

# Selekcija kvasaca iz rodova *Scheffersomyces*, *Candida* i *Spathaspora* za industrijsku proizvodnju biokemikalija

---

Lončar, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*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:159:814528>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

Anamarija Lončar  
1172/BPI

**Selekcija kvasaca iz rodova**  
*Scheffersomyces, Candida i*  
*Spathaspora za industrijsku*  
**proizvodnju biokemikalija**

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

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

## ZAHVALA:

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Antoniji Trontel na uloženom trudu, pruženim savjetima, pristupačnosti i strpljenju prilikom izrade ovoga diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na susretljivosti i pomoći.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### Selekcija kvasaca iz rodova *Scheffersomyces*, *Candida* i *Spathaspora* za industrijsku proizvodnju biokemikalija

Anamarija Lončar, 1172/BPI

#### Sažetak:

U ovom radu provedena je selekcija kvasaca iz roda *Scheffersomyces* (*Scheffersomyces insectosa* JCM 9842, *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659), *Candida* (*Candida lyxosophila* JCM 7532, *Candida succiphila* JCM 9442 i *Candida queiroziae* CBS 11853) i *Spathaspora* (*Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Spathaspora passalidarum* CBS 10155). Kvasci su uzgajani u YP podlogama u kojima su kao glavni izvor ugljika korišteni celobioza, glukoza, galaktoza, manoza, ksiloza i arabinoza. Nakon uzgoja određeni su glavni produkti metabolizma ovih kvasaca u aerobnim i anaerobnim uvjetima, a određen je i inhibitory učinak različitih koncentracija mliječne kiseline na rast i aktivnost istraživanih kvasaca. Na temelju mogućnosti rasta na ugljikohidratima prisutnim u lignoceluloznim sirovinama i prema glavnim produktima metabolizma te otpornosti ovih kvasaca na visoke koncentracije mliječne kiseline odabrani su kvasci za daljnja istraživanja. Kvasci iz roda *Spathaspora* odabrani su zbog proizvodnje arabitola – biokemikalije koja se koristi kao zaslađivač. Proces proizvodnje arabitola s kvascima *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 proveden je u YP podlozi s arabinozom u aerobnim uvjetima pri 28°C. Navedeni kvasci proizveli su arabitol s prinosom od 3,59 g L<sup>-1</sup> i 3,25 g L<sup>-1</sup> uz koeficijent konverzije od 0,63 i 0,46 g g<sup>-1</sup>. Kvasac *Spathaspora arborariae* CBS 11463 postiže oko 10 % veći prinos arabitola od kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155.

**Ključne riječi:** proizvodnja biokemikalija, ne-*Saccharomyces* kvasci, *Candida*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, arabitol, lignoceluloza

**Rad sadrži:** 60 stranica, 20 slika, 14 tablica, 38 literaturnih navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Nenad Mardetko, mag. ing.

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Mario Novak
2. doc. dr. sc. Antonija Trontel
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

**Datum obrane:** 23. listopada 2019. godine

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### Screening of yeast from genus *Scheffersomyces*, *Candida* and *Spathaspora* for industrial production of biochemicals

Anamarija Lončar, 1172/BPI

#### Abstract:

A selection of yeast from genus *Scheffersomyces* (*Scheffersomyces insectosa* JCM 9842, *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659), *Candida* (*Candida lyxosophila* JCM 7532, *Candida succiphila* JCM 9442 and *Candida queiroziae* CBS 11853) and *Spathaspora* (*Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Spathaspora passalidarum* CBS 10155) was performed. Yeast were cultivated in YP medium with cellobiose, glucose, galactose, mannose, xylose and arabinose as main carbon sources. Main metabolic products were determined after cultivation in aerobic and anaerobic conditions, as well as inhibitory effect of lactic acid on growth and activity of tested yeast. Selection of yeasts for further experiments was made based on growth on the carbohydrates found in lignocellulose biomass, main metabolic products and tolerance to high concentration of lactic acid. Yeast from genus *Spathaspora* were selected because of their ability to produce a sweeter arabitol. Production of arabitol with *Spathaspora arborariae* CBS 11463 and *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 was performed in YP medium with arabinose in aerobic conditions at 28°C. *Spathaspora arborariae* CBS 11463 and *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 produced arabitol with yields of 3,59 g L<sup>-1</sup> and 3,25 g L<sup>-1</sup> and conversion of 0,63 i 0,46 g g<sup>-1</sup>. *Spathaspora arborariae* CBS 11463 achieved around 10 % higher arabitol yield than *Spathaspora passalidarum* CBS 10155.

**Keywords:** production of biochemicals, non-*Saccharomyces* yeast, *Candida*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, arabitol, lignocellulose

**Thesis contains:** 60 pages, 20 figures, 14 tables, 38 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Nenad Mardetko, mag. ing.

#### Reviewers:

1. PhD Mario Novak, Assistant professor
2. PhD Antonija Trontel, Assistant professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Jasna Novak, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 23<sup>rd</sup> October 2019

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | 2  |
| <b>2.1. Primjena kvasaca u biotehnologiji</b> .....   | 2  |
| 2.1.1. Primjena ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca u biotehnologiji.....  | 3  |
| 2.1.2. Primjene kvasaca iz roda <i>Spathaspora</i> u biotehnologiji.....  | 4  |
| <b>2.2. Biotehnoška proizvodnja biokemikalija</b> .....   | 6  |
| 2.2.1. Polioli.....   | 6  |
| 2.2.2. Arabitol.....  | 7  |
| 2.2.3. Ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci u proizvodnji arabitola.....   | 9  |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | 11 |
| <b>3.1. Materijali</b> .....  | 11 |
| 3.1.1. Mikroorganizmi.....  | 11 |
| 3.1.2. Kemikalije.....  | 12 |
| 3.1.3. Oprema.....  | 12 |
| <b>3.2. Metode rada</b> .....   | 14 |
| 3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....  | 14 |
| 3.2.2. Aerobni i anaerobni uzgoj ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na različitim ugljikohidratima.....   | 16 |
| 3.2.3. Uzgoj odabranih ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na arabinozi u većem mjerilu.....   | 16 |
| <b>3.3. Analitičke metode</b> .....   | 17 |
| 3.3.1. Određivanje optičke gustoće biomase.....   | 17 |
| 3.3.2. Određivanje koncentracije biomase kvasca.....  | 17 |
| 3.3.3. Analiza uzoraka visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC).....  | 18 |
| 3.3.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC).....  | 19 |
| <b>3.4. Ispitivanje utjecaja mliječne kiseline na metaboličku aktivnost ne-<i>Saccharomyces</i> kvasaca</b> .....                             | 19 |
| <b>3.5. Izračun parametara uspješnosti procesa</b> .....  | 20 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | 23 |
| <b>4.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne-<i>Saccharomyces</i> kvasaca na različitim ugljikohidratima</b> .....                               | 24 |
| 4.1.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na celobiozi.....  | 24 |
| 4.1.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na heksozama (glukoza, galaktoza, manoza).....                         | 28 |
| 4.1.3. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na pentozama (ksiloza, arabinoza).....                                 | 40 |
| <b>4.2. Određivanje inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast i aktivnost ne-<i>Saccharomyces</i> kvasaca</b> .....                       | 47 |
| <b>4.3. Uzgoj kvasaca iz roda <i>Spathaspora</i> na arabinozi i proizvodnja arabitola</b> .....   | 49 |
| 4.3.1. Proizvodnja arabitola u YP podlozi s arabinozom s pomoću kvasca <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155.....                         | 49 |
| 4.3.2. Proizvodnja arabitola u YP podlozi s arabinozom s pomoću kvasca <i>Spathaspora arborariae</i> CBS 11463.....                           | 51 |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | 54 |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | 56 |
| <b>7. PRILOZI</b>   |    |
| <b>7.1. Popis kratica</b>   |    |
| <b>7.2. Jednadžbe pravaca baždarnih dijagrama za određivanje koncentracije visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC)</b>               |    |
| <b>7.3. Jednadžbe pravaca baždarnih dijagrama za određivanje koncentracije tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)</b> |    |



# 1. UVOD

Industrija biogoriva i biokemikalija, zbog velike kompeticije s prehrambenom industrijom, primorana je okrenuti se korištenju alternativnih sirovina poput lignocelulozne biomase. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koristi se već dugi niz godina kao jedan od glavnih radnih mikroorganizama u biotehnologiji. Međutim, kompleksna struktura i sastav lignoceluloze otežava primjenu kvasca *S. cerevisiae* u navedenim industrijama. Zbog toga se velika pažnja posvećuje pronalaženju i karakterizaciji mikroorganizama koji s obzirom na svoja svojstva mogu učinkovito koristiti navedene sirovine. Napredak procesa izolacije i identifikacije mikroorganizama doveo je do otkrivanja novih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca koji imaju potencijal biti korišteni kao radni mikroorganizmi u industrijskoj biotehnologiji (Mukherjee i sur., 2017). Ne-*Saccharomyces* kvasci mogu se koristiti kao domaćini za ekspresiju različitih proteina, biotransformacije, proizvodnju kemikalija, šećernih alkohola, kao dodatak prehrani, u bioremedijaciji tla i kao indikatori kvalitete okoliša (Johnson, 2013).

Arabitol je šećerni alkohol koji svoju primjenu ima u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, posebice u preparatima protiv zubnog karijesa i u dijetama gdje je potrebno opservirati kalorijski unos (Kumdam i sur., 2014). Kemijska sinteza ovog spoja je skupa i odvija se u ekstremnim uvjetima (Kumdam i sur., 2014) pa se zbog toga potrebe tržišta za arabitolom nastoje podmiriti primjenom biotehnoloških procesa (Kordowska-Wiater i sur., 2012).

Cilj ovog rada bilo je istraživanje metaboličke aktivnosti 7 ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na različitim ugljikohidratima koji su prisutni u lignoceluloznim sirovinama. Poseban je naglasak na proizvodnji arabitola iz arabinoze u aerobnim uvjetima s odabranim ne-*Saccharomyces* kvascima. Također, u svrhu interpretacije i zaključaka izračunati su osnovni biokinetički i procesni parametri bioprocasa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Primjena kvasaca u biotehnologiji

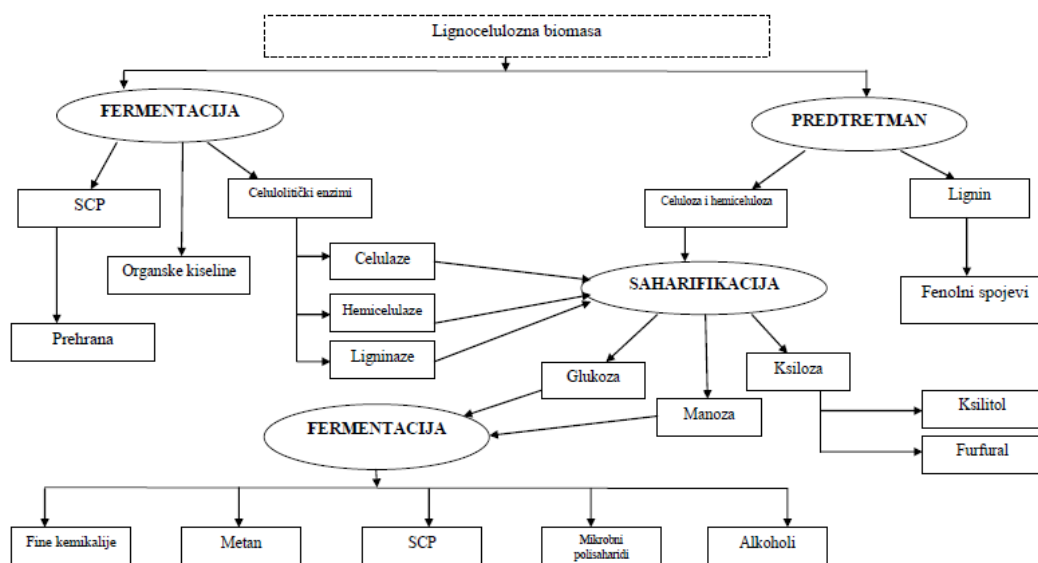
Kvasci su eukariotski mikroorganizmi koji su svrstani u carstvo gljiva, a razmnožavaju se pupanjem i fuzijom. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, jedan od najpoznatijih kvasaca, pretežno se koristi za „state-of-the-art“ proizvodnju etanola (Dalawai i sur., 2017). Osim etanola, buduće biogorivo koje bi moglo zamijeniti benzin je biobutanol koji ima određene prednosti pred etanolom u smislu energetske gustoće, kompatibilnosti s motorima te sigurnosti, a uz to je i važan prekursor u proizvodnji boja, plastike i polimera (Kumar i sur., 2016). Nadalje, iako se biodizel može proizvesti iz biljnih ulja, zbog kompeticije s prehrambenom industrijom, istraživanja alternativnih izvora energije okreću se i prema oleginiznim mikroorganizmima koji imaju sposobnost nakupljanja lipida i to i do 20 % po masi suhe tvari biomase (Schulze i sur., 2011). Osim butanola i ulja prilikom proizvodnje etanola nastaje i šećerni alkohol glicerol koji se često koristi kao komponenta hranjivih podloga (Tomaszewska i sur., 2012).

Prema podacima Društva za obnovljiva goriva u 2018. godini najveći svjetski proizvođač biogoriva su Sjedinjene Američke Države (opskrbljuju 56 % svjetskih potreba) te Brazil (opskrbljuje 28 % svjetskih potreba) (Renewable fuels association, 2019). Odbačena lignocelulozna biomasa iz šumarske i poljoprivredne industrije te gradskog otpada je potencijalna sirovina u proizvodnji biogoriva (npr. etanola). Celuloza i hemiceluloza se zbog svoje kemijske strukture bez pravilne predobrade ne mogu iskoristiti kao sirovina u proizvodnji biogoriva (Santos i sur., 2011). Također, u procesima gdje se koriste lignocelulozne sirovine dolazi do proizvodnje inhibitora i toksina (da Cunha-Pereira i sur., 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* stoljećima se koristi kao radni mikroorganizam u proizvodnji alkohola. Međutim, *Saccharomyces cerevisiae* nema sposobnost fermentiranja ksiloze koja je komponenta lignoceluloznih sirovina pa se zato istražuju alternativni, pentozna fermentirajući kvasci, poput onih iz rodova *Candida* ili *Scheffersomyces* (Su i sur., 2015).

Ne-*Saccharomyces* kvasci su se izbjegavali u procesima alkoholne fermentacije jer su se smatrali kontaminantima te imaju nisku toleranciju na etanol (50-60 g L<sup>-1</sup>) (Segura-García i sur., 2015). Međutim, neki od tih nekonvekcionalnih kvasaca (poput *Pichia kudriavzevii*) imaju određene prednosti poput sposobnosti fermentacije lignoceluloznih

hidrolizata i u stresnim uvjetima zbog čega su potencijalni kandidati za proizvodnju etanola (Mukherjee i sur., 2017). Osim u proizvodnji etanola, uočeno je kako neki od ne-*Saccharomyces* kvasaca, poput onih iz roda *Spathaspora*, akumuliraju različite šećerne alkohole poput ksilitola, ribitola, arabitola i glicerola (Su i sur., 2015). Šećerni alkohol arabitol smatra se jednom od najvrijednijih kemikalija (Jagtap i Rao, 2018) i može se dobiti iz hemiceluloze primjenom različitih ne-*Saccharomyces* kvasaca (Kordowska-Wiater i sur., 2012).



**Slika 1.** Proizvodi dobiveni iz lignocelulozne biomase (Kumar i sur., 2016).

### 2.1.1. Primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca u biotehnologiji

Zbog metaboličkih ograničenja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te potrebe za pronalazanjem alternativnih izvora energije istražuju se i ne-*Saccharomyces* kvasci koji imaju potencijal biti korišteni u različitim granama industrijske biotehnologije (Mukherjee i sur., 2017). Primjerice, kvasac *Candida queiroziae* jedan je od “novih” vrsta kvasaca izoliran s istrnulog drveta koji proizvodi intracelularnu  $\beta$ -glukozidazu koja je odgovorna za hidrolizu celobioze (Santos i sur., 2011). *Rhodospiridium toruloides*, osim što nakuplja lipide, proizvodi i D-arabitol iz ksiloze i to do  $49 \text{ g L}^{-1}$  D-arabitola iz  $150 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze, čime se ovaj kvasac može iskoristiti i za proizvodnju lipida i za proizvodnju arabitola, ovisno o potrebama tržišta (Jagtap i Rao, 2018).

U istraživanju koje su proveli Cadete i sur. (2016) istraživani je metabolizam ksiloze idućih ne-*Saccharomyces* kvasaca iz porodice *Spathaspora*: *S. arborariae*, *S. brasiliensis*, *S. passalidarum*, *S. roraimanensis*, *S. suhii* i *S. xylofermentans*. Rezultati tog istraživanja pokazali su da je od istraživanih kvasaca iz porodice *Spathaspora* najveći koeficijent konverzije ksiloze u ksilitol određen za kvasac *Spathaspora suhii* ( $Y_{P/S} = 0,92 \text{ g g}^{-1}$ ) dok je najveći koeficijent konverzije ovog šećera u etanol određen za kvasac *Spathaspora passalidarum* ( $Y_{P/S} = 0,48 \text{ g g}^{-1}$ ) (Cadete i sur., 2016).

### 2.1.2. Primjene kvasaca iz roda *Spathaspora* u biotehnologiji

Do sada je izolirano oko 22 vrste kvasaca iz roda *Spathaspora* (npr. *S. brasiliensis*, *S. roraimanensis*, *S. suhii*, *S. xylofermentans*, *S. passalidarum*) (Cadete i Rosa, 2018). Kvasac *Spathaspora arborariae* izoliran je s istrunulog drveta iz brazilskih šuma i može rasti na nešto višim temperaturama ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ) (Cadete i sur., 2009). Uspješno fermentira glukozu, ksilozu i arabinozu i proizvodi etanol čak i u prisutnosti 5-hidroksimetilfurfurala (kod  $\gamma_{HMF} < 3 \text{ g L}^{-1}$ ), furfurala i octene kiseline (da Cunha-Pereira i sur., 2011). Međutim, prisutnost furfurala (u procesima gdje se kao sirovina koristi lignocelulozni hidrolizat) preusmjerava metabolizam prema fermentaciji ksiloze u etanol, a ne prema nastanku ksilitola (Hickert i sur., 2013). Istraživanje metabolizma ksiloze u *Spathaspora* kvascima pokazalo je kako u uvjetima umjerene limitacije kisika kvasac *Spathaspora arborariae* proizvede oko  $6,4 \text{ g L}^{-1}$  ksilitola, dok je u uvjetima izražene limitacije kisika proizvedeno oko  $9 \text{ g L}^{-1}$  ksilitola (Cadete i sur., 2016). Kada se kao izvor ugljika koristio hidrolizat rižine pljevice ostvaren je stupanj konverzije ksiloze u ksilitol od  $0,33 \text{ g g}^{-1}$  za čistu kulturu *Spathaspora arborariae*, odnosno  $0,45 \text{ g g}^{-1}$  kada se koristila ko-kultura *Spathaspora arborariae* i *Saccharomyces cerevisiae* (da Cunha-Pereira i sur., 2011). Ista je ko-kultura uzgajana na hidrolizatu rižine pljevice procesom simultane saharifikacije i fermentacije te je maksimalna koncentracija proizvedenog etanola iznosila  $14,5 \text{ g L}^{-1}$ , a ksilitola  $3 \text{ g L}^{-1}$  (Hickert i sur., 2013).

Kvasac *Spathaspora passalidarum* se učestalo nalazi u probavnom traktu kornjaša (Su i sur., 2015). *S. passalidarum* može koristiti ksilozu kao jedini izvor ugljika za rast biomase i za proizvodnju etanola, no koncentracija dobivene biomase nakon uzgoja na čistoj ksilozi pokazala se manjom nego nakon uzgoja na čistoj glukozu ( $X \sim 35 \text{ g L}^{-1}$  za glukozu i  $X \sim 17 \text{ g L}^{-1}$  za ksilozu) (Hou, 2012). Također, istraživanje provedeno na *Spathaspora passalidarum* NN245 dovelo je do spoznaje kako taj kvasac ima sposobnost kofermentirati

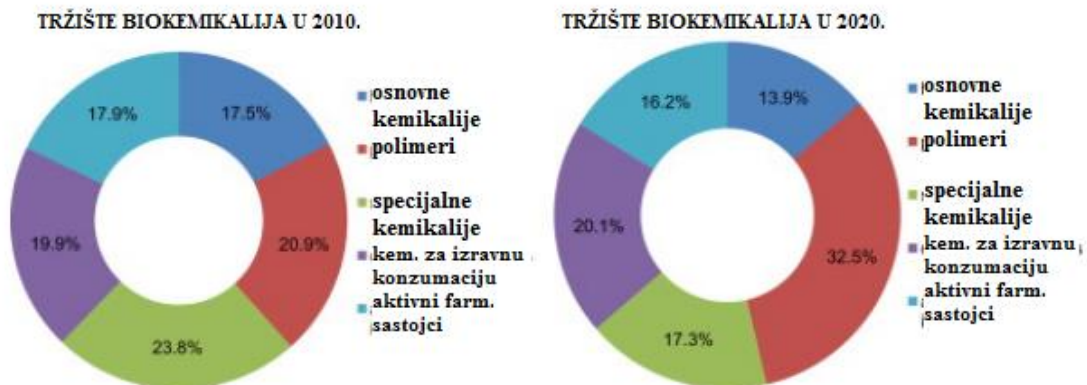
ksilozu i celobiozu u prisutnosti glukoze te je zbog toga potencijalni kandidat u procesima simultane saharifikacije i fermentacije (Long i sur., 2012). Osim svojeg potencijala u proizvodnji etanola, uočeno je kako *Spathaspora passalidarum* NN245 također akumulira šećerne alkohole i to ksilitol, ribitol, arabitol i glicerol (Su i sur., 2015). Iako *Spathaspora passalidarum* ima sposobnost iscrpljivanja ksiloze iz hranjive podloge, stupanj konverzije šećera (gdje je podloga 30 g L<sup>-1</sup> glukoze + 30 g L<sup>-1</sup> ksiloze) u ksilitol bio je relativno mali i iznosio je 0,09 g g<sub>ksiloze</sub><sup>-1</sup> (Long i sur., 2012).

**Tablica 1.** Neki od produkata metabolizma kvasaca iz roda *Spathaspora*.

| Kvasac                   | Dostupnost kisika | Izvor C  | Produkti   | Referenca                     |
|--------------------------|-------------------|--|--|-------------------------------|
| <i>S. arborariae</i>     | mikroaerofilno    | glukoza+ksiloza +arabinoza; hidrolizat rižine pljevice | ksilitol, etanol   | da Cunha-Pereira i sur., 2011 |
| <i>S. passalidarum</i>   | anaerobno         | glukoza, ksiloza                                       | ksilitol, ribitol, arabitol, glicerol, HAc, acetoin, R,R- 2,3-butandiol, etanol, meso- 2,3-butandiol | Su i sur., 2015.              |
| <i>S. brasiliensis</i>   | anaerobno         | ksiloza  | ksilitol, etanol   | Cadete i sur., 2016           |
| <i>S. roraimanensis</i>  | anaerobno         | ksiloza  | ksilitol, etanol   | Cadete i sur., 2016           |
| <i>S. suhii</i>          | anaerobno         | ksiloza  | ksilitol, etanol   | Cadete i sur., 2016           |
| <i>S. xylofermentans</i> | anaerobno         | ksiloza  | ksilitol, etanol   | Cadete i sur., 2016           |

## 2.2. Biotehnološka proizvodnja biokemikalija

Biokemikalije su kemikalije koje se nalaze u živim stanicama te mogu biti strukturno identične već postojećim kemikalijama (takozvane „drop-in“ kemikalije) ili mogu imati nove strukture koje daju novu primjenu (European Biomass Industry Association, 2019). Najčešće proizvedene biokemikalije su organske kiseline (limunska, succinska, mliječna i octena kiselina), mikrobnj polisaharidi, jednostanični proteini i ksilitol (Kumar i sur., 2016). Prema dostupnim podacima (Slika 2.) tržište biopolimera ima značajan porast (European Biomass Industry Association, 2019).



**Slika 2.** Tržište biokemikalija u 2010. i predviđanja za 2020. (European Biomass Industry Association, 2019).

### 2.2.1. Polioli

Polioli su šećerni alkoholi (npr. glicerol, ksilitol, arabitol, eritrol, manitol) koji su dobiveni supstitucijom aldehidne skupine s hidroksilnom te su uglavnom niskoprobavljivi (Grembecka, 2015). Polioli se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji zbog svojih povoljnih tehnoloških svojstava koriste kao teksturni agensi, sušila, omekšivači i stabilizatori boje (Kordowska-Wiater i sur., 2012).

Glicerol je nusprodukt industrije biogoriva i koristi se kao sastavni dio mikrobnih hranjivih podloga budući da ga veliki dio mikroorganizama može koristiti kao izvor ugljika i u aerobnim i u anaerobnim procesima (Tomaszewska i sur., 2012).

Sorbitol se trenutno proizvodi katalitičkim hidrogeniranjem glukoze budući da biotehnološka proizvodnja još nije dovoljno kompetitivna i u fazi je istraživanja i razvoja (Liu i sur., 2010).

Manitol je šećerni alkohol koji je raširen u prirodi i trenutno se proizvodi katalitičkim hidrogeniranjem fruktoze u uvjetima visoke temperature i tlaka i zahtijeva visoku čistoću supstrata pa se istražuju mogućnosti mikrobne proizvodnje kao ekonomičnija alternativa (Tomaszewska i sur., 2012).

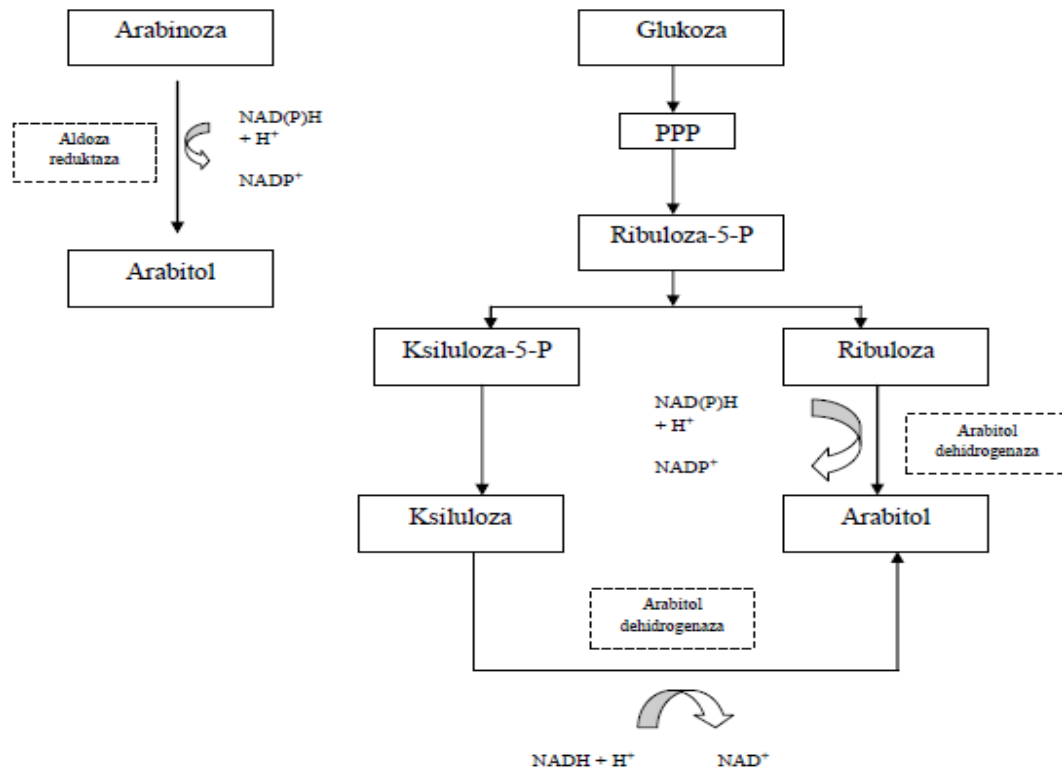
Eritritol se za razliku od ostalih šećernih alkohola ne proizvodi izravnim katalitičkim hidrogeniranjem zbog visoke cijene supstrata eritroze pa se stoga industrijska proizvodnja oslanja na upotrebu osmofilnih kvasaca (primjerice *Moniliella pollinis* ili *Trichosporonoides megachiliensis*) ili bakterija mliječne kiseline (Grembecka, 2015).

Ksilitol je derivat ksiloze i može se dobiti i mikrobnom proizvodnjom (primjerice pomoću kvasaca iz roda *Candida*) u neekstremnim uvjetima (Kumar i sur., 2016). Koristi se u niskokalorijskoj hrani kao umjetno sladilo (Bura i sur., 2012).

Zbog blagotvornih djelovanja na ljudski organizam poput niskog glikemijskog indeksa i niske kalorijske vrijednosti, arabitol se može primjenjivati u istim slučajevima kao i ksilitol (Kordowska-Wiater i sur., 2012). Nadalje, D-arabitol se smatra jednim od najvrijednijih kemikalija koje se mogu dobiti iz lignocelulozne biomase (Jagtap i Rao, 2018).

### 2.2.2. Arabitol

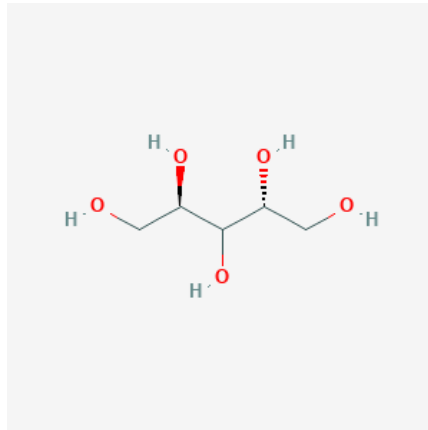
Arabitol je pentitol, sladak, bezbojan, kristaličan i topljiv u vodi te svoju primjenu nalazi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Veliki dio današnje proizvodnje arabitola oslanja se na reakciju redukcije laktosa koji zahtijeva temperaturu od 100°C i skupi katalizator (Kumdam i sur., 2013). Iako se sve više istražuje primjena biotehnoloških procesa kao efektivnija i ekonomičnija alternative kemijskoj proizvodnji (Kordowska-Wiater i sur., 2012). Arabitol se najčešće koristi kao preparat protiv zubnog karijesa i kao sredstvo za redukciju adipoznog tkiva (Kumdam i sur., 2014).



**Slika 3.** Shematski prikaz proizvodnje arabitola iz arabinoze i glukoze (Kumdam i sur., 2014).

Prisutnost visokih koncentracija soli i šećera u podlogama predstavljaju stresne uvjete za stanice kvasca pa se prema tome u takvim uvjetima u kvascu nakuplja arabitol (ali i neki drugi šećerni alkoholi) koji funkcionira kao osmolit i tako sprječava dehidraciju stanica (Kumdam i sur., 2013). Također, adekvatna opskrba kisikom od velike je važnosti tijekom proizvodnje arabitola (Toyoda i Ohtaguchi, 2010).





**Slika 4.** Struktura arabitola (Anonymous 1, 2019).

### 2.2.3. Ne-*Saccharomyces* kvasci u proizvodnji arabitola

U Tablici 2. detaljniji je prikaz ne-*Saccharomyces* kvasaca koji se koriste u proizvodnji arabitola. Prilikom uzgoja *Candida parapsilosis* na arabinozi u optimalnim je uvjetima proizvedeno čak  $10,42 \text{ g L}^{-1}$  arabitola uz koeficijent konverzije od  $0,51 \text{ g g}^{-1}$  (Kordowska-Wiater i sur., 2017). Nadalje, prilikom izrade matematičkog modela karioduktanta *S. cerevisiae* i *P. stipitis* predviđen je koeficijent konverzije od  $0,56 \text{ g g}^{-1}$  i koncentracija od  $18,367 \text{ g L}^{-1}$  arabitola nakon dvodnevno uzgoja (Kordowska-Wiater i sur., 2012). Kada se kao radni mikroorganizam koristio halotolerantni kvasac *Debaromyces nepalensis*, ostvaren je koeficijent konverzije od  $0,26 \text{ g g}^{-1}$  te je uočeno kako su preferirajući supstrati za proizvodnju arabitola arabinoza i glukoza (Kumdam i sur., 2013).

Koncentracija proizvedenog arabitola kad se kao podloga koristi glukoza, ksiloza ili kombinacija glukoze i ksiloze nije prelazila  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  (*Spathaspora passalidarum*), odnosno  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  (*Pichia stipitis*) (Su i sur., 2015). Također, prema tom istom istraživanju, prilikom uzgoja *Spathaspora passalidarum* nije uočena jasna korelacija između aeracije i proizvodnje arabitola.

**Tablica 2.** Pregled nekih ne-*Saccharomyces* kvasaca koji se koriste za proizvodnju arabitola.

| Kvasac                           | Supstrat                           | $\gamma_{\text{arabitol}} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ | $Y_{\text{P/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$ | Referenca                     |
|----------------------------------|------------------------------------|--|--|-------------------------------|
| <i>Candida parapsilosis</i>      | arabinoza (20 g L <sup>-1</sup> )  | 10,42  | 0,51-0,53                                  | Kordowska-Wiater i sur., 2017 |
| <i>Debaromyces nepalensis</i>    | arabinoza (100 g L <sup>-1</sup> ) | 22,7   | 0,26                                       | Kumdam i sur., 2013           |
| <i>Spathaspora passalidarum</i>  | glukoza                            | 1  | /  | Su i sur., 2015               |
| <i>Pichia stipitis</i>           | glukoza                            | 3,5  | /  | Su i sur., 2015               |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | ksiloza (150 g L <sup>-1</sup> )   | 49   | /  | Jagtap i Rao, 2018            |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>       | glicerol                           | 0,3-9,2  | /  | Tomaszewska i sur., 2012      |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>  | arabinoza                          | /  | 0,2  | Bura i sur., 2012             |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>      | laktoza (9,5 g L <sup>-1</sup> )   | 13,5   | /  | Toyoda i Ohtaguchi, 2010      |

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Ispitivana su svojstva *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 te 7 odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Popis ne-*Saccharomyces* kvasaca korištenih u radu.

| ne- <i>Saccharomyces</i><br>kvasac              | Prirodno stanište iz<br>kojeg je izoliran<br>kvasac | Referenca                 |
|---|---|---------------------------|
| <i>Spathaspora<br/>passalidarum</i> CBS 10155   | insekt (Louisiana,<br>USA)                          | (WI-KNAW,<br>2019)        |
| <i>Spathaspora arborariae</i><br>CBS 11463      | istrunulo drvo (Brazil)                             | (Cadete i sur.,<br>2009). |
| <i>Candida queiroziae</i> CBS<br>11853          | istrunulo drvo (Brazil)                             | (Santos i sur.,<br>2011)  |
| <i>Candida succiphila</i> JCM<br>9442           | tlo (Japan)   | (WI-KNAW,<br>2019)        |
| <i>Scheffersomyces<br/>insectosa</i> JCM 9842   | <i>Leptura maculicornis</i>                         | (JCM, 2019)               |
| <i>Candida lyxosophila</i><br>JCM 7532          | tlo (JAR)   | (WI-KNAW,<br>2019)        |
| <i>Scheffersomyces<br/>segobiensis</i> JCM 7659 | larva <i>Calcophora<br/>mariana</i> (Španjolska)    | (JCM, 2019)               |

### 3.1.2. Kemikalije

U Tablici 4. prikazan je popis korištenih kemikalija, njihova čistoća, proizvođač i zemlja podrijetla.

**Tablica 4.** Popis kemikalija korištenih za pripremu otopina i podloga.

| <b>Kemikalija</b>      | <b>Čistoća</b>               | <b>Proizvođač</b>       |
|------------------------|------------------------------|-------------------------|
| agar                   | za upotrebu u biotehnologiji | Liofilchem, Italija     |
| L-(+)-arabinoza        | 99%                          | Acros Organics, SAD     |
| D-(+)-arabitol         | za upotrebu u biotehnologiji | Sigma-Aldrich, SAD      |
| D-(+)-celobioza        | za upotrebu u biotehnologiji | molekula, UK            |
| cinkov sulfat 7-hidrat | p.a.                         | Gram-Mol, Hrvatska      |
| D-(+)-galaktoza        | 99+%                         | Acros Organics, SAD     |
| glukoza monohidrat     | 99+%                         | Sigma-Aldrich, SAD      |
| D-(+)-ksiloza          | 99+%                         | Acros Organics, SAD     |
| kvašćev ekstrakt       | za upotrebu u biotehnologiji | Liofilchem, Italija     |
| D-(+)-manoza           | 99+%                         | Sigma-Aldrich, SAD      |
| DL-mliječna kiselina   | 85%                          | Sigma-Aldrich, SAD      |
| orto-fosforna kiselina | 85%                          | Sigma-Aldrich, SAD      |
| pepton                 | za upotrebu u biotehnologiji | Fisher BioReagents, SAD |
| sumporna kiselina      | 96%                          | Merck, Njemačka         |
| YPD broth              | za upotrebu u biotehnologiji | Fisher BioReagents, SAD |

### 3.1.3. Oprema

#### 3.1.3.1. Uređaj za visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (HPLC)

Uređaj za visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od idućih dijelova:

- a) pumpa (LC-10AD<sub>VP</sub>)
- b) otplinjač (DGU-14A)

- c) injektor i uzorkivač (SIL-10 AD<sub>VP</sub>)
- d) grijač kolone (CTO-10A<sub>VP</sub>)
- e) predkolona (Supelcogel™ H; 50 x 4,6 mm ID, 9 μm)
- f) ionsko-izmjenjivačka analitička kolona (Supelcogel™ C-610H; 300 x 7,8 mm ID, 9 μm)
- g) detektor indeksa loma (RID-10A)
- h) modul za kontrolu sustava (SCL-19A<sub>VP</sub>)
- i) računalni programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

### 3.1.3.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji se od idućih dijelova:

- a) crpka (G7104A 1290 Flexible Pump)
- b) uzorkivač i pećnica (G7129B 1290 Vialsampler)
- c) predkolona
- d) analitička kolona (150x7,8 mm) (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex)
- e) detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID)
- f) računalni program za kromatografiju (OpenLAB CDS)

### 3.1.3.3. Ostala oprema

- a) tehnička vaga Tehnica (Železniki, Slovenija)
- b) autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija)
- c) laboratorijska tresilica Certomat® RM B. Braun Biotech International (Njemačka)
- d) termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- e) centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- f) sušionik Instrumentaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)
- g) analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan)
- h) UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) sa računalnim programom SimpleReads
- i) centrifuga Tehnica (Železniki, Slovenija)

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema hranjivih podloga

#### 3.2.1.1. *Hranjiva podloga za održavanje radnih kultura kvasaca*

U Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL dodani su izračunata količina gotove YPD (yeast extract peptone dextrose) podloge (kvaščevo ekstrakt  $10 \text{ g L}^{-1}$ , pepton  $20 \text{ g L}^{-1}$ , glukoza  $20 \text{ g L}^{-1}$ ), agar i destilirana voda (Tablica 5.). Nakon toga hranjiva je podloga sterilizirana u autoklavu ( $121^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ ) i u sterilnim uvjetima izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama ostavljene su na sobnoj temperaturi kako bi se stvrdnule.

#### 3.2.1.2. *Hranjive podloge za uzgoje ne-Saccharomyces kvasaca na različitim ugljikohidratima*

U kivete s konusnim dnom otpipetirano je 7,5 mL otopine kvaščevo ekstrakta i peptona (YP;  $\gamma_{\text{kv. ekstrakt}} = 20 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{pepton}} = 40 \text{ g L}^{-1}$ ) i 7,5 mL prethodno pripremljene otopine određenog ugljikohidrata koncentracije  $40 \text{ g L}^{-1}$  (celobioza, glukoza, ksiloza, galaktoza, manoza i arabinoza). Ukupan volumen podloga iznosio je 15 mL. Uzgoji odabranih kvasaca provedeni su i u YP podlozi bez glavnog izvora ugljika gdje je umjesto otopine ugljikohidrata u podlogu dodano 7,5 mL destilirane vode. Sve su kivete začepljene vatenim čepovima i sterilizirane u autoklavu pri  $121^\circ\text{C}/1 \text{ bar}$  pretlaka u trajanju od oko 20 minuta.

#### 3.2.1.3. *Hranjiva podloga za pripremu inokuluma*

Po 10 mL komercijalne otopine YPD podloge pripremljene prema uputi proizvođača otpipetirano je u staklene epruvete koje su se zatim začepile vatenim čepovima i sterilizirale oko 20 minuta.

**Tablica 5.** Sastav hranjivih podloga za uzgoj *ne-Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima.

| Naziv  | Sastav   | $\gamma$ (g L <sup>-1</sup> ) |
|--|--|-------------------------------|
| hranjiva podloga za održavanje radnih kultura  | YPD<br>(kvašćev ekstrakt:pepton:glukoza=1:2:2) | 50                            |
|  | agar   | 20                            |
| hranjiva podloga za uzgoj <i>ne-Saccharomyces</i> kvasaca na različitim ugljikohidratima | kvašćev ekstrakt                               | 20                            |
|  | pepton   | 10                            |
|  | ugljikohidrat*                                 | 20                            |
| hranjiva podloga za uzgoj inokuluma  | YPD (kvašćev ekstrakt:pepton:glukoza=1:2:2)    | 50                            |

\*ugljikohidrat = celobioza, glukoza, manoza, galaktoza, ksiloza, arabinoza

#### 3.2.1.4. Hranjiva podloga za ispitivanje utjecaja mliječne kiseline na rast i aktivnost *ne-Saccharomyces* kvasaca

Pripremljena je otopina komercijalne YPD podloge (kvašćev ekstrakt : pepton : glukoza = 1 : 2 : 2; 50 g L<sup>-1</sup>) u koju je dodan agar u koncentraciji od 33 g L<sup>-1</sup>. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121°C u trajanju od oko 20 minuta. Nakon sterilizacije u malo ohlađenu podlogu dodani su različiti volumeni matične otopine mliječne kiseline ( $\gamma_{\text{mliječna kis.}} = 600 \text{ g L}^{-1}$ ) kako bi se postigle sljedeće koncentracije mliječne kiseline u čvrstim YPD podlogama: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 g L<sup>-1</sup>. Podloga je dobro izmiješana i prelivena u sterilne Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima te je ostavljena da se ohladi.

### 3.2.1.6. Hranjiva podloga za uzgoj odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na arabinozi

U četiri Erlenmeyerove tikvice od 500 mL pripremljeno je po 250 mL hranjive podloge za uzgoj u tikvicama sastava: kvašćev ekstrakt  $10 \text{ g L}^{-1}$ , pepton  $20 \text{ g L}^{-1}$ , arabinoza  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Hranjive podloge su sterilizirane u autoklavu pri  $121^\circ\text{C}$  u trajanju od oko 20 minuta i zatim ohlađene.

### 3.2.2. Aerobni i anaerobni uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima

Sterilnom mikrobiološkom ušicom uzeta je kultura kvasca poraslog na Petrijevim zdjelicama (Mikrobiološka zbirka Laboratorija) i prenesena u 10 mL hranjive YPD (YP podloga s glukozom) podloge (sastav u Tablici 5.). Kulture porasle u YP podlozi s glukozom tijekom 24 h pri  $28^\circ\text{C}$  korištene su za inokulaciju različitih YP podloga ( $V = 15 \text{ mL}$ ) u kojima je koncentracija glavnog izvora ugljika iznosila  $20 \text{ g L}^{-1}$  (YP-celobioza; YP-glukoza; YP-manoza, YP-galaktoza, YP-ksiloza i YP-arabinoza) i YP podloge bez glavnog izvora ugljika.

Sve su podloge inokulirane s 5 % vol vol<sup>-1</sup> inokuluma. Aerobni uzgoj proveden je na laboratorijskoj tresilici ( $n = 200 \text{ min}^{-1}$ ) pri  $t = 28^\circ\text{C}$  tijekom 48 sati, a anaerobni/mikroaerofilni uzgoj proveden je statično u termostatu pri  $28^\circ\text{C}$  u trajanju od 48 sati.

### 3.2.3. Uzgoj odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na arabinozi u većem mjerilu

Sterilnom mikrobiološkom ušicom prenesena je porasla biomasa odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca, *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborariae* CBS 11463, na Petrijevim zdjelicama u hranjive YPD podloge ( $V = 200 \text{ mL}$ ) i ostavljena na tresilici tijekom noći pri  $28^\circ\text{C}$ . Porasli kvasci su korišteni kao inokulum za uzgoje provedene u YP podlozi sa arabinozom.

YP podloge s arabinozom ( $V = 250 \text{ mL}$ ) inokulirane su s 5 % vol vol<sup>-1</sup> inokuluma pripremljenog na gore opisan način. Uzgoj ova dva kvasaca na arabinozi proveden je u aerobnim uvjetima na laboratorijskoj tresilici ( $n = 200 \text{ min}^{-1}$ ) pri  $28^\circ\text{C}$  tijekom 70 sati. U pravilnim vremenskim razmacima izuzimani su uzorci u kojima je praćena promjena optičke gustoće, promjena koncentracije biomase, ugljikohidrata i produkata (Poglavlje 3.3.).



### 3.3. Analitičke metode

Tijekom uzgoja provedenih u različitim YP podlogama određivana je promjena optičke gustoće (Poglavlje 3.3.1.), gravimetrijskom metodom određivana je koncentracija biomase (Poglavlje 3.3.2.), a promjena koncentracije ugljikohidrata i produkata fermentacije određivane su HPLC (Poglavlje 3.3.3.) i UPLC metodom (Poglavlje 3.3.4.). Tijekom aerobnog uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima uzorci su izuzimani nakon inokulacije, nakon 24 sata uzgoja (podaci nisu prikazani) te nakon 48 sati uzgoja, dok su se tijekom anaerobnog uzgoja uzorci izuzimali nakon inokulacije i nakon 48 sati uzgoja. Tijekom uzgoja odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na arabinози uzorci su izuzimani u pravilnim vremenskim intervalima, tj. svakih sat vremena u prvih osam sati uzgoja, a nakon toga svaka 24 sata do prekida uzgoja.

#### 3.3.1. Određivanje optičke gustoće biomase

Optička gustoća uzoraka izuzetih tijekom uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP (yeast extract peptone) podlogama sa različitim ugljikohidratima kao izvor ugljika određivana je na UV-Vis spektrofotometru (Cary 100, Agilent Technologies, SAD) pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm ( $OD_{600}$ ). Za sve uzorke u kojima je određivana optička gustoća pri 600 nm pripremljeno je odgovarajuće decimalno razrjeđenje.

#### 3.3.2. Određivanje koncentracije biomase kvasca

Određeni volumen uzorka izuzet je iz hranjive podloge i prenesen u čiste, suhe i prethodno izvagane kivete za centrifugiranje s konusnim dnom (Nalgene Nunc, SAD). Uzorci su centrifugirani pri broju okretaja od  $6000 \text{ min}^{-1}$  u trajanju od 5 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$  (centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)). Dobiveni supernatanti su odekantirani i zamrznuti pri  $-20^{\circ}\text{C}$  za HPLC odnosno UPLC analizu. Kivete s odcentrifugiranom biomasom stavljene su na sušenje pri  $105^{\circ}\text{C}$  do konstantne mase. Kad se talog u potpunosti osušio, kivete su izvagane te je izračunata masena koncentracija biomase ( $X$  jednadžba 3-1).

$$X = \frac{m_{\text{BM}} - m_{\text{P}}}{V_{\text{uzorak}}} \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3 - 1]$$

$m_{\text{BM}}$  – masa osušene kivete s biomasom [g]

$m_{\text{P}}$  – masa čiste, prazne i suhe kivete [g]

$V_{\text{uzorak}}$  – volumen uzorka [L]

### 3.3.3. Analiza uzoraka visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

Uzorci izuzimani tijekom provedenih eksperimenata pripremljeni su za analizu na HPLC-u kako je to opisano u Poglavlju 3.3.3.1. Uvjeti pri kojima se određivale koncentracije supstrata i produkata su sljedeći:

- (1) protok mobilne faze (0,1 % orto-fosforna kiselina) iznosio je  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$
- (2) temperatura pećnice  $55^{\circ}\text{C}$
- (3) ionsko – izmjenjivačka analitička kolona (Supelcogel<sup>TM</sup> C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9  $\mu\text{m}$ ) s predkolonom (Supelcogel<sup>TM</sup> H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9  $\mu\text{m}$ )
- (4) za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. Refractive Indeks Detector).
- (5) volumen injektiranja 20  $\mu\text{L}$ .

Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Jednadžbe baždarnih pravaca nalaze se u Prilogu 7.2.

#### 3.3.3.1. Taloženje proteina u supernatantu izuzežih uzoraka

750  $\mu\text{L}$  supernatanta uzorka otpipetirano je u Eppendorf kivete te je u svaku kivetu dodano 750  $\mu\text{L}$   $\text{ZnSO}_4$  ( $\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$ ). Sadržaj kiveta vorteksiran je 20 sekundi i zatim ostavljen da miruje 10 minuta. Nakon toga kivete su stavljene na centrifugiranje (centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)) u trajanju od 15 minuta ( $n = 10000 \text{ min}^{-1}$ ) kako bi se istaložili prisutni proteini. Nakon centrifugiranja izuzet je alikvot supernatanta koji je razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1 : 1. Sadržaj je homogeniziran i profiltriran kroz filter za špicu s veličinama pora od 0,22  $\mu\text{m}$  (LLG-Syringe filters SPHEROS, LLG Labware).

### 3.3.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uzorci izuzimani tijekom provedenih eksperimenata pripremljeni su za analizu na UPLC-u kako je to opisano u Poglavlju 3.3.3.1. Uvjeti pri kojima se određivale koncentracije supstrata i produkata su sljedeći:

- (6) protok mobilne faze (0,0025 mol L<sup>-1</sup> sumporna kiselina) iznosio je 0,6 mL min<sup>-1</sup>
- (7) temperatura pećnice 60°C
- (8) analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) HPLC Column 15 x 4.6 mm s odgovarajućom predkolonom)
- (9) za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. Refractive Indeks Detector).
- (10) volumen injektiranja 10 µL.

Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su pomoću računalnog programa za kromatografiju (**OpenLAB CDS**). Jednadžbe baždarnih pravaca nalaze se u Prilogu 7.3.

### **3.4. Ispitivanje utjecaja mliječne kiseline na metaboličku aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca**

Ispitivanje utjecaja mliječne kiseline na metaboličku aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca provedeno je u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Suspenzija biomase kvasaca pripravljena je na način da je sa sterilnom mikrobiološkom ušicom uzeta biomasa kvasaca poraslih na Petrijevim zdjelicama te je ista resuspendirana u 10 mL sterilne destilirane vode. U sterilnim uvjetima uzeto je po 5 µL suspenzije i preneseno na hranjive YP agar podloge s glukozom koje sadrže različite koncentracije mliječne kiseline. Petrijeve zdjelice u kojima se ispitivao utjecaj mliječne kiseline na rast kvasaca u aerobnim uvjetima stavljene su u termostat na 28°C dok su one u kojima se ispitivao utjecaj mliječne kiseline u anaerobnim uvjetima stavljene u Anaerocult vrećice s pirogalolom te u termostat na 28°C.

### 3.5. Izračun parametara uspješnosti procesa

Za izračun parametara uspješnosti procesa korištene su sljedeće formule (Marić i Šantek, 2009):

a) koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ )

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3 - 2]$$

$S_0, X_0$  – početne koncentracije supstrata ili biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$S, X$  – konačne koncentracije supstrata ili biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

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

b) koeficijent konverzije supstrata u produkt ( $Y_{P/S}$ )

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3 - 3]$$

$S_0, P_0$  – početna koncentracija supstrata ili produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$S, P$  – konačna koncentracija supstrata ili produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

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

c) koeficijent konverzije biomase u produkt ( $Y_{P/X}$ )

$$Y_{P/X} = \frac{(P-P_0)}{(X-X_0)} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{Y_P}{Y_X} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3 - 4]$$

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

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

d) produktivnost ( $Pr$ )

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \text{ [g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{]} \quad [3 - 5]$$

$Y_X$  – prinos biomase [g L<sup>-1</sup>]

$Y_P$  – prinos produkta [g L<sup>-1</sup>]

$t_U$  – ukupno vrijeme bioprocesa [h]

e) brzina nastajanja produkta ( $q_P$ )

$$q_P = \frac{\mu}{Y_{P/X}} \text{ [h}^{-1}\text{]} \quad [3 - 6]$$

$\mu$  – specifična brzina rasta biomase [h<sup>-1</sup>]

$Y_{P/X}$  – koeficijent konverzije biomase u produkt [g g<sup>-1</sup>]

f) brzina potrošnje supstrata ( $q_S$ )

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \text{ [h}^{-1}\text{]} \quad [3 - 7]$$

$\mu$  – specifična brzina rasta biomase [h<sup>-1</sup>]

$Y_{X/S}$  – koeficijent konverzije supstrata u biomasu [g g<sup>-1</sup>]

g) maksimalna specifična brzina rasta biomase ( $\mu_{max}$ )

$$\mu_{max} = \frac{1}{t_{exp}} \cdot \ln \frac{X}{X_0} \text{ [h}^{-1}\text{]} \quad [3 - 8]$$

$t_{exp}$  – eksponencijalno vrijeme [h]

$X$  – koncentracija biomase [g L<sup>-1</sup>]

$X_0$  – početna koncentracija biomase [g L<sup>-1</sup>]

h) efektivnost

$$E = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}(\text{teor})} \quad [3 - 9]$$

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

$Y_{P/S}(\text{teor.})$  – teorijski koeficijent konverzije supstrata u produkt [ $\text{g g}^{-1}$ ]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je uzgoj sedam ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 u YP podlogama u kojima su kao glavni izvor ugljika korišteni različiti ugljikohidrati prisutni u lignoceluloznim sirovinama (celobioza, glukoza, galaktoza, i manoza te ksiloza i arabinoza). Za provođenje eksperimenata odabrani su kvasci iz roda *Scheffersomyces* (*Scheffersomyces insectosa* JCM 9842, *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659), *Candida* (*Candida lyxosophila* JCM 7532, *Candida succiphila* JCM 9442 i *Candida queiroziae* CBS 11853) i *Spathaspora* (*Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Spathaspora passalidarum* CBS 10155). Nakon uzgoja određeni su glavni produkti metabolizma ovih kvasaca u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Dodatno, određen je i inhibitorski učinak različitih koncentracija mliječne kiseline na rast i aktivnost istraživanih kvasaca te su dobiveni rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenim za kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148. Kvasci iz roda *Spathaspora* tijekom uzgoja u aerobnim uvjetima proizveli su značajnije koncentracije arabitola iz arabinoze te su stoga provedeni bioprocesi proizvodnje arabitola s kvascima *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u većem mjerilu. Na temelju dobivenih rezultata izračunati su osnovni parametri bioprocasa radi usporedbe dinamike rasta ovih dvaju kvasaca na arabitolu.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- a) Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima (Poglavlje 4.1.)
- b) Određivanje inhibitorskog utjecaja mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca (Poglavlje 4.2.)
- c) Uzgoj kvasca iz roda *Spathaspora* u YP podlozi sa arabinozom (Poglavlje 4.3.)

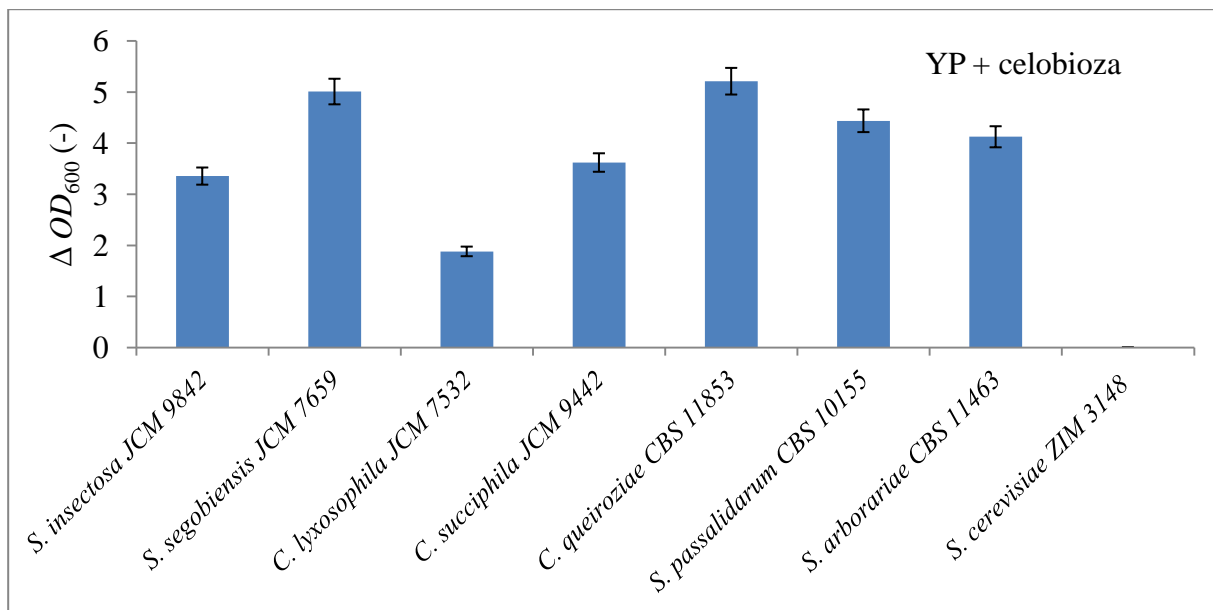
#### 4.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima

Određivanje rasta i aktivnosti odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je u YP podlogama u kojima su kao glavni izvor ugljika bili ugljikohidrati celobioza, glukoza, galaktoza i manozna te ksiloza i arabinoza. Uzgoji su provedeni u aerobnim i anaerobnim uvjetima te je uspoređen njihov rast i utrošak glavnog izvora ugljika. Početna koncentracija svih ugljikohidrata dodanih u YP podloge iznosila je oko 20 g L<sup>-1</sup>. YP podloga ima vrlo visok sadržaj peptona (20 g L<sup>-1</sup>) i kvašćevog ekstrakta (10 g L<sup>-1</sup>), a kvašćev ekstrakt može sadržavati od 6 do 16 % ugljikohidrata (Anonymous 2, 2019). Stoga je proveden uzgoj svih testiranih kvasaca u YP podlozi bez glavnog izvora ugljika kako bi se odredilo koliko odabrani kvasci mogu narasti u ovoj podlozi (podaci nisu prikazani). Naime, u YP podlozi bez dodanog glavnog izvora ugljika može doći do rasta kvasca na ugljikohidratima dostupnim u kvašćevom ekstraktu kao i na ugljikohidratima koje se nalaze u stanicama kvasca (glikogen i trehaloza; Francois i Parrou, 2001).

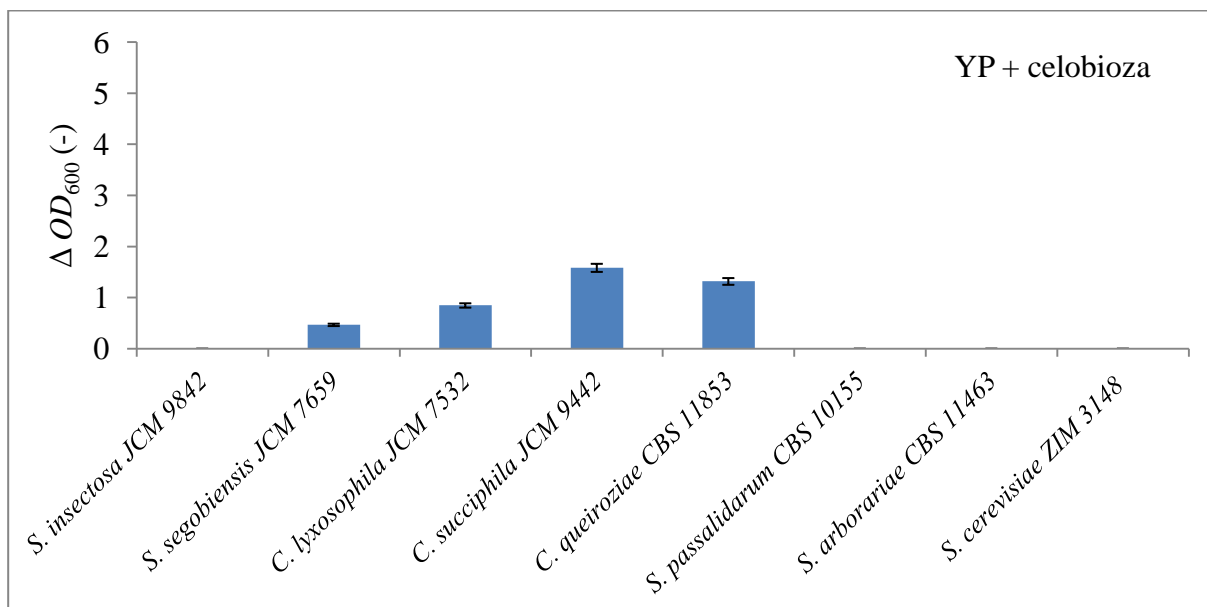
##### 4.1.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na celobiozi

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja sedam ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* na celobiozi u aerobnim (Slika 5.) ili anaerobnim uvjetima (Slika 6.) tijekom 48 sati pri 28°C. Ovaj je uzgoj proveden kako bi se odredilo mogu li odabrani ne-*Saccharomyces* kvasci rasti u YP podlozi s celobiozom te kako bi se odredili osnovni produkti metabolizma koje ovi kvasci proizvode u navedenim podlogama (Tablica 6.).





**Slika 5.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s celobiozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca na celobiozi u aerobnim uvjetima pri 28°C.



**Slika 6.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s celobiozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca na celobiozi u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

U aerobnim uvjetima u YP podlozi s celobiozom rastu svi odabrani ne-*Saccharomyces* kvasci (Slika 5.), dok kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 ne može rasti na ovom ugljikohidratu. Iz literature je poznato da kvasci iz roda *Saccharomyces* ne mogu rasti na celobiozi (Ha i sur., 2011). Neke vrste kvasaca (npr. *Saccharomycopsis fibuligera*, *Wickerhamomyces anomalus* i *C. wickerhamii*) mogu rasti i koristiti celobiozu kao izvor ugljika, ali ove vrste kvasaca imaju  $\beta$ -glukozidazu koja je vezana na površinu stanice. Vrlo mali broj kvasaca može sintetizirati ovaj enzim intracelularno i transportirati celobiozu u stanicu kroz odgovarajuće transportne sustave o kojima se za sada vrlo malo zna (Santos i sur., 2011).

Tijekom 48 h uzgoja u YP podlozi s celobiozom niti jedan kvasac nije utrošio svu celobiozu iz podloge. Tijekom 48 h kvasac *C. queiroziae* CBS 11853 utrošio je 76,05 % celobioze iz YP podloge (Tablica 6.) te je proizveo i najviše biomase (Slika 5.) u aerobnim uvjetima. Naime, ne-*Saccharomyces* kvasac *Candida queiroziae* može transportirati celobiozu u stanicu i sintetizira intracelularnu  $\beta$ -glukozidazu koja ovom kvascu omogućuje brz rast na ovom disaharidu (Santos i sur., 2011).

Dobiveni rezultati za kvasce iz roda *Spathaspora* odgovaraju istraživanjima različitih autora u kojima je potvrđen rast kvasaca *Spathaspora arborariae* i *Spathaspora passalidarum* na celobiozi (Cadete i sur., 2009, Long i sur., 2012, Su i sur., 2015).

Kvasac *Candida queiroziae* CBS 11853 je i u anaerobnim uvjetima tijekom 48 h uzgoja utrošio najviše celobioze iz YP podloge (7,22 %) u usporedbi s drugim kvascima korištenim u ovom radu (Tablica 6.). U anaerobnim uvjetima na celobiozi rastu kvasci *Candida succiphila* JCM 9442, *Candida lyxosophila* JCM 7532 i *S. segobiensis* JCM 7659 (Slika 6., Tablica 6.).

*Candida queiroziae* CBS 11463 dostigla je najveći stupanj konverzije celobioze u etanol od čak 0,43 g g<sup>-1</sup> u aerobnim uvjetima, dok je koeficijent konverzije celobioze u etanol u anaerobnim uvjetima iznosio 0,18 g g<sup>-1</sup> (Tablica 6.). U istraživanjima autora Santos i sur. (2011) kvasac *C. queiroziae* tijekom uzgoja na celobiozi ima koeficijent konverzije celobioze u etanol od 0,32 g g<sup>-1</sup>. Ovaj kvasac nakon iscrpljivanja celobioze iz podloge može rasti na etanolu kao izvoru ugljika (Santos i sur., 2011). Potrošnja ugljikohidrata, produkti metabolizma ispitivanih ne-*Saccharomyces* kvasaca kao i odgovarajući koeficijenti konverzije prikazani su u Tablici 6. za aerobne i anaerobne uvjete.

**Tablica 6.** Osnovni produkti metabolizma ne-*Saccharomyces* kvasaca određeni tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja u YP podlozi s celobiozom.

|          | Kvasac                           | Utrošeni UH (%) | $\gamma_{\text{EtOH}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{glicerol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{arabitol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{HAc}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{EtOH/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| AEROBNO  | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 3,45            | 0,11  | 0,12  | 0   | 0  | 0,16                                     | 0,17   |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 19,90           | 0,17  | 0,18  | 0   | 0  | 0,04                                     | 0,05   |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 34,80           | 0   | 0,34  | 0   | 0  | 0  | 0,05   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 17,10           | 0   | 0   | 0   | 0  | 0  | 0  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 76,05           | 6,53  | 0,08  | 0   | 0,11                                       | 0,43                                     | 0,01   |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 28,95           | 0   | 0   | 0   | 0  | 0  | 0  |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 22,85           | 0   | 0,15  | 0   | 0  | 0  | 0,03   |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 0               | 0   | 0,09  | 0   | 0  | 0  | 0  |
| ANAERBNO | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 0               | 0   | 0,28  | 0   | 1,83                                       | -  | -  |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 0               | 0   | 0,28  | 0   | 1,8  | -  | -  |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 0,77            | 0   | 0,33  | 0   | 0,68                                       | 0  | 2,14   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 0               | 0   | 0,31  | 0   | 1,53                                       | -  | -  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 7,22            | 0,51  | 2,46  | 0   | 0,77                                       | 0,18                                     | 0,73   |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 3,32            | 0   | 0,3   | 0   | 0,76                                       | 0  | 0,45   |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 0               | 0   | 0,31  | 0   | 0,74                                       | -  | -  |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 0               | 0,01  | 0,3   | 0   | 1,72                                       | -  | -  |

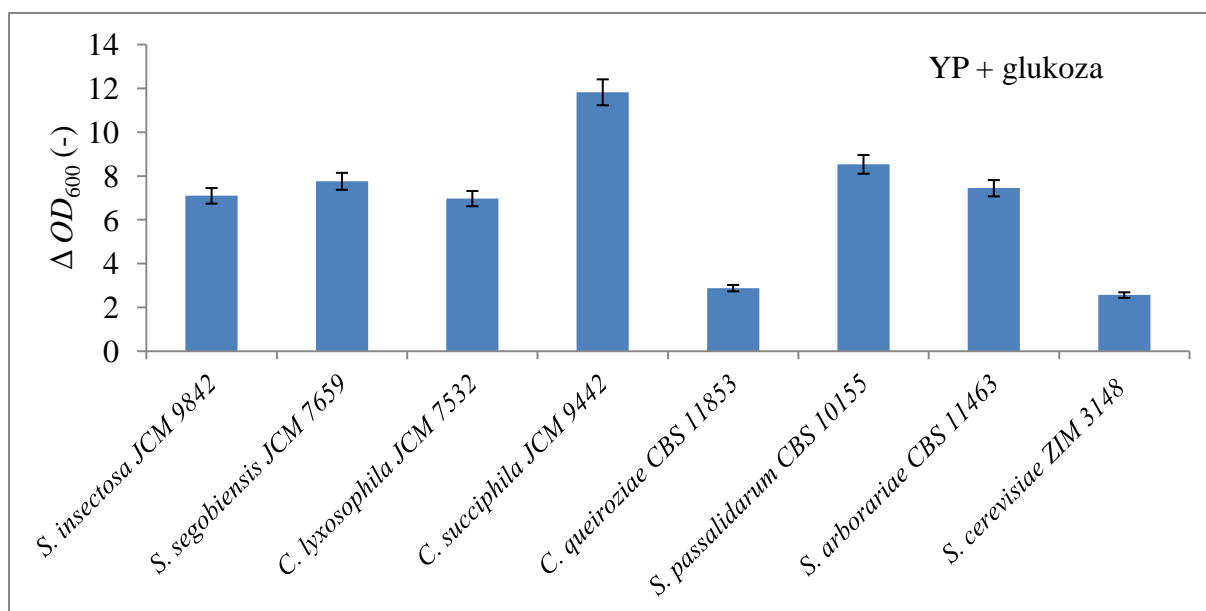
#### 4.1.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na heksozama (glukoza, galaktoza, manoza)

Glukoza je primarni izvor ugljika i energije za mikroorganizme i glavni resurs za mikrobnu proizvodnju kemikalija. Ovaj ugljikohidrat je strukturna komponenta lignoceluloze. Galaktoza i manoza se također nalaze u lignocelulozi kao strukturna komponenta hemiceluloze te iskorištavanje ovih dvaju ugljikohidrata može dovesti do veće efikasnosti i konsolidacije bioprocasa proizvodnje biokemikalija iz obnovljivih izvora (Hara i sur., 2017).

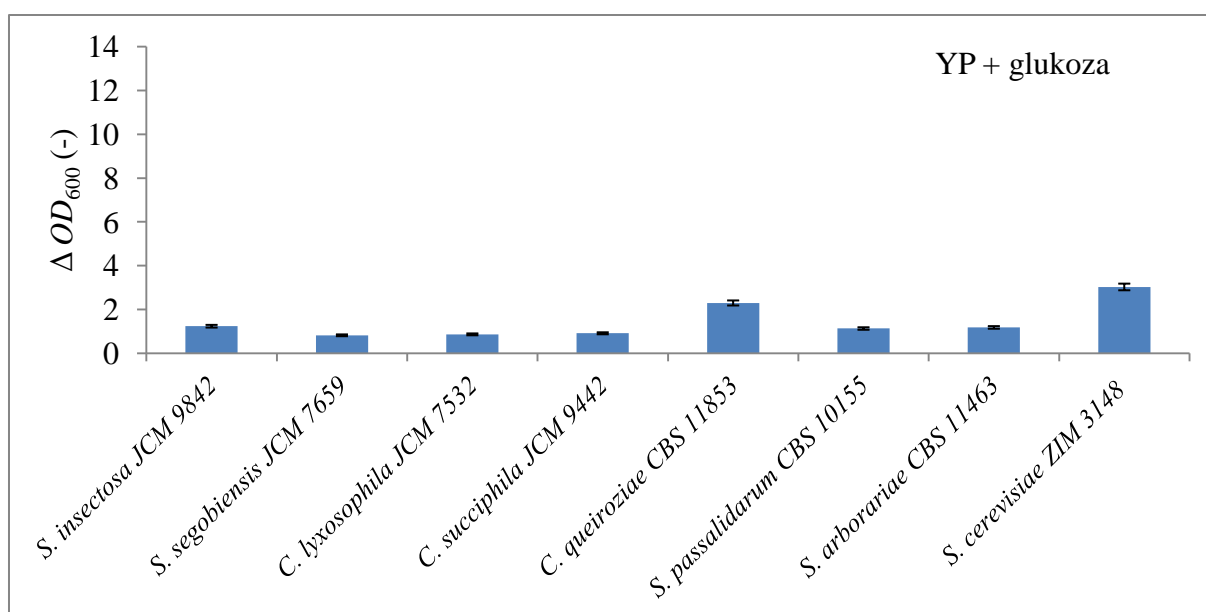
Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je i na heksozama prisutnim u lignoceluloznim sirovinama u aerobnim i anaerobnim uvjetima tijekom 48 sati pri 28°C kako bi se mogli odrediti osnovni produkti metabolizma ovih kvasaca. Rezultati su prikazani na Slikama 7.– 12. i u Tablicama 7.–9.

##### 4.1.2.1. *Određivanje rasta i aktivnosti ne-Saccharomyces kvasaca na glukozi*

Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je u YP podlozi s glukozom u aerobnim (Slika 7.) i anaerobnim uvjetima (Slika 8.) tijekom 48 sati pri 28°C kako bi se mogli odrediti osnovni produkti metabolizma ovih kvasaca (Tablica 7.).



**Slika 7.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s glukozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca na glukozu u aerobnim uvjetima pri 28°C.



**Slika 8.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s glukozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca na glukozu u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Glukoza predstavlja primarni izvor ugljika i energije za mikroorganizme (Hara i sur., 2017) te su, očekivano, svi kvasci rasli na ovom ugljikohidratu u aerobnim i anaerobnim

uvjetima (Slika 7. – Slika 8.). U anaerobnim uvjetima kvasci stvaraju manje biomase nego u aerobnim uvjetima (Slike 7. i 8.).

Nakon 48 h aerobnog uzgoja, svi su kvasci gotovo iscrpili glukozu iz podloge te su proizveli etanol (Tablica 7.). Najveće vrijednosti koeficijenta konverzije glukoze u etanol određeni su za kvasce *Candida queiroziae* CBS 11463 od 0,29 g g<sup>-1</sup> i *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 od 0,21 g g<sup>-1</sup> (Tablica 7.). U radu Santos i sur. (2011) određen je vrlo sličan koeficijent konverzije glukoze u etanol od 0,32 g g<sup>-1</sup>. Za kvasce *S. insectosa* JCM 9842 i *S. segobiensis* JCM 7659 određeni su približno jednaki koeficijenti konverzije glukoze u etanol od 0,13 g g<sup>-1</sup> i 0,14 g g<sup>-1</sup>. Kvasci iz roda *Spathaspora* proizveli su vrlo male koncentracije etanola (Tablica 7.) te su određeni koeficijenti konverzije glukoze u etanol za kvasce *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborariae* CBS 11463 koji su iznosili 0,06 g g<sup>-1</sup> i 0,07 g g<sup>-1</sup>.

Autori Long i sur. (2012) proveli su uzgoj kvasca *Spathaspora passalidarum* na glukozu u aerobnim uvjetima i nisu detektirali proizvodnju etanola tijekom bioprocasa.

Tijekom anaerobnog uzgoja u YP podlozi s glukozom, najveću potrošnju glukoze ostvario je *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 (92,20 %). Ostali ne-*Saccharomyces* kvasci tijekom 48 h utrošili su od 19,35 – 66,65 % glukoze iz YP podloge.

Kao i u aerobnim uvjetima, kod *Candida queiroziae* CBS 11463 i *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 određeni su najveći koeficijenti konverzije supstrata u etanol (Tablica 7.). Ostali kvasci nisu proizvodili etanol na glukozu u anaerobnim uvjetima.

U Tablici 7. prikazani su ostali produkti nastali tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja na glukozu. Zanimljivo je istaknuti proizvodnju šećernog alkohola – arabitola. Ovaj šećerni alkohol proizveli su *S. arborariae* CBS 11463, *S. insectosa* JCM 9842 i *S. segobiensis* JCM 7659 (Tablica 7.). Najviše arabitola proizveo je kvasac *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 (1,03 g L<sup>-1</sup>,  $Y_{P/S} = 0,05$  g g<sup>-1</sup>).

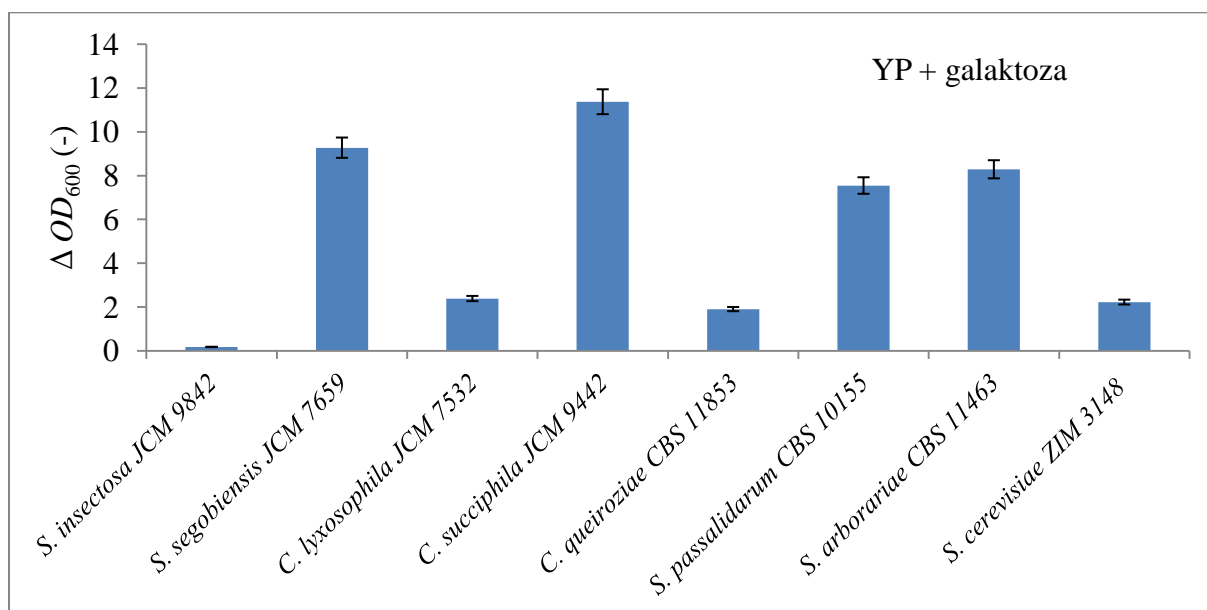
**Tablica 7.** Osnovni produkti metabolizma ne-*Saccharomyces* kvasaca određeni tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja u YP podlozi s glukozom.

|           | Kvasac                           | Utrošeni UH (%) | $\gamma_{\text{EtOH}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{glicerol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{arabitol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{HAc}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{EtOH/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) |
|-----------|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| AEROBNO   | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 96,1            | 2,45  | 1,96  | 1,03  | 0,23                                       | 0,13                                     | 0,10   |
|           | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 97,55           | 2,80  | 1,01  | 0,38  | 0  | 0,14                                     | 0,05   |
|           | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 92,95           | 0,58  | 0   | 0   | 0  | 0,03                                     | 0  |
|           | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 99,75           | 0,25  | 0   | 0   | 0  | 0,01                                     | 0  |
|           | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 97,95           | 5,59  | 0   | 0   | 0  | 0,29                                     | 0  |
|           | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 97,70           | 1,12  | 0,34  | 0   | 0,17                                       | 0,06                                     | 0,02   |
|           | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 97,85           | 1,30  | 0,42  | 0,12  | 0,19                                       | 0,07                                     | 0,02   |
|           | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 99,75           | 4,14  | 0,76  | 0   | 0,64                                       | 0,21                                     | 0,04   |
| ANAEROBNO | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 66,55           | 0   | 2,45  | 0   | 2,80                                       | 0  | 0,18   |
|           | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 0               | 0   | 0,23  | 0   | 2,91                                       | -  | -  |
|           | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 19,35           | 0   | 0,41  | 0   | 1,46                                       | 0  | 0,11   |
|           | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 37,5            | 0   | 0,27  | 0   | 1,82                                       | 0  | 0,04   |
|           | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 40,05           | 0,55  | 0,54  | 0   | 0,47                                       | 0,06                                     | 0,06   |
|           | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 27,20           | 0   | 0,35  | 0   | 0,87                                       | 0  | 0,06   |
|           | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 23,25           | 0   | 0,29  | 0   | 1,10                                       | 0  | 0,06   |
|           | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 92,20           | 1,40  | 1,01  | 0   | 1,62                                       | 0,08                                     | 0,05   |

#### 4.1.2.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na galaktozi

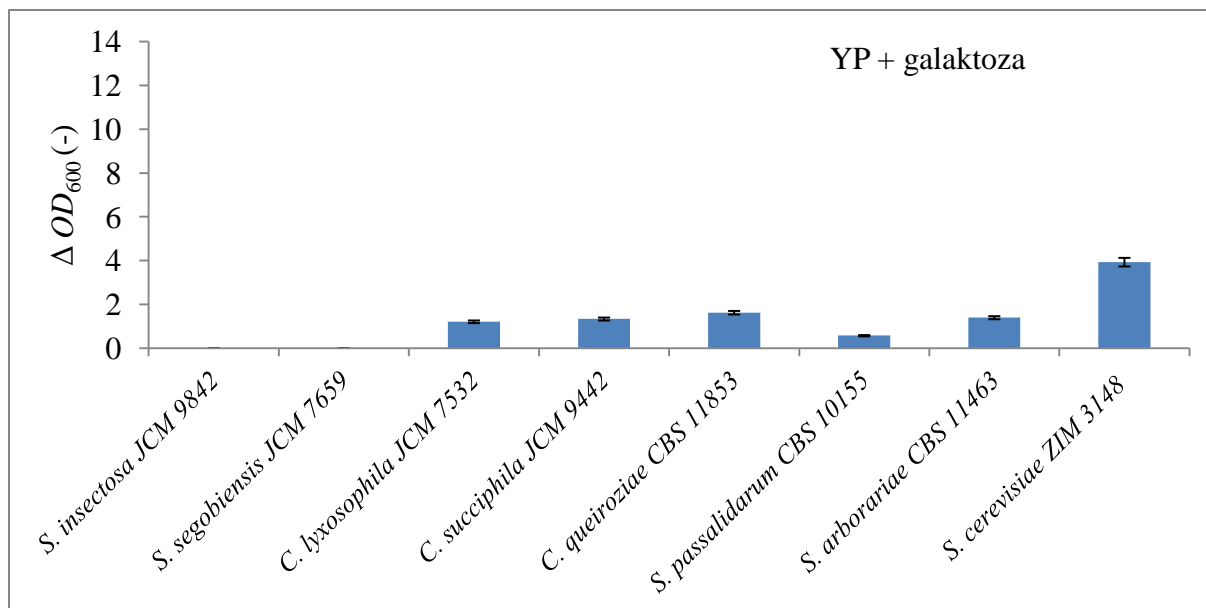
Galaktoza je ugljikohidrat prisutan u različitim udjelima u hemiceluloznoj komponenti lignoceluloznih sirovina. Ovaj ugljikohidrat je prisutan u značajnijim koncentracijama u sulfitnoj lužini i hidrolizatu bagaze šećerne trske (du Perez i sur., 1986).

Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 proveden je u YP podlozi s galaktozom u aerobnim (Slika 9.) i anaerobnim uvjetima (Slika 10.) tijekom 48 sati pri 28°C kako bi se mogli odrediti osnovni produkti metabolizma ovih kvasaca (Tablica 8.).



**Slika 9.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s galaktozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u aerobnim uvjetima pri 28°C.





**Slika 10.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s galaktozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

U aerobnim uvjetima kvasci *S. passalidarum* CBS 10155, *S. arborariae* CBS 11463, *C. queiroziae* CBS 11853, *C. succiphila* JCM 9442, *S. segobiensis* JCM 7659 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 potrošili su više od 95 % prisutne galaktoze iz YP podloge nakon 48 h uzgoja. Kvasac *Candida lyxosophila* JCM 7532 utrošio je 73,35 % galaktoze, a kvasac *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 utrošio je samo 22,10 % galaktoze. Tijekom anaerobnog uzgoja na galaktozi, najveća potrošnja galaktoze od 66,40 % određena je za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148. Ne-*Saccharomyces* su kvasci, kao i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148, na galaktozi u aerobnim uvjetima proizveli etanol (Tablica 8.).

*Spathaspora passalidarum* CBS 10155, *Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Candida queiroziae* CBS 11853 i *Candida succiphila* JCM 9442 potrošili su od 25 % do 29 % galaktoze iz podloge, a galaktozu iz YP podloge najsporije troše kvasci *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 i *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 koji su nakon 48 h anaerobnog uzgoja utrošili samo 6,05 % odnosno 3 % dostupnog ugljikohidrata (Tablica 8.).

Najveći je koeficijent konverzije galaktoze u etanol u aerobnim uvjetima određen za kvasac *S. insectosa* JCM 9842 (0,39 g g<sup>-1</sup>), a najmanji za kvasac *C. lyxosophila* JCM 7532 (0,07 g g<sup>-1</sup>; Tablica 8.). Tijekom rasta kvasaca u YP podlozi s galaktozom u anaerobnim uvjetima kvasci *Candida queiroziae* CBS 11853, *Candida succiphila* JCM 9442,

*Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 i *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 proizveli su etanol, a najveću vrijednost koeficijenta konverzije galaktoze u etanol od 0,10 g g<sup>-1</sup> određena je za kvasac *Candida queiroziae* CBS 11853. Koeficijenti konverzije galaktoze u etanol u aerobnim i anaerobnim uvjetima za ostale testirane kvasce prikazani su u Tablici 8. U ovoj tablici prikazani su i ostali produkti metabolizma kvasaca na galaktozi.

Kvasci *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 proizveli su arabitol u koncentraciji od 0,05 g L<sup>-1</sup> i 0,78 g L<sup>-1</sup>.

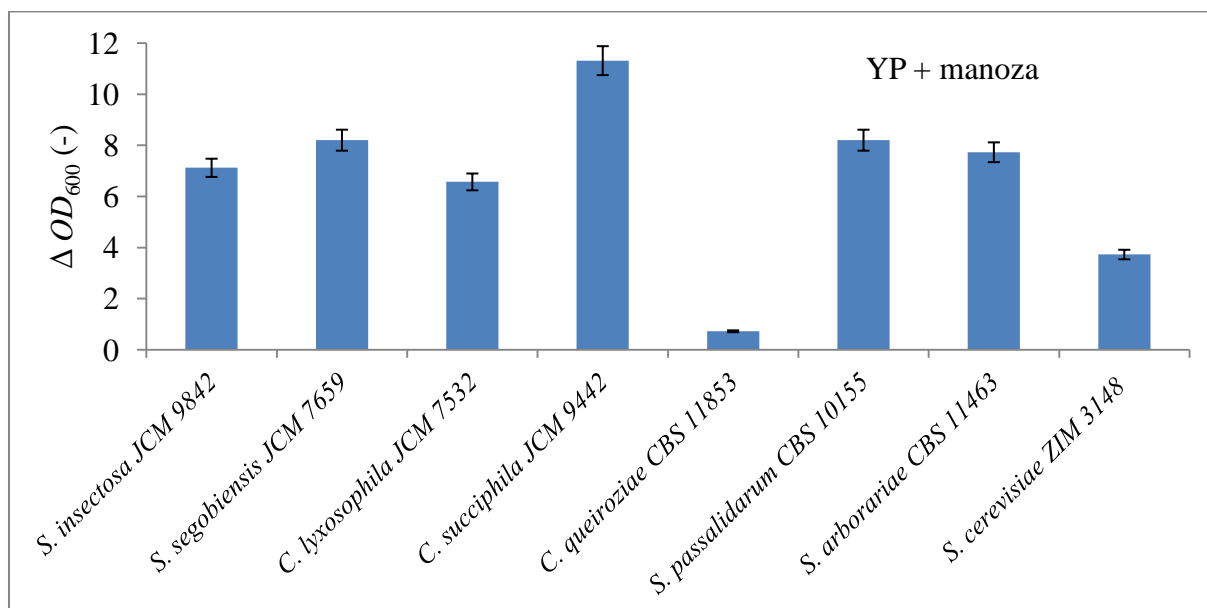
**Tablica 8.** Osnovni produkti metabolizma ne-*Saccharomyces* kvasaca određeni tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja u YP podlozi s galaktozom.

|          | Kvasac                           | Utrošeni UH (%) | $\gamma_{\text{EtOH}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{glicerol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{arabitol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{HAc}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{EtOH/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| AEROBNO  | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 22,1            | 1,71  | 1,55  | 0,78  | 0,15                                       | 0,39                                     | 0,35   |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 98,40           | 2,80  | 1,60  | 0   | 0,17                                       | 0,14                                     | 0,08   |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 73,35           | 0,98  | 0,41  | 0   | 0  | 0,07                                     | 0,03   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 96,95           | 2,75  | 0   | 0   | 0,19                                       | 0,14                                     | 0  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 95,75           | 4,12  | 0,31  | 0   | 0,56                                       | 0,22                                     | 0,02   |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 96,40           | 2,05  | 0,30  | 0   | 0,17                                       | 0,11                                     | 0,02   |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 96,65           | 2,35  | 0,32  | 0,05  | 0  | 0,12                                     | 0,02   |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 98,75           | 4,41  | 0,69  | 0   | 0,90                                       | 0,22                                     | 0,03   |
| ANAERBNO | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 3               | 0   | 0,23  | 0   | 2,33                                       | 0  | 0,38   |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 6,05            | 0,1   | 0,14  | 0   | 3,59                                       | 0,08                                     | 0,12   |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 26,05           | 0   | 0,40  | 0   | 1,03                                       | 0  | 0,08   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 28,85           | 0,06  | 0,25  | 0   | 1,64                                       | 0,01                                     | 0,04   |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 26,80           | 0,55  | 0,39  | 0   | 0,67                                       | 0,10                                     | 0,07   |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 25,95           | 0   | 0,27  | 0   | 0,96                                       | 0  | 0,05   |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 26,05           | 0   | 0,25  | 0   | 0,95                                       | 0  | 0,05   |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 66,40           | 0,93  | 0,42  | 0   | 1,23                                       | 0,07                                     | 0,03   |

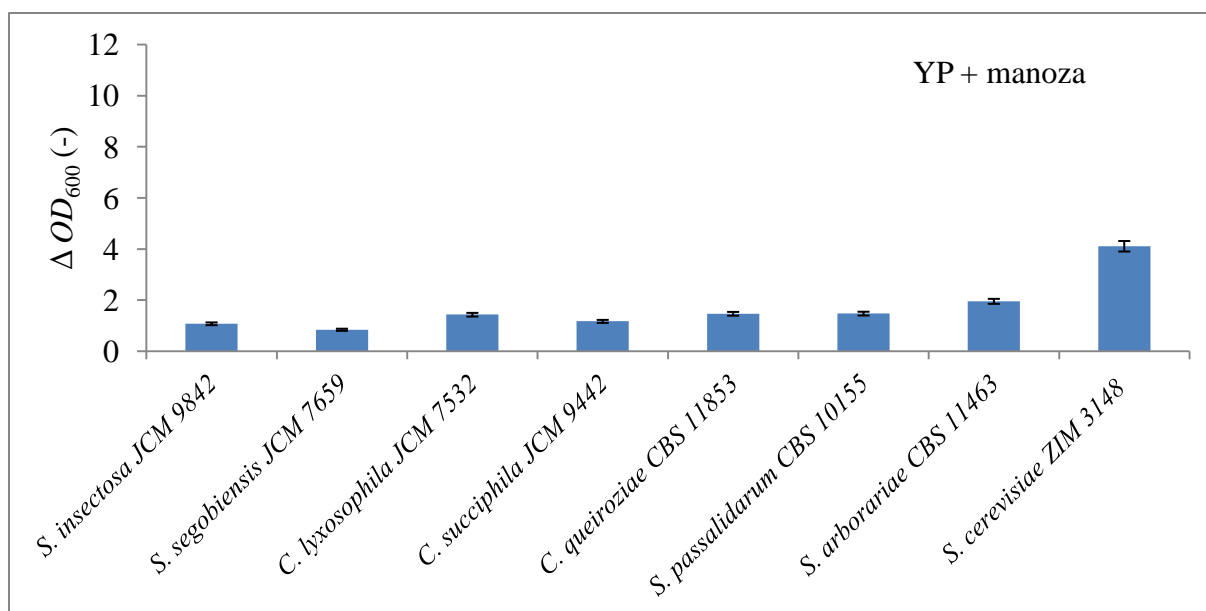
#### 4.1.2.3. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na manози

Manoza, kao i galaktoza, je ugljikohidrat prisutan u različitim udjelima u hemiceluloznoj komponenti lignoceluloznih sirovina te se nalazi u značajnijim koncentracijama u sulfitnoj lužini i hidrolizatu bagaze šećerne trske (du Perez i sur., 1986). Manani predstavljaju najveću frakciju u sastavu hemiceluloze mekih drva te služe za pohranu energije u različitim biljkama (npr. kokos, zrna kave, rogača, aloe vera, palmine sjemenke) te kao sastavni dio stanične stijenke kvasca. Iskorištavanje ovih sirovina poprima sve veći interes te se stoga učestalo istražuju mikroorganizmi koji mogu uspješno koristiti manozu kao glavni izvor ugljika (Ishii i sur., 2016).

Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je u YP podlozi s manozom u aerobnim (Slika 11.) i anaerobnim uvjetima (Slika 12.) tijekom 48 sati pri 28°C kako bi se mogli odrediti osnovni produkti metabolizma ovih kvasaca (Tablica 9.).



**Slika 11.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s manozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u aerobnim uvjetima pri 28°C.



**Slika 12.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s manozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Slično kao i u YP podlozi s glukozom i galaktozom, svi ne-*Saccharomyces* kvasci i kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 rastu u YP podlozi s manozom. Kvasci *Spathaspora passalidarum* CBS 10155, *Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Candida queiroziae* CBS 11853, *Candida succiphila* JCM 9442, *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 i *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 utrošili su više od 90 % manoze prisutne u YP podlozi s manozom u aerobnim uvjetima pri 28°C. *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 utrošio je 60,10 % prisutne manoze u hranjivoj podlozi za uzgoj dok je kvasac *Candida lyxosophila* JCM 7532 utrošio 74,25 % prisutne manoze.

Najveću potrošnju manoze tijekom anaerobnog uzgoja ostvario je *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 u iznosu od 79,90 %. *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 nije proizvodio etanol na manozu u aerobnim uvjetima. *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 i *Candida lyxosophila* JCM 7532 proizvode etanol uz koeficijent konverzije supstrata u etanol od 0,05 g g<sup>-1</sup> i 0,06 g g<sup>-1</sup>, dok je koeficijent konverzije manoze u etanol iznosio 0,09 g g<sup>-1</sup> za kvasac *Spathaspora arborariae* CBS 11463. Za kvasce *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Candida succiphila* JCM 9442 određeni su približno jednaki koeficijenti konverzije manoze u etanol od 0,14 g g<sup>-1</sup> i 0,13 g g<sup>-1</sup>. Za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 koeficijent konverzije manoze u etanol iznosio je 0,21 g g<sup>-1</sup>, a najveći koeficijent konverzije od 0,24 g g<sup>-1</sup> određen je za kvasac *Candida queiroziae* CBS 11853.

U Tablici 9. prikazani su ostali produkti nastali tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja na manozu. Najviše arabitola proizvedeno je u podlozi s manozom pomoću kvasca *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 u koncentraciji od 1,49 g L<sup>-1</sup> ( $Y_{P/S} = 0,08 \text{ g g}^{-1}$ ).

**Tablica 9.** Osnovni produkti metabolizma *ne-Saccharomyces* kvasaca određeni tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja u YP podlozi s manozom.

|          | Kvasac                           | Utrošeni UH (%) | $\gamma_{\text{EtOH}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{glicerol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{arabitol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{HAc}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{EtOH/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| AEROBNO  | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 98,55           | 0   | 0,16  | 1,49  | 0  | 0  | 0,01   |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 60,10           | 0,61  | 0,64  | 0,23  | 0,48                                       | 0,05                                     | 0,05   |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 74,25           | 0,86  | 0,49  | 0   | 0  | 0,06                                     | 0,03   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 99,50           | 2,55  | 0   | 0   | 0  | 0,13                                     | 0  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 98,50           | 4,73  | 0,02  | 0   | 0,08                                       | 0,24                                     | 0  |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 98,35           | 2,84  | 0,29  | 0   | 0,16                                       | 0,14                                     | 0,01   |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 98,70           | 1,85  | 0,29  | 0,13  | 0,72                                       | 0,09                                     | 0,01   |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 98,95           | 4,08  | 0,88  | 0   | 0,36                                       | 0,21                                     | 0,04   |
| ANAERBNO | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | n.o.            | 0   | 0,30  | 0   | 2,18                                       | -  | -  |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 3,40            | 0   | 0,25  | 0   | 2,20                                       | 0  | 0  |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 21,00           | 0   | 0,43  | 0   | 1,12                                       | 0  | 0  |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 44,45           | 0   | 0,26  | 0   | 1,75                                       | 0  | 0  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 40,40           | 0   | 0,56  | 0   | 0,37                                       | 0  | 0  |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 20,35           | 0   | 0,37  | 0   | 0,87                                       | 0  | 0  |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 15,05           | 0   | 0,27  | 0   | 0,98                                       | 0  | 0  |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 79,90           | 0   | 0,91  | 0   | 1,46                                       | 0  | 0  |

n.o. nije određeno

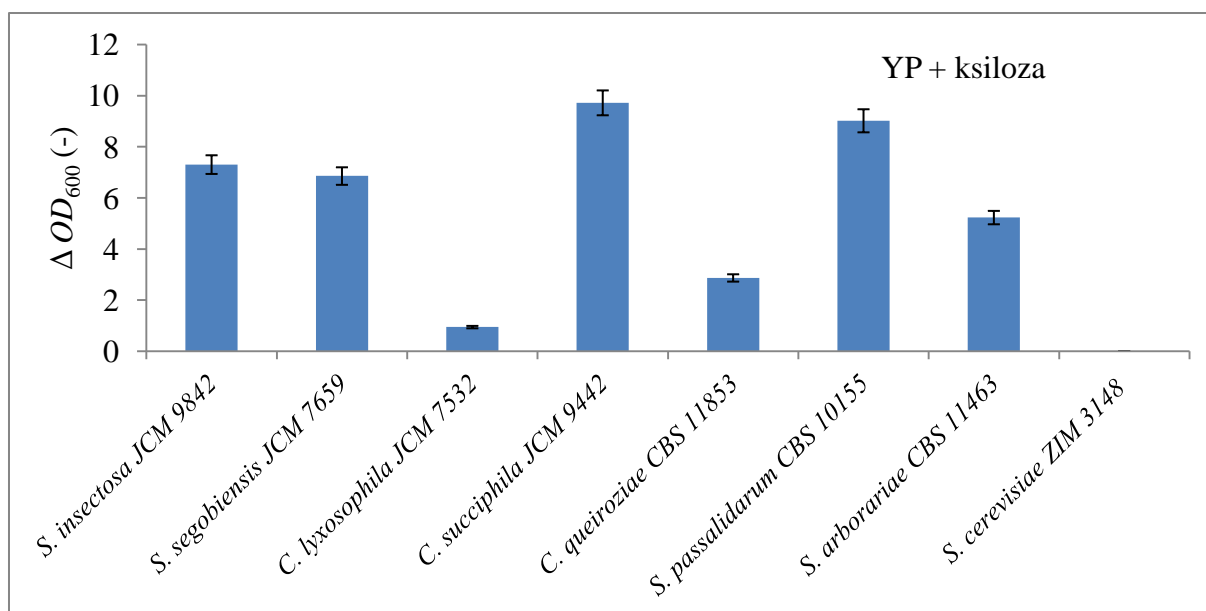
#### 4.1.3. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na pentozama (ksiloza, arabinoza)

Ksiloza i arabinoza su pentoze koje se nalaze u lignoceluloznim sirovinama. Ksiloza je drugi najzastupljeniji ugljikohidrat prisutan u lignocelulozi i u lignoceluloznim hidrolizatima. Ovaj ugljikohidrat sačinjava oko 30 % odnosno 90 % od ukupnih ugljikohidrata prisutnih u celuloznim, odnosno hemiceluloznim hidrolizatima. Arabinoza je, kao i ksiloza, ugljikohidrat prisutan u hidrolizatima lignoceluloze, ali u manjim udjelima ovisno o lignoceluloznoj sirovini koja se koristi za procese predobrade i hidrolize lignoceluloze. Potpuno iskorištavanje ovih sirovina doprinosi većoj efikasnosti konsolidiranih bioprocasa (Hara i sur., 2017). Dobiveni rezultati su prikazani na Slikama 13. – 16. i u Tablicama 10. i 11.

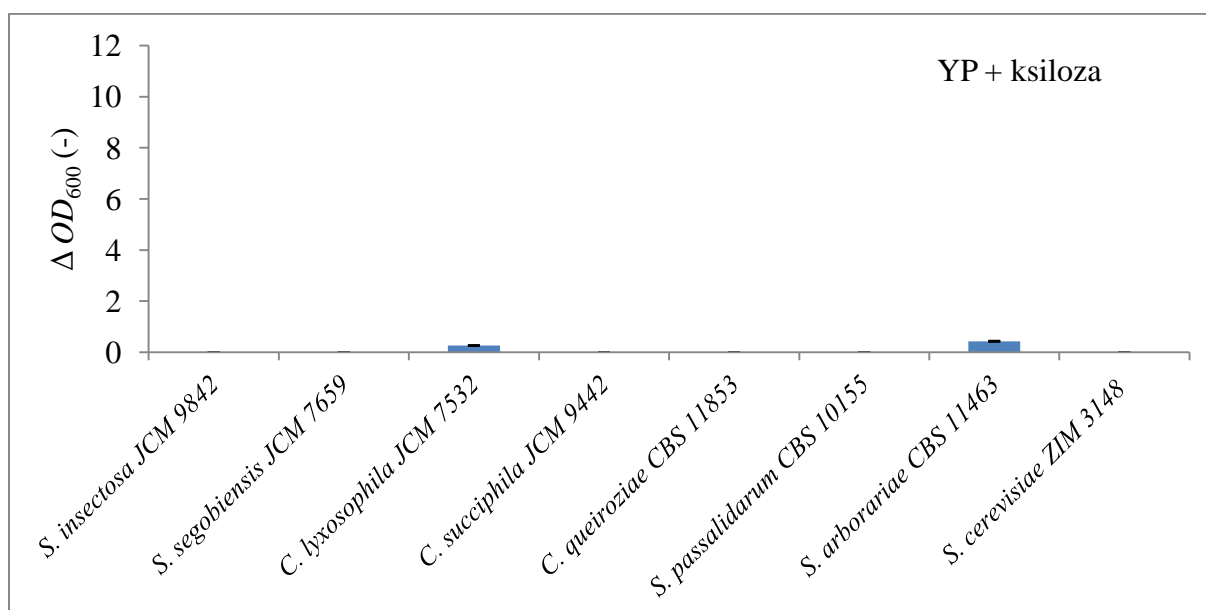
##### 4.1.3.1. *Određivanje rasta i aktivnosti ne-Saccharomyces kvasaca na ksilozi*

Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je u YP podlozi sa ksilozom u aerobnim (Slika 13.) i anaerobnim uvjetima (Slika 14.) tijekom 48 sati pri 28°C kako bi se mogli odrediti osnovni produkti metabolizma ovih kvasaca (Tablica 10.).





**Slika 13.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge sa ksilozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u aerobnim uvjetima pri 28°C.



**Slika 14.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge sa ksilozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Tijekom uzgoja kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155, *Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842, *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 u YP podlozi sa ksilozom u aerobnim uvjetima

utrošeno je više od 90 % ksiloze. Kvasac *S. cerevisiae*, očekivano, ne raste u podlozi sa ksilozom.

Tijekom anaerobnog uzgoja na ksilozi određen je jedva primjetan rast za kvasce *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Candida lyxosophila* JCM 7532 (Slika 15.)

Kvasci *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842, *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Candida lyxosophila* JCM 7532 proizvode etanol iz ksiloze u aerobnim uvjetima uz koeficijent konverzije od 0,06 g g<sup>-1</sup>, 0,07 g g<sup>-1</sup> i 0,08 g g<sup>-1</sup>. Jednaki koeficijenti konverzije ksiloze u etanol od 0,14 g g<sup>-1</sup> određeni su za kvasce *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 (Tablica 10.). U ranije provedenim istraživanjima određeni su koeficijenti konverzije ksiloze u etanol za kvasac *Spathaspora passalidarum* od 0,28 g g<sup>-1</sup>, a za kvasac *Spathaspora arborariae* od 0,25 g g<sup>-1</sup> (Veras i sur., 2017).

Najveći koeficijent konverzije ksiloze u etanol određen je u YP podlozi s ksilozom s pomoću kvasca *Candida queiroziae* CBS 11853 i iznosio je 0,29 g g<sup>-1</sup> (Tablica 10.).

Niti jedan odabrani kvasac ne proizvodi etanol na ksilozi u anaerobnim uvjetima (Tablica 10.). Međutim, prema istraživanju autora Cadete i sur. (2016), u uvjetima limitacije kisikom na ksilozi, kvasac *Spathaspora arborariae* može proizvoditi etanol uz konverzije supstrata u produkt od 0,32 g g<sup>-1</sup>, a *Spathaspora passalidarum* od 0,48 g g<sup>-1</sup> (Cadete i sur., 2016).

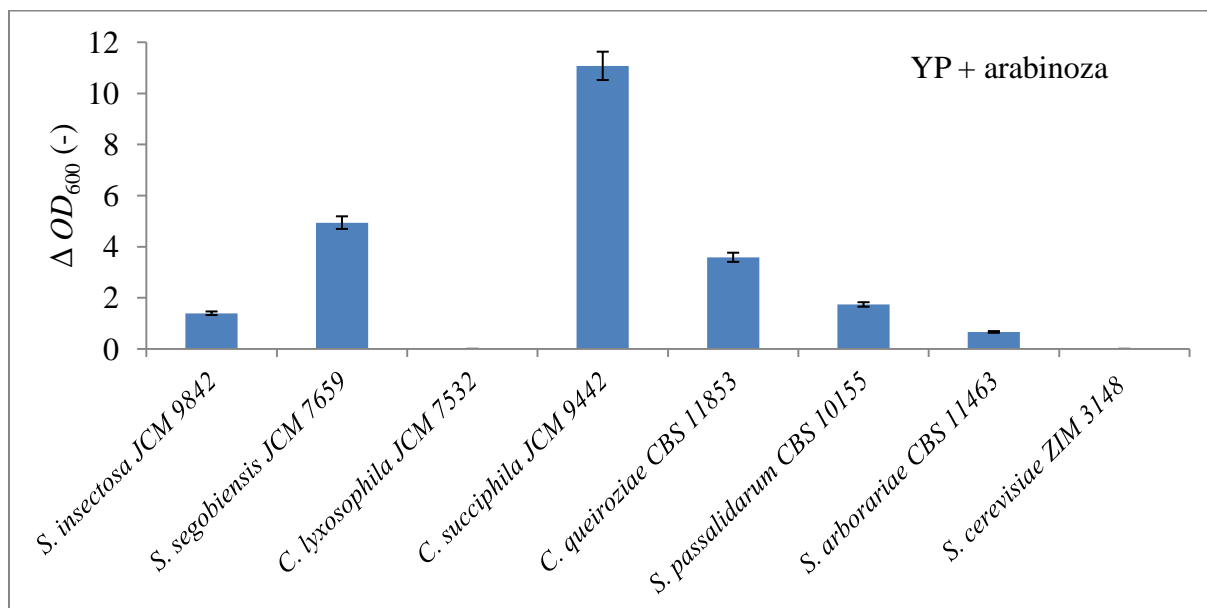
Tijekom aerobnog uzgoja na ksilozi proizveden je i arabitol u koncentraciji od 0,14 g L<sup>-1</sup> (*Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659) i 0,13 g L<sup>-1</sup> (*Scheffersomyces insectosa* JCM 9842; Tablica 10.).

**Tablica 10.** Osnovni produkti metabolizma ne-*Saccharomyces* kvasaca određeni tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja u YP podlozi sa ksilozom.

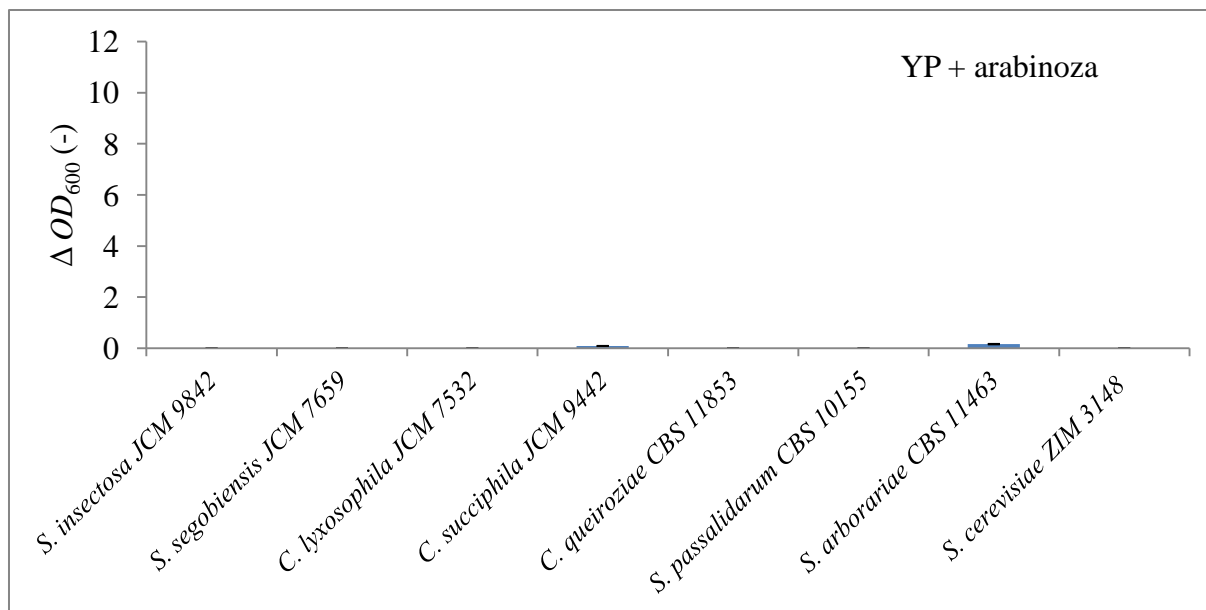
|          | Kvasac                           | Utrošeni UH (%) | $\gamma_{\text{EtOH}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{glicerol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{arabitol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{HAc}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{EtOH/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| AEROBNO  | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 97              | 1,00  | 0,58  | 0,13  | 0  | 0,06                                     | 0,04   |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 98,75           | 2,80  | 2,15  | 0,14  | 0,55                                       | 0,14                                     | 0,11   |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 96,04           | 1,45  | 0,97  | 0   | 0  | 0,08                                     | 0,05   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 76,34           | 0,16  | 0   | 0   | 0  | 0,01                                     | 0  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 57,16           | 3,56  | 0,37  | 0   | 0  | 0,29                                     | 0,03   |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 98,47           | 1,36  | 0,13  | 0   | 0  | 0,07                                     | 0,01   |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 96,04           | 2,82  | 0,23  | 0   | 0,16                                       | 0,14                                     | 0,01   |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 0               | 0   | 0,11  | 0   | 0  | 0  | 0,05   |
| ANAERBNO | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 0               | 0   | 0,27  | 0   | 2,39                                       | -  | -  |
|          | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 0               | 0   | 0,25  | 0   | 2,41                                       | -  | -  |
|          | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 0,77            | 0   | 0,34  | 0   | 1,32                                       | 0  | 2,21   |
|          | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 0               | 0   | 0,25  | 0   | 1,52                                       | -  | -  |
|          | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 7,22            | 0   | 0,31  | 0   | 1,26                                       | 0  | 0,21   |
|          | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 3,32            | 0   | 0,29  | 0   | 0,03                                       | 0  | 0,43   |
|          | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 0               | 0   | 0,27  | 0   | 1,09                                       | -  | -  |
|          | <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148    | 0               | 0   | 0,26  | 0   | 2,09                                       | -  | -  |

#### 4.1.3.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na arabinozi

Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je u YP podlozi s arabinozom u aerobnim (Slika 15.) i anaerobnim uvjetima (Slika 16.) tijekom 48 sati pri 28°C kako bi se mogli odrediti osnovni produkti metabolizma ovih kvasaca (Tablica 11.).



**Slika 15.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s arabinozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u aerobnim uvjetima pri 28°C.



**Slika 16.** Promjena optičke gustoće ( $\Delta OD_{600}$ ) u uzorcima izuzetim iz YP podloge s arabinozom nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Kvasci *Candida lyxosophila* JCM 7532 i *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 ne mogu koristiti arabinozu kao izvor ugljika za rast biomase u aerobnim uvjetima (Slika 15.), dok prema autorima Cadete i sur. (2009) ni kvasac *Spathaspora arborariae* ne raste na arabinozi. U anaerobnim uvjetima zabilježen je neznatan rast kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Candida succiphila* JCM 9442 na arabinozi (Slika 16.).

Najveću potrošnju arabinoze od 45,23 % tijekom aerobnog uzgoja ostvario je *Candida succiphila* JCM 9442. Kod *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 potrošnja arabinoze iznosila je 19,65 %, a kod *Spathaspora arborariae* CBS 11463 12,02 %. Kod *Candida queiroziae* CBS 11853 uočena je potrošnja od 8,06 %. Ranije istraživanje pokazalo je kako *Candida queiroziae* može asimilirati arabinozu (Santos i sur., 2011).

Kvasac *Candida lyxosophila* JCM 7532 proizveo je male količine etanola tijekom anaerobnog uzgoja u YP podlozi s arabinozom uz konverzije supstrata u produkt u iznosu od 0,07 g g<sup>-1</sup>.

Svi kvasci osim *Candida succiphila* JCM 9442 i *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 na arabinozi u aerobnim uvjetima proizvode arabitol (Tablica 11.). Najveću koncentraciju proizvedenog arabitola postigli su *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 (4,16 g L<sup>-1</sup>,  $Y_{P/S} = 0,49$  g g<sup>-1</sup>) i *Spathaspora arborariae* CBS 11463 (3,52 g L<sup>-1</sup>,  $Y_{P/S} = 0,63$  g g<sup>-1</sup>).

**Tablica 11.** Osnovni produkti metabolizma *ne-Saccharomyces* kvasaca određeni tijekom aerobnog i anaerobnog uzgoja u YP podlozi s arabinozom.

|                               | Kvasac                           | Utrošeni UH (%) | $\gamma_{\text{EtOH}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{glicerol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{arabitol}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $\gamma_{\text{HAc}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{EtOH/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) | $Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| AEROBNO                       | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 4,03            | 0   | 0,16  | 1,49  | 0  | 0  | 0,04   |
|                               | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 6,04            | 0   | 0,54  | 1,55  | 0  | 0  | 0,11   |
|                               | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 12,02           | 0,27  | 0,13  | 1,48  | 0  | 0,07                                     | 0,04   |
|                               | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 45,23           | 0   | 0   | 0   | 0  | 0  | 0  |
|                               | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 8,60            | 0   | 0   | 2,39  | 0  | 0  | 0  |
|                               | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 29,65           | 0   | 0,16  | 4,16  | 0  | 0  | 0,02   |
|                               | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 12,02           | 0   | 0,24  | 3,52  | 0  | 0  | 0,04   |
| <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148 | 0                                | 0               | 0,06  | 0   | 0   | 0  | 0,02                                     |  |
| ANAERBNO                      | <i>S. insectosa</i> JCM 9842     | 0               | 0   | 0,25  | 0   | 1,08                                       | -  | -  |
|                               | <i>S. segobiensis</i> JCM 7659   | 0               | 0   | 0,25  | 0   | 1,09                                       | -  | -  |
|                               | <i>C. lyxosophila</i> JCM 7532   | 0               | 0   | 0,34  | 0   | 0,82                                       | -  | -  |
|                               | <i>C. succiphila</i> JCM 9442    | 9,38            | 0   | 0,25  | 0   | 1,36                                       | 0  | 0,13   |
|                               | <i>C. queiroziae</i> CBS 11853   | 0               | 0   | 0,27  | 0   | 1,27                                       | -  | -  |
|                               | <i>S. passalidarum</i> CBS 10155 | 0               | 0   | 0,26  | 0   | 0,68                                       | -  | -  |
|                               | <i>S. arborariae</i> CBS 11463   | 0               | 0   | 0,25  | 0   | 0,66                                       | -  | -  |
| <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148 | 0                                | 0               | 0,25  | 0   | 1,77  | -  | -  |  |

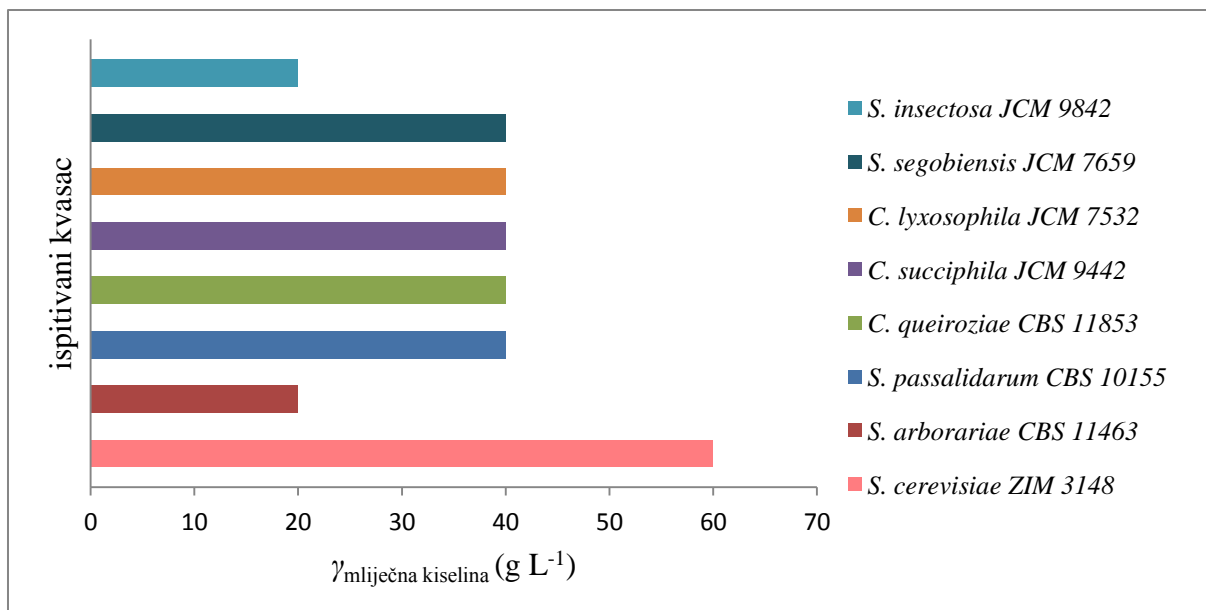
#### 4.2. Određivanje inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast i aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca

Određivanje inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast i aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 provedeno je nacjepljivanjem suspenzije kvasaca na YPD agar podloge u koje su dodane različite koncentracije mliječne kiseline (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 g L<sup>-1</sup>). Uzgoj kvasaca proveden je u aerobnim i u anaerobnim uvjetima (postupak i analitičke metode objašnjeni u Poglavlju 3.4.) pri 28°C. Rezultati su prikazani na Slici 17. i na Slici 18. U slučaju visoke tolerancije, takvi ne-*Saccharomyces* kvasci potencijalni su kandidati za genetičke modifikacije u soj producent mliječne kiseline.

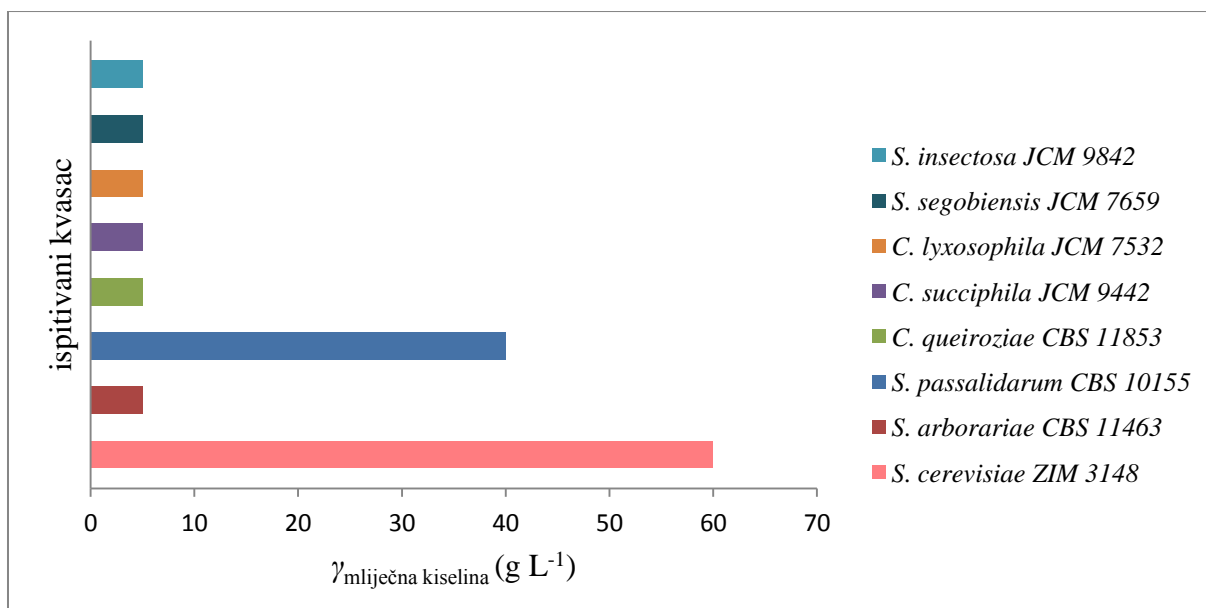
Na Slici 17. prikazani su rezultati uzgoja odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na podlogama s različitim koncentracijama mliječne kiseline u aerobnim uvjetima.

Od ispitivanih ne-*Saccharomyces* kvasaca u aerobnim uvjetima, *S. insectosa* JCM 9842 i *S. arborariae* CBS 11463 imaju najmanju otpornost prema mliječnoj kiselini te mogu rasti u rasponu koncentracije mliječne kiseline od 1 do 20 g L<sup>-1</sup>, tj. pri većim koncentracijama mliječne kiseline inhibiran je rast tih dvaju sojeva (Slika 17.).

Kvasci *S. segobiensis* JCM 7659, *C. lyxosophila* JCM 7532, *C. succiphila* JCM 9442, *C. queiroziae* CBS 11853 i *S. passalidarum* CBS 10155, imaju dvostruko veću rezistenciju prema mliječnoj kiselini te tako mogu rasti i na podlozi u kojoj je koncentracija mliječne kiseline iznosila 40 g L<sup>-1</sup>. Kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 može rasti u podlozi u kojoj je koncentracija mliječne kiseline 60 g L<sup>-1</sup> te niti jedan od testiranih ne-*Saccharomyces* kvasaca nema istu ili veću toleranciju na mliječnu kiselinu u aerobnim uvjetima od kvasaca *S. cerevisiae* ZIM 3148 (Slika 17.).



**Slika 17.** Određivanje inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u aerobnim uvjetima pri 28°C.



**Slika 18.** Određivanje inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Rezultati određivanja inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca u anaerobnim uvjetima prikazani su na Slici 18. U anaerobnim uvjetima kvasci *S. segobiensis* JCM 7659, *C. lyxosophila* JCM 7532, *S. insectosa* JCM 9842,



*Candida succiphila* JCM 9442, *C. queiroziae* CBS 11853 i *S. arborariae* CBS 11463 mogu rasti u podlogama u kojima su koncentracije mliječne kiseline maksimalno 5 g L<sup>-1</sup>. Nedostatak kisika nije utjecao na otpornost prema mliječnoj kiselini za kvasac *S. passalidarum* CBS 10155 ( $\gamma_{MK} = 40$  g L<sup>-1</sup>) i za kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 ( $\gamma_{MK} = 60$  g L<sup>-1</sup>; Slika 17. i Slika 18.) Poznato je da je za održavanje homeostaze u stanicama potrebna velika količina energije koja se lakše pridobiva u aerobnim uvjetima te je očekivano da kvasci u anaerobnim uvjetima toleriraju znatno niže koncentracije mliječne kiseline. Nadalje, niti jedan od ispitivanih ne-*Saccharomyces* kvasaca nema veću toleranciju na mliječnu kiselinu od kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148. Sojevi koji nisu tolerantni na visoke koncentracije mliječne kiseline nisu prikladni kandidati za genetičke transformacije u sojeve proizvođače mliječne kiseline.

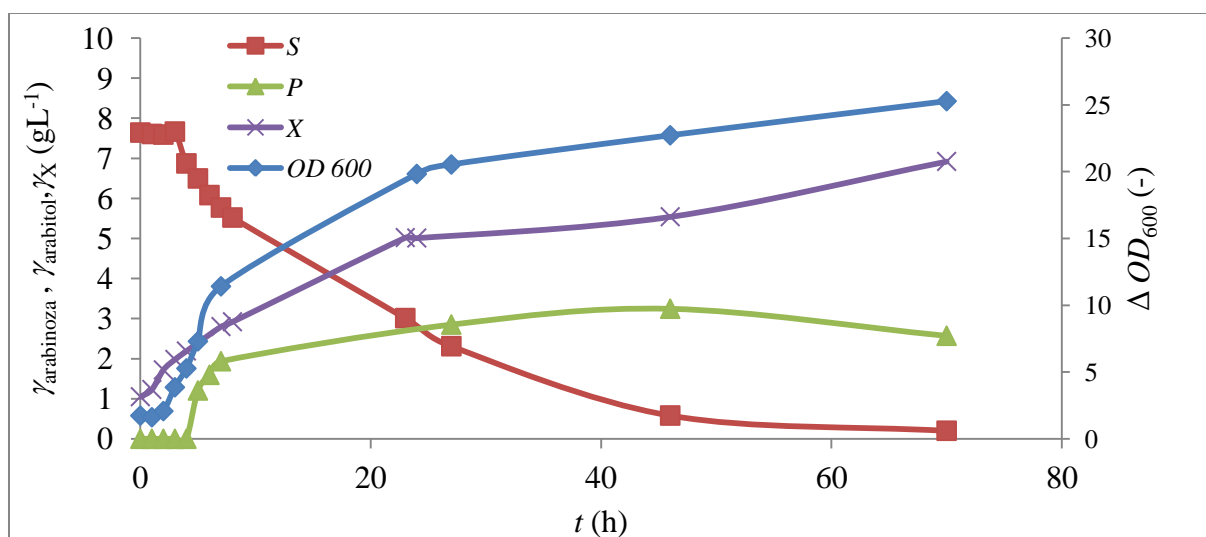
#### 4.3. Uzgoj kvasaca iz roda *Spathaspora* na arabinozi i proizvodnja arabitola

Nakon provedenih uzgoja odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima koji se nalaze u sastavu lignoceluloznih sirovina određeno je nekoliko vrsta kvasaca koje mogu proizvoditi arabitol: *Spathaspora passalidarum* CBS 10155, *Spathaspora arborariae* CBS 11463, *Candida queiroziae* CBS 11853, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 i *Scheffersomyces insectosa* JCM 9842 (Tablica 11.). Za procese proizvodnje arabitola odabrani su kvasci koji su imali najveći koeficijent konverzije arabinoze u arabitol, tj. *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborariae* CBS 11463. Koeficijent konverzije arabinoze u arabitol kod *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 iznosio je 0,49 g g<sup>-1</sup>, a kod *Spathaspora arborariae* CBS 11463 0,63 g g<sup>-1</sup> (Poglavlje 4.1.3.2; Tablica 11.). Detaljniji opis pripreme podloge, uzgoja u tikvicama i korištenih analitičkih metoda nalazi se u Poglavljima 3.2. i 3.3.

##### 4.3.1. Proizvodnja arabitola u YP podlozi s arabinozom s pomoću kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155

Uzgoj kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 proveden je u YP podlozi koja je sadržavala kvašćev ekstrakt (10 g L<sup>-1</sup>), pepton (20 g L<sup>-1</sup>) i arabinozu (10 g L<sup>-1</sup>). Uzgoj je proveden u aerobnim uvjetima na tresilici pri brzini okretaja od 200 o min<sup>-1</sup> te temperaturi uzgoja od 28°C.

Tijekom uzgoja praćeni su promjena optičke gustoće podloge pri 600 nm ( $\Delta OD_{600}$ ), koncentracija biomase gravimetrijski te koncentracije arabinoze, arabitola i nusprodukata poput glicerola i octene kiseline. Dobiveni su rezultati prikazani na Slici 19., a osnovni kinetički (specifična brzina rasta, brzina potrošnje supstrata i brzina proizvodnje arabitola) te parametri uspješnosti procesa prikazani su u Tablici 12.



**Slika 19.** Promjena koncentracije arabinoze ( $\gamma_{\text{arabinoza}}$ , ■), biomase ( $\gamma_X$ , ×), optičke gustoće uzorka ( $\Delta OD_{600}$ , ◆) i arabitola ( $\gamma_{\text{arabitol}}$ , ▲), tijekom aerobnog uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u YP podlozi s arabinozom pri 28°C.

Iz dijagrama prikazanog na Slici 19. vidljivo je iz promjene optičke gustoće i promjene koncentracije biomase kako je lag faza trajala dva sata. Na početku uzgoja koncentracija biomase iznosila je 1,05 g L<sup>-1</sup>, dok je početna koncentracija arabinoze u podlozi iznosila 7,64 g L<sup>-1</sup>. Na kraju lag faze koncentracija biomase iznosila je 2,8 g L<sup>-1</sup>.

Nakon 2 sata nastupila je eksponencijalna faza, odnosno faza ubrzanog rasta koja je trajala dvadeset sati, a maksimalna specifična brzina rasta biomase iznosila je 0,08 h<sup>-1</sup>.

Proizvodnja arabitola započela je u petom satu uzgoja te je trajala do 46. sata kada je postignuta koncentracija arabitola od 3,25 g L<sup>-1</sup>. Maksimalni koeficijent konverzije arabinoze u arabitol iznosio je 0,46 g g<sup>-1</sup>, dok je produktivnost iznosila 0,05 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Specifična brzina proizvodnje arabitola produkta iznosila je 0,05 h<sup>-1</sup>.

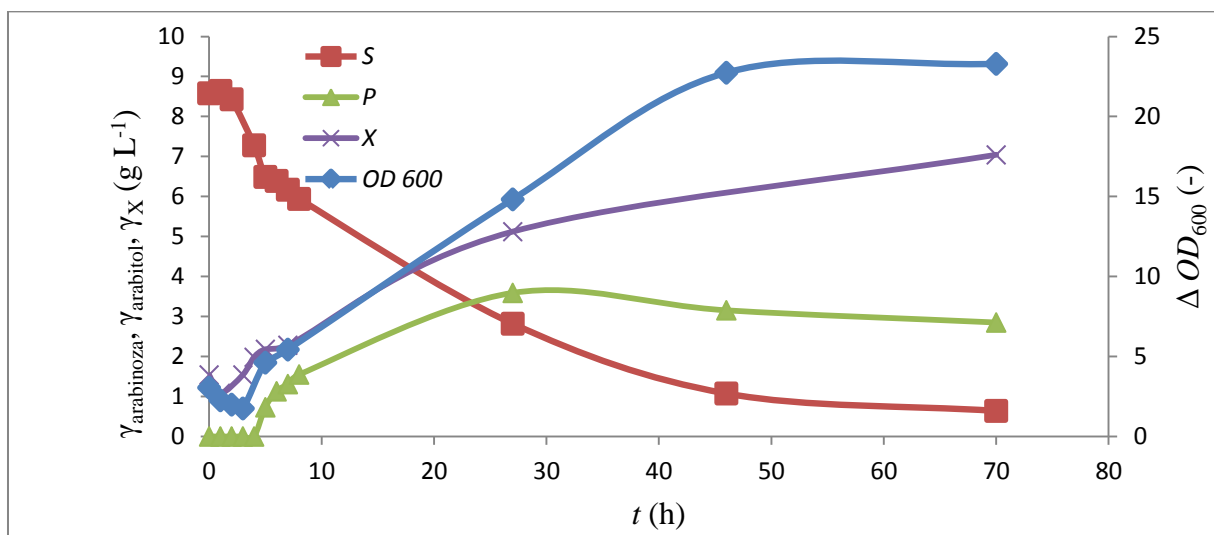
Nakon 46. sata, koncentracija je arabitola pala na 2,57 g L<sup>-1</sup> iz čega se može zaključiti kako pri niskim koncentracijama šećera *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 koristi arabitol kao izvor ugljika. U radu Su i sur. (2015) koncentracija arabitola tijekom

uzgoja nije prelazila  $1 \text{ g L}^{-1}$  kad se u podlozi kao glavni izvor ugljika koristi glukoza, ksiloza ili mješavina glukoze i ksiloze sa *Spathaspora passalidarum*. Efektivnost proizvodnje arabitola, u usporedbi s teorijskim, iznosio je 0,46, odnosno 45,36 % od teorijskog koeficijenta koji iznosi  $1,0133 \text{ g g}^{-1}$ .

#### 4.3.2. Proizvodnja arabitola u YP podlozi s arabinozom s pomoću kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463

Kao i tijekom uzgoja kvasca *S. passalidarum* CBS 10155, uzgoj kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 proveden je u YP podlozi s arabinozom u istim uvjetima.

Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće podloge pri 600 nm ( $\Delta OD_{600}$ ), koncentracija biomase gravimetrijski te koncentracije arabinoze, arabitola i nusprodukata poput glicerola i octene kiseline. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 20., a osnovni kinetički (specifična brzina rasta, brzina potrošnje supstrata i brzina proizvodnje arabitola) te parametri uspješnosti procesa prikazani su u Tablici 12.



**Slika 20.** Promjena koncentracije arabinoze ( $\gamma_{\text{arabinoza}}$ , ■), biomase ( $\gamma_{\text{X}}$ , ×), optičke gustoće uzorka ( $\Delta OD_{600}$ , ◆) i arabitola ( $\gamma_{\text{arabitol}}$ , ▲), tijekom aerobnog uzgoja kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 u YP podlozi s arabinozom pri 28°C.

Iz dijagrama prikazanog na Slici 20. vidljivo je iz promjene optičke gustoće i promjene koncentracije biomase kako je lag faza trajala tri sata. Na početku uzgoja,

koncentracija biomase iznosila je  $1,54 \text{ g L}^{-1}$ , dok je početna koncentracija arabinoze u podlozi iznosila  $8,58 \text{ g L}^{-1}$ . Eksponencijalna faza trajala je 42 sata.

Maksimalna koncentracija proizvedenog arabitola dosegnuta je u 27. satu i iznosila je  $3,59 \text{ g L}^{-1}$ . Nakon 27. sata koncentracija je arabitola počela lagano padati. Iz toga se može zaključiti da *Spathaspora arborariae* CBS 11463 u uvjetima niske koncentracije arabinoze kao izvor ugljika za rast biomase može koristiti i arabitol. Koeficijent konverzije arabinoze u arabitol iznosio je  $0,62 \text{ g g}^{-1}$ , a brzina proizvodnje arabitola  $0,04 \text{ h}^{-1}$ . Produktivnost s obzirom na arabitol iznosila je  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Efektivnost procesa proizvodnje arabitola sa *Spathaspora arborariae* CBS 11463 na arabinozi u tikvicama bio je 61,51 % od teorijskog.

*Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborariae* CBS 11463 od ostalih nusprodukata proizvodili su i glicerol. Najveća koncentracija glicerola za *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 iznosila je  $0,29 \text{ g L}^{-1}$ , a za *Spathaspora arborariae* CBS 11463  $0,35 \text{ g L}^{-1}$ . Tijekom aerobnog uzgoja na arabinozi *Spathaspora* kvasci ne proizvode etanol.

**Tablica 12.** Usporedba osnovnih kinetičkih parametara i procesnih parametara tijekom proizvodnje arabitola s pomoću kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborariae* CBS 11463.

|                    | <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155 | <i>Spathaspora arborariae</i> CBS 11463 |
|--------------------|---|---|
| $t_{\text{lag}}$   | 7 h                                       | 4 h                                     |
| $t_{\text{exp}}$   | 20 h                                      | 42 h                                    |
| $Y_{\text{X/S}}$   | $0,74 \text{ g g}^{-1}$                   | $0,57 \text{ g g}^{-1}$                 |
| $Y_{\text{P/S}}$   | $0,46 \text{ g g}^{-1}$                   | $0,62 \text{ g g}^{-1}$                 |
| $Y_{\text{P/X}}$   | $0,72 \text{ g g}^{-1}$                   | $1,00 \text{ g g}^{-1}$                 |
| $Pr_{\text{X/S}}$  | $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$    | $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  |
| $Pr_{\text{P/S}}$  | $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$    | $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  |
| $q_{\text{pmax}}$  | $0,05 \text{ h}^{-1}$                     | $0,04 \text{ h}^{-1}$                   |
| $q_{\text{smax}}$  | $0,11 \text{ h}^{-1}$                     | $0,06 \text{ h}^{-1}$                   |
| $\mu_{\text{max}}$ | $0,08 \text{ h}^{-1}$                     | $0,03 \text{ h}^{-1}$                   |
| $E$                | 45,36 %                                   | 61,51 %                                 |

Eksponecijalna faza kod *Spathaspora arborariae* CBS 11463 traje gotovo dvostruko duže od eksponecijalne faze *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 (Tablica 12.).

Specifična brzina potrošnje supstrata veća je kod *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 za oko 46 % u odnosu na *Spathaspora arborariae* CBS 11463. Također, maksimalna specifična brzina rasta *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 veća je za oko 59% od maksimalne specifične brzine rasta *Spathaspora arborariae* CBS 11463.

Koeficijent konverzije supstrata u produkt bio je veći kod *Spathaspora arborariae* CBS 11463 za oko 26% nego kod *Spathaspora passalidarum* CBS 10155. Ako se usporede koeficijenti konverzije supstrata u produkt tijekom uzgoja u tikvicama sa onima tijekom uzgoja u kivetama, vidi se kako su oni približno jednaki. Koeficijent konverzije supstrata u produkt tijekom aerobnog uzgoja na arabinozi u kivetama iznosio je 0,49 g g<sup>-1</sup> za *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 te 0,63 g g<sup>-1</sup> za *Spathaspora arborariae* CBS 11463.

Efikasnost procesa proizvodnje arabitola pomoću kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 veća je za 16,15 % od efikasnosti određene za proces proveden s pomoću kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 te se može zaključiti da je kvasac *Spathaspora arborariae* CBS 11463 najpogodniji za proizvodnju arabitola na arabinozi.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Na celobiozi u aerobnim uvjetima rastu svi testirani ne-*Saccharomyces* kvasci, dok u anaerobnim uvjetima na celobiozi rastu testirani kvasci iz roda *Candida* i kvasac *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659. Od testiranih kvasaca, kvasac *Candida queiroziae* CBS 11853 proizvodi najviše etanola u podlozi s celobiozom ( $\gamma_{\text{etanol, AE}} = 6,53 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{etanol, AN}} = 0,51 \text{ g L}^{-1}$ ), uz koeficijent konverzije celobioze u etanol od  $0,43 \text{ g g}^{-1}$  za aerobne uvjete, odnosno  $0,18 \text{ g g}^{-1}$  za anaerobne uvjete.
2. Svi testirani ne-*Saccharomyces* kvasci rastu u podlozi s heksozama (glukozi, galaktozi i manozu) u aerobnim i anaerobnim uvjetima.
3. U aerobnim uvjetima na ksilozi rastu svi ne-*Saccharomyces* kvasci, dok u anaerobnim uvjetima na ksilozi rastu kvasci *Candida lyxosophila* JCM 7532 i *Spathaspora arborariae* CBS 11463.
4. Na arabinozi u aerobnim uvjetima rastu svi testirani ne-*Saccharomyces* kvasci, osim kvasca *Candida lyxosophila* JCM 7532, dok u anaerobnim uvjetima na arabinozi raste samo kvasac *Candida succiphila* JCM 9442.
5. Arabitol u podlozi s arabinozom u aerobnim uvjetima, s relativno visokim koeficijentom konverzije supstrata u produkt, proizveli su kvasci *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 ( $Y_{P/S} = 0,49 \text{ g g}^{-1}$ ) i *Spathaspora arborariae* CBS 11463 ( $Y_{P/S} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ ) te su odabrani za proizvodnju arabitola u većem mjerilu.
6. Osim navedenih kvasaca, arabitol proizvode i kvasci *Candida queiroziae* CBS 11463, *Candida lyxosophila* JCM 7532, *Scheffersomyce insectosa* JCM 9842 i *Scheffersomyces segobiensis* JCM 7659 tijekom uzgoja u podlogama s različitim ugljikohidratima kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim uvjetima, ali s manjim prinosom i koeficijentom konverzije ugljikohidrata u arabitol.

7. Inhibitorni učinak mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca testiran je u rasponu koncentracija mliječne kiseline od 1 do 70 g L<sup>-1</sup> u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Testirani ne-*Saccharomyces* kvasci ne rastu na podlozi s glukozom pri koncentracijama mliječne kiseline većim od 40 g L<sup>-1</sup>. Odabrani ne-*Saccharomyces* kvasci nisu pogodni kandidati za genetičke transformacije u soj producent mliječne kiseline.
  
8. Tijekom uzgoja kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 u podlozi s arabinozom kao glavnim izvorom ugljika proizvedeno je 3,59 g L<sup>-1</sup> arabitola uz  $Y_{P/S}$  od 0,63 g g<sup>-1</sup> i  $Pr_P$  od 0,67 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a tijekom uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 proizvedeno je 3,25 g L<sup>-1</sup> arabitola uz  $Y_{P/S}$  od 0,46 g g<sup>-1</sup> i  $Pr_P$  od 0,67 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> u istoj podlozi i pri istim uvjetima. Kvasac *Spathaspora arborariae* CBS 11463 postiže oko 10 % veći prinos arabitola od kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155.

## 6. LITERATURA

1. Anonymous 1 (2019)  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Arabinitol#section=Structures>>  
Pristupljeno 08. rujna 2019.
2. Anonymous 2 (2019)  
<[https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients\\_tech\\_manual.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients_tech_manual.pdf)> Pristupljeno  
08. rujna 2019.
3. Bura, R., Vajzovic, A., Doty, S. L. (2012) Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**(7), 1003-1011.
4. Cadete, R. M., de las Heras, A. M., Sandström, A. G., Ferreira, C., Gírio, F., Gorwa-Grauslund, M.-F., Rosa, C. A., Fonseca, C. (2016) Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: *XYL1.2* from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 167.
5. Cadete, R. M., Rosa, C. A. (2018) The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast.* **35**(2), 191-199.
6. Cadete, R. M., Santos, R. O., Melo, M. A., Mouro, A., Davi L. Goncalves, D. V., Stambuk, B. U., Gomes, F. C. O., Lachance, M. A, Rosa, C. A. (2009) *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast. Res.* **9**, 1338–1342.
7. da Cunha-Pereira, F., Hickert, L. R., Sehnem, N. T., de Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., Záchia Ayub, M. A. (2011) Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresource Techol.* **102**, 4218–4225.



8. Dalawai, N., Krupa, K. N., Bharani, S., Turaidar, V., Harinikumar, K. M., Vijayakumar Swamy, H. V. (2017) Yeast: Main Source of Ethanol and Biofuel. *Int. J. Pure App. Biosci.* **5(1)**, 631-639.
9. European Biomass Industry Association (2019) <<http://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biochemicals-and-biopolymers/>>. Pristupljeno 30. lipnja 2019.
10. Francois, J., Parrou, J.-L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 125-145.
11. Grembecka, M. (2015) Sugar alcohols – their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 1–14.
12. Ha, S.-J., Galazka, J.M., Kim, S.R., Choi, J.-H., Yang, X., Seo, J.-H., Glass, N.L., Cate, J.H.D., Jin, Y.-S. (2011) Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS.* **108**: 504-509.
13. Hara, K. Y., Kobayashi, J., Yamada, R., Sasaki, D., Kuriya, Y., Hirono-Hara, Y., Ishii, J., Araki, M., Kondo A. (2017) Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast.* **17**, 1-14.
14. Hickert, L. R., de-Souza Cruz, P. B., Rosa, C. A., Záchia Ayub, M. A. (2013) Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource Technol.* **143**, 112–116.
15. Hou, X. (2012) Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **94**, 205–214.
16. Ishii, J., Okazaki, F., Djohan, A. C., Hara, K. Y., Asain-Nakashima, N., Teramura, H., Andriani, A., Tominaga, M., Wakai, S., Kahar, P., Yopi, Prasetya, B., Ogino, C., Kondo, A. (2016) From mannan to bioethanol: cell surface co-display of  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuel.* **9:188** DOI 10.1186/s13068-016-0600-4.

17. Jagtap, S. S., Rao, C. V. (2018) Production of D-arabitol from D-xylose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**(1), 143-151.
18. JCM-Japan Collection of Microorganisms <<https://jcm.brc.riken.jp/en/>>. Pristupljeno 02. rujna 2019.
19. Johnson, E. (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts-the basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(17), 7563-7577.
20. Kordowska-Wiater M., Kubik-Komar A., Targonski Z. (2012) Optimization of Arabitol Production by Karyoductant SP-K 7 of *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> and *P. stipitis* CCY 39501 Using Response Surface Methodology. *Pol. J. Microbiol.* **61**, 291-297.
21. Kordowska-Wiater, M., Kuzdraliński, A., Czernecki, T., Targoński, Z., Frąc, M., Karolina Oszust, K. (2017) The production of arabitol by a novel plant yeast isolate *Candida parapsilosis* 27RL-4. *Open Life Sci.* **12**: 326-336.
22. Kumar, A., Archana Gautam, A., Dutt, D. (2016) Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **7**, 149-168.
23. Kumdam H., Narayana Murthy S., Gummadi, S. N. (2013) Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB. Express.* **3**: 23.
24. Kumdam, H., Murthy, S. N., Gummadi, S. N. (2014) Arabitol production by microbial fermentation - biosynthesis and future applications. *IJSAR* **1**, 1-12.
25. Liu, C., Dong, H., Zhong, J., Ryu, D. D. Y., Bao, J. (2010) Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. *J. Biotechnol.* **148**, 105-112.

26. Long, T. M., Su, Y.-K., Headman, J., Higbee, A., Willis, L. B., Jeffries, T. W. (2012) Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Environ. Microb.* **78**, 5492-5500.
27. Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1. izd., Golden Marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
28. Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., Thevelein, J. M. (2017) Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 216.
29. du Perez J. C., Bosch, M., Prior, B. A. (1986) The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 228-233.
30. Renewable Fuels Association (2019) <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>>. Pristupljeno 30. lipnja 2019.
31. Santos, R. O., Cadete, R. M., Badotti, F., Mouro, A., Wallheim, D. O., Gomes, F. C. O., Stambuk, B. U., Lachance, M.-A., Rosa, C. A. (2011) *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **99**, 635–642.
32. Schulze, I., Hansen, S., Großhans, S., Rudsuck, T., Ochsenreither, K., Syltatk, C., Neumann, A. (2014) Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB. Express.* **4**, 24.
33. Segura-García, L. E., Taillandier, P., Brandam C., Gschaedler A. (2015) Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT-Food Sci. Technol.* **60(1)**, 284-291.
34. Su, Y.-K., Willis, L. B., Jeffries, T. W. (2015) Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol. Bioeng.* **112(3)**, 457-469.

35. Tomaszewska, L., Rywinska, A., Gladkowski, W. (2012) Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 1333–1343.
36. Toyoda, T., Ohtaguchi K. (2010) The properties of *Kluyveromyces lactis* for the production of D-arabitol from lactose. *Afr.J.Biotechnol.* **9(31)**, 4988-4992.
37. Veras, H. C. T., Parachin, N. S., Almeida, J. R. M. (2017) Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microb. Cell. Fact.* **16: 153** DOI 10.1186/s12934-017-0766-x.
38. WI-KNAW–Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (2019)  
<<http://www.westerdijk.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>>Pristupljeno 17. Srpnja 2019.

## 7. Prilozi

### 7.1. Popis kratica

| OZNAKA<br>VELIČINE | VELIČINA                                    | JEDINICA                             |
|--------------------|---|--------------------------------------|
| $t_{lag}$          | lag faza rasta                              | [h]                                  |
| $t_{exp}$          | eksponencijalna faza rasta                  | [h]                                  |
| $Y_{X/S}$          | koeficijent konverzije arabinoze u biomasu  | [g g <sup>-1</sup> ]                 |
| $Y_{P/S}$          | koeficijent konverzije arabinoze u arabitol | [g g <sup>-1</sup> ]                 |
| $Pr_X$             | produktivnost s obzirom na biomasu          | [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
| $Pr_P$             | produktivnost s obzirom na arabitol         | [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
| $q_{pmax}$         | maksimalna brzina nastanka produkta         | [h <sup>-1</sup> ]                   |
| $q_{smax}$         | maksimalna brzina potrošnje supstrata       | [h <sup>-1</sup> ]                   |
| $\mu_{max}$        | maksimalna specifična brzina rasta          | [h <sup>-1</sup> ]                   |
| $E$                | efikasnost procesa                          | [%]                                  |

## 7.2. Jednadžbe pravaca baždarnih dijagrama za određivanje koncentracije visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

**Tablica 13.** Retencijska vremena i jednadžbe pravaca baždarnih dijagrama za HPLC analizu.

| SPOJ              | $t_R$ (min) | JEDNADŽBA  | $R^2$ (-) |
|-------------------|-------------|--|-----------|
| celobioza         | 10,5704     | $A = 378874,59\gamma_{\text{celobioza}} - 797,70$          | 0,9999    |
| glukoza           | 12,5827     | $A = 372368,32\gamma_{\text{glukoza}} + 4487,07$           | 1,0000    |
| galaktoza         | 13,3743     | $A = 377242,19\gamma_{\text{galaktoza}} - 926,11$          | 1,0000    |
| manoza            | 13,5438     | $A = 372368,32\gamma_{\text{manoza}} - 926,11$             | 1,0000    |
| ksiloza           | 13,3620     | $A = 362057,08\gamma_{\text{ksiloza}} + 55598,61$          | 1,0000    |
| arabinoza         | 14,5229     | $A = 366483,61\gamma_{\text{arabinoza}} + 9888,80$         | 0,9999    |
| etanol            | 24,5143     | $A = 1163351,69\varphi_{\text{etanol}} - 953,28$           | 0,9998    |
| mliječna kiselina | 16,9174     | $A = 243473,97\gamma_{\text{mliječna kiselina}} + 2856,08$ | 0,9999    |
| octena kiselina   | 18,4665     | $A = 164952,58\gamma_{\text{octena kiselina}} + 2260,95$   | 0,9989    |
| glicerol          | 17,5007     | $A = 298199,58\gamma_{\text{glicerol}} - 7203,56$          | 1,0000    |
| arabitol          | 15,1563     | $A = 369263,41\gamma_{\text{arabitol}} - 9251,37$          | 1,0000    |

### 7.3. Jednadžbe pravaca baždarnih dijagrama za određivanje koncentracije tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

**Tablica 14.** Retencijska vremena i jednadžbe pravaca baždarnih dijagrama za UPLC analizu.

| SPOJ            | $t_R$ (min) | JEDNADŽBA  | $R^2$ (-) |
|-----------------|-------------|--|-----------|
| celobioza       | 3,9200      | $A = 144147\gamma_{\text{celobioza}} - 6285,5$       | 0,9996    |
| glukoza         | 4,7000      | $A = 372368,32\gamma_{\text{glukoza}} + 4487,07$     | 0,9999    |
| galaktoza       | 5,1080      | $A = 146529\gamma_{\text{galaktoza}} - 4914,5$       | 0,9999    |
| manoza          | 5,1080      | $A = 142576\gamma_{\text{manoza}} + 3815,8$          | 1,0000    |
| ksiloza         | 5,1910      | $A = 142576\gamma_{\text{ksiloza}} + 3815,8$         | 0,9999    |
| arabinoza       | 5,6080      | $A = 151554\gamma_{\text{arabinoza}} + 7676,4$       | 0,9998    |
| etanol          | 11,1000     | $A = 361299,75 \gamma_{\text{etanol}} - 27468,6$     | 1,0000    |
| octena kiselina | 7,7924      | $A = 8664,6\gamma_{\text{octena kiselina}} + 67,234$ | 0,9992    |
| glicerol        | 7,0067      | $A = 120817\gamma_{\text{glicerol}} + 3671,6$        | 0,9997    |
| arabitol        | 5,8440      | $A = 127741,79\gamma_{\text{arabitol}} + 1700,63$    | 1,0000    |