub> (etanol) [g g <sup>-1</sup> ]	0,20	0,28	0,14	0,22	0,04	0,16	0,01	0,10	0,06
Y <sub>P/S</sub> (glicerol) [g g <sup>-1</sup> ]	0,11	0,10	0,05	0,07	0,05	0,04	0,10	0,06	0,04
Pr <sub>X</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,07	0,03	0,06	0,04	0,03	0,03	0,05	0,11	0,03
Pr <sub>etanol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,07	0,06	0,04	0,08	0,01	0,05	-	0,03	0,02
Pr <sub>glicerol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,04	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
I <sub>glukoza</sub> [%]	59,64	50,06	63,15	39,23	37,94	44,96	17,59	18,76	22,59

\* Glc×H<sub>2</sub>O – glukoza monohidrat

**Prilog 5.** Parametri uspješnosti tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlogama s različitim koncentracijama glukoza monohidrata (15 g L<sup>-1</sup>; 25 g L<sup>-1</sup>; 50 g L<sup>-1</sup>) i CSL-a (10 g L<sup>-1</sup>; 15 g L<sup>-1</sup>; 20 g L<sup>-1</sup>)

Parametri:	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
Sastav podloge	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 10 g L <sup>-1</sup> CSL	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 15 g L <sup>-1</sup> CSL	15 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (13,64 g L <sup>-1</sup> glukoze); 20 g L <sup>-1</sup> CSL	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 10 g L <sup>-1</sup> CSL	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 15 g L <sup>-1</sup> CSL	25 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (22,73 g L <sup>-1</sup> glukoze); 20 g L <sup>-1</sup> CSL	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 10 g L <sup>-1</sup> CSL	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 15 g L <sup>-1</sup> CSL	50 g L <sup>-1</sup> Glc×H <sub>2</sub> O (45,46 g L <sup>-1</sup> glukoze); 20 g L <sup>-1</sup> CSL
Y <sub>S</sub> (glukoza) [g L <sup>-1</sup> ]	13,76	13,55	14,18	22,53	21,72	20,75	43,98	43,96	43,06
Y <sub>X</sub> (ΔOD) (10× razrj.) [-]	0,43	0,34	0,27	0,63	0,47	0,34	0,75	0,61	0,49
Y <sub>P</sub> (etanol) [g L <sup>-1</sup> ]	4,45	4,21	5,06	8,80	8,16	8,60	15,96	15,90	17,45
Y <sub>P</sub> (glicerol) [g L <sup>-1</sup> ]	-	-	0,47	-	-	0,56	0,46	1,03	0,96
Y <sub>P</sub> (arabitol) [g L <sup>-1</sup> ]	-	-	-	-	-	0,24	0,56	-	-
Y <sub>P/S</sub> (etanol) [g g <sup>-1</sup> ]	0,32	0,31	0,36	0,39	0,38	0,41	0,36	0,36	0,41
Y <sub>P/S</sub> (glicerol) [g g <sup>-1</sup> ]	-	-	0,03	-	-	0,03	0,01	0,02	0,02
Y <sub>P/S</sub> (arabitol) [g g <sup>-1</sup> ]	-	-	-	-	-	0,01	0,01	-	-
P <sub>retanol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,19	0,18	0,21	0,37	0,34	0,36	0,66	0,66	0,73
P <sub>rglicerol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	-	-	0,02	-	-	0,02	0,02	0,04	0,04
P <sub>rarabitol</sub> [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	-	-	-	-	-	0,01	0,02	-	-
I <sub>glukoza</sub> [%]	99,49	97,13	99,77	98,84	97,32	98,60	99,84	99,65	98,90

\* Glc×H<sub>2</sub>O – glukoza monohidrat

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Marko Buovac 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