

Biotehnološka proizvodnja ksilitola iz lignoceluloznih sirovina

Vuradin, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:192997>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Valentina Vuradin
0058213158**

**Biotehnološka proizvodnja ksilitola iz lignoceluloznih
sirovina**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

U okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ OPB-SLS; 9717, voditelj projekta: Prof. dr. sc. Božidar Šantek

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Biotehnološka proizvodnja ksilitola iz lignoceluloznih sirovina

Valentina Vuradin, 0058213158

Sažetak:

Ksilitol je šećerni alkohol koji se primjenjuje u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima, a najznačajniju ulogu ima kao sladilo. Industrijski proizvedeni ksilitol dobiva se kemijskim putem. Sve se više istražuju biotehnološke metode, koje su povoljnije za okoliš, a koriste široko lignoceluloznu biomasu kao obnovljivu sirovinu. Primjenjuju se odgovarajuće metode predtretmana lignoceluloze sirovina koje prethode biokonverziji u ksilitol. Ksilitol mogu proizvesti različiti mikroorganizmi koji spadaju u kvasce, bakterije i plijesni. Radni mikroorganizmi se međusobno razlikuju po optimalnim uvjetima biosinteze ksilitola. Prema dostupnoj literaturi, sojevi kvasaca *Candida* i rekombinantne bakterije *Eschericia .coli* i *Corynebacterium glutamicum* daju najveće prinose ksilitola. Proizvedeni ksilitol izdvaja se iz fermentacijske podloge i pročišćava do kristalnog oblika primjenom različitih metoda.

Ključne riječi: ksilitol, biotehnološka proizvodnja, lignoceluloza, mikroorganizmi, pročišćavanje

Rad sadrži: 30 stranica, 8 slika, 6 tablica, 41 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

Datum obrane: 19. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Beer and Malt Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic raw materials

Valentina Vuradin, 0058213158

Abstract:

Xylitol is a sugar alcohol that is used in food and pharmaceutical products, and its most important role is as a sweetener. Industrially produced xylitol is obtained by chemical methods. . Biotechnological methods of xylitol production are increasingly being researched, which are more favorable for the environment and use lignocellulosic biomass as a renewable raw material. The appropriate methods of of lignocellulose pretreatment are applied, which precede the bioconversion into xylitol. Xylitol can be produced by various microorganisms that belong to yeasts, bacteria and molds. Working microorganisms differ from each other in the optimal conditions of xylitol biosynthesis. According to the available literature, *Candida* yeast strains and recombinant bacteria *Eschericia coli* and *Corynebacterium glutamicum* give the highest xylitol yields. The xylitol produced is separated from the fermentation medium and purified to a crystalline form using various methods.

Keywords: xylitol, biotechnological production, lignocellulose, microorganisms, purification

Thesis contains: 30 pages, 8 figures, 6 tables, 41 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Vlatka Petravić Tominac, Full Professor

Thesis defended: September 19th 2022.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Ksilitol	3
2.1. Općenito o ksilitolu	3
2.2. Struktura i svojstva ksilitola	3
2.3. Proizvodnja i tržište.....	5
2.4. Metode proizvodnje ksilitola	8
2.5. Primjena ksilitola i sigurnost njegove primjene	9
3. Mogućnosti biotehnoške proizvodnje ksilitola	10
3.1. Lignocelulozne sirovine	10
3.2. Radni mikroorganizmi i metabolički putevi biosinteze ksilitola	15
3.3. Odabrani primjeri proizvodnje ksilitola na lignoceluloznim sirovinama.....	17
3.4. Pročišćavanje i izolacija ksilitola.....	24
4. Zaključci	26
5. Literatura:.....	27

1. Uvod

Nedostatak globalnih resursa i zagađenje okoliša izazivaju zabrinutost javnosti. Oni također potiču industriju diljem svijeta na promjene proizvodnih procesa koje osiguravaju očuvanje prirodnih resursa, smanjenje potrebe za fosilnim gorivima i energijom te manji negativni utjecaj na okoliš. Zbog toga pažnju sve više privlače biotehnološki procesi kojima se mogu zamijeniti ranije korišteni postupci proizvodnje obnovljivih izvora energije i kemikalija. Razvoj i optimiranje ovakvih procesa izazovan je posao. Biotehnološka proizvodnja u industrijskom mjerilu primjenjuje se za samo određene proizvode poput etanola, organskih kemikalija, ksilitola, octene kiseline, vanilina i drugih organskih kemikalija (Queiroz i sur., 2022).

Lignocelulozna biomasa najdostupniji je obnovljivi organski resurs na Zemlji koji se može koristiti za konverziju u biogoriva i visokovrijedne proizvode kao što su industrijski enzimi, organske kiseline, farmaceutski proizvodi i kemikalije (Bogel–Lukasik i sur., 2012). Poljoprivredni ostaci, drvni ostaci i ostaci prehrambene industrije najznačajniji su izvori lignoceluloze te predstavljaju alternativni izvor energije. Tri osnovna strukturna polimera lignocelulozne biomase su celuloza, hemiceluloza i lignin. Kako bi se mogli dobiti željeni proizvodi, lignocelulozu je potrebno podvrgnuti odgovarajućim metodama predtretmana. Ovim postupcima oslobađaju se šećeri iz celuloze i hemiceluloze te se potom koriste kao supstrati u daljnjim fermentacijskim procesima (Jain i Ghosh, 2021).

Jedan od produkata koji se može industrijski proizvesti biotehnološkim postupkom je ksilitol, koji predstavlja visokovrijednu molekulu sa širokom primjenom u različitim granama industrije. Specifična svojstva i pozitivni utjecaji ovog poliola omogućuju primjenu u prehrambenim proizvodima, farmaceutskim preparatima, proizvodima za oralnu higijenu te kozmetici. Najveću primjenu pronalazi kao sladilo zbog svoje relativne slatkoće, male energetske vrijednosti i metabolizma neovisnom o inzulinu što ga čini pogodnim za dijabetičare (Queiroz i sur., 2022).

Ksilitol se može proizvesti kemijskim putem hidrogenacijom ksiloze ili biotehnološkim postupcima. Kemijska proizvodnja je uvelike zastupljena metoda proizvodnje ksilitola na tržištu, no sam postupak je energetski zahtjevan i skup. Alternativu predstavljaju bioprocasi koji kao sirovinu koriste raznolike lignocelulozne biomase te odgovarajuće sojeve mikroorganizama za fermentaciju (Ur-Rehman i sur., 2013). Biotehnološki postupci proizvodnje ksilitola provode se pri blažim uvjetima zbog čega zahtijevaju manje energije što ih čini jeftinijima i manje štetnima za okoliš. U oba slučaja dobiveni ksilitol je potrebno izdvojiti

i pročititi pri čemu se mogu koristiti različite strategije za dobivanje i kristalizaciju ksilitola u što čistijem obliku (Martinez i sur., 2015).

Predmet interesa ovog završnog rada je proizvodnja ksilitola biotehničkim postupcima. Napravljen je pregled glavnih svojstava i primjene ksilitola te najvažnijih aspekata proizvodnje. Pažnja je posvećena i samim sirovinama, metodama predtretmana te tehnikama pročišćavanja proizvoda.

2. Ksilitol

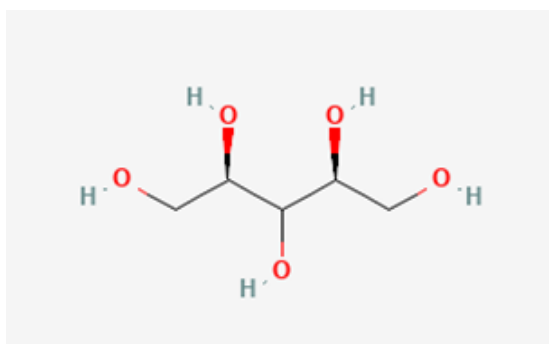
2.1. Općenito o ksilitolu

Ksilitol, pentiol ili brezin šećer (engl. xylitol) može se pronaći u zobi, oklascima kukuruza, bagasi šećerne trske, slami te drvima poput bukve ili breze. Voće i povrće kao što su bobičasto voće, salata, šljive, špinat, tikve i cvjetača također sadrže manje količine ksilitola. Ovaj šećerni alkohol, sastavljen od pet ugljikovih atoma i hidroksilnih skupina, ima značajnu primjenu kao zamjena za šećer budući da se u ljudskom tijelu metabolizira neovisno o inzulinu (Mussatto, 2012).

Karakteristike ksilitola su sposobnost zaslađivanja, metabolizam neovisan o inzulinu i nekancerogenost te se stoga ovaj poliol primjenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, u proizvodnji preparata za oralnu higijenu ali i u kemijskoj industriji (Antunes i sur., 2017; Azizah, 2019). Svjetsku popularnost ksilitol je stekao zbog manje kalorične vrijednosti u odnosu na konzumni šećer, antikariogenih svojstava te pozitivnog utjecaja na zdravlje. Ksilitol se može proizvoditi kemijskom sintezom, no zbog velikog utroška energije i zahtjevnog postupka pročišćavanja njegova proizvodnja je izuzetno skupa. Biotehnološki postupci mogu se provoditi pri blažim uvjetima te koriste različite metode predobrade sirovina. Postoji veliko zanimanje za pronalaženje ekonomski isplativih postupaka proizvodnje ksilitola iz lignocelulozne biomase te za komercijalizaciju takvih postupaka (Antunes i sur., 2017).

2.2. Struktura i svojstva ksilitola

Šećerni alkohol ksilitol ili 1,2,3,4,5-pentanpentol ($C_5H_{12}O_5$) sastoji se od pet ugljikovih atoma od kojih svaki veže po jednu hidroksilnu skupinu (Slika 1). Poznat je još pod nazivima ribitol, adonitol, eutrit, D-ribitol, brezin šećer itd. Njegova molarna masa iznosi 152,15 g/mol, ima četiri rotirajuće veze i dva kiralna centra (Anonimus 1, 2022).



Slika 1. Struktura ksilitola (Anonymous 1, 2022)

Ksilitol se nalazi u čvrstom agregacijskom stanju u obliku bijelog kristaličnog praha. Nema mirisa, no slatkog je okusa. Relativna slatkoća ksilitola jednaka je saharozi. Kalorijska vrijednost ksilitola je otprilike 2,4 kcal/g , a glikemijski indeks iznosi oko 7. Prelazi u tekuće stanje pri temperaturi 92 - 96 °C, a temperatura vrenja je 215 - 217 °C. Topljiv je u vodi i etanolu. pH vrijednost vodene otopine ksilitola iznosi 5 - 7. Stabilan je pri visokim temperaturama, te pokazuje neznatna higroskopna svojstva. Karamelizira ako se zagrijava duže vrijeme pri temperaturama bliskim vrelištu. Granulirani pripravci imaju tendenciju stvrdnjavanja pa se moraju upotrijebiti unutar 9 do 12 mjeseci. Vodene otopine ksilitola mogu se skladištiti nešto dulje (Rowe i sur., 2009). Navedena kemijska i fizikalna svojstva sažeto su prikazana Tablicom 1.

Tablica 1. Kemijska i fizikalna svojstva ksilitola (Ur-Rehman i sur., 2013)

Formula	C ₅ H ₁₂ O ₅
M_r	152,15
Izgled	bijeli, kristalični prah
Miris	nema
Topljivost pri 20°C	169 g/100 g H ₂ O
pH vrijednost vodene otopine	5-7
Talište	93 °C
Vrelište	216 °C
Gustoća	1,5 g/L
Kalorijska vrijednost	2,4 kcal/g
Relativna slatkoća	Veća od sorbitola i manitola, jednaka slatkoći saharoze

Otapanje ksilitola je endotermna reakcija te zbog toga dolazi do osjećaja hlađenja prilikom oralnog konzumiranja. Osim toga, ksilitol sprečava zubni karijes te akutne upale srednjeg uha kod male djece. Zbog ovih svojstava i pozitivnih zdravstvenih učinaka ksilitol se sve više koristi zaslađivač korišten u pastama za zube, žvakaćim gumama, slatkišima i mint bombonima (Granström i sur., 2007).

Sposobnost stvaranja kompleksa s ionima kalcija, hidrofilnost i jačanje hidrofobnih interakcija među proteinima samo su još neka od značajnih svojstava ksilitola (Mäkinen, 2014).

2.3. Proizvodnja i tržište

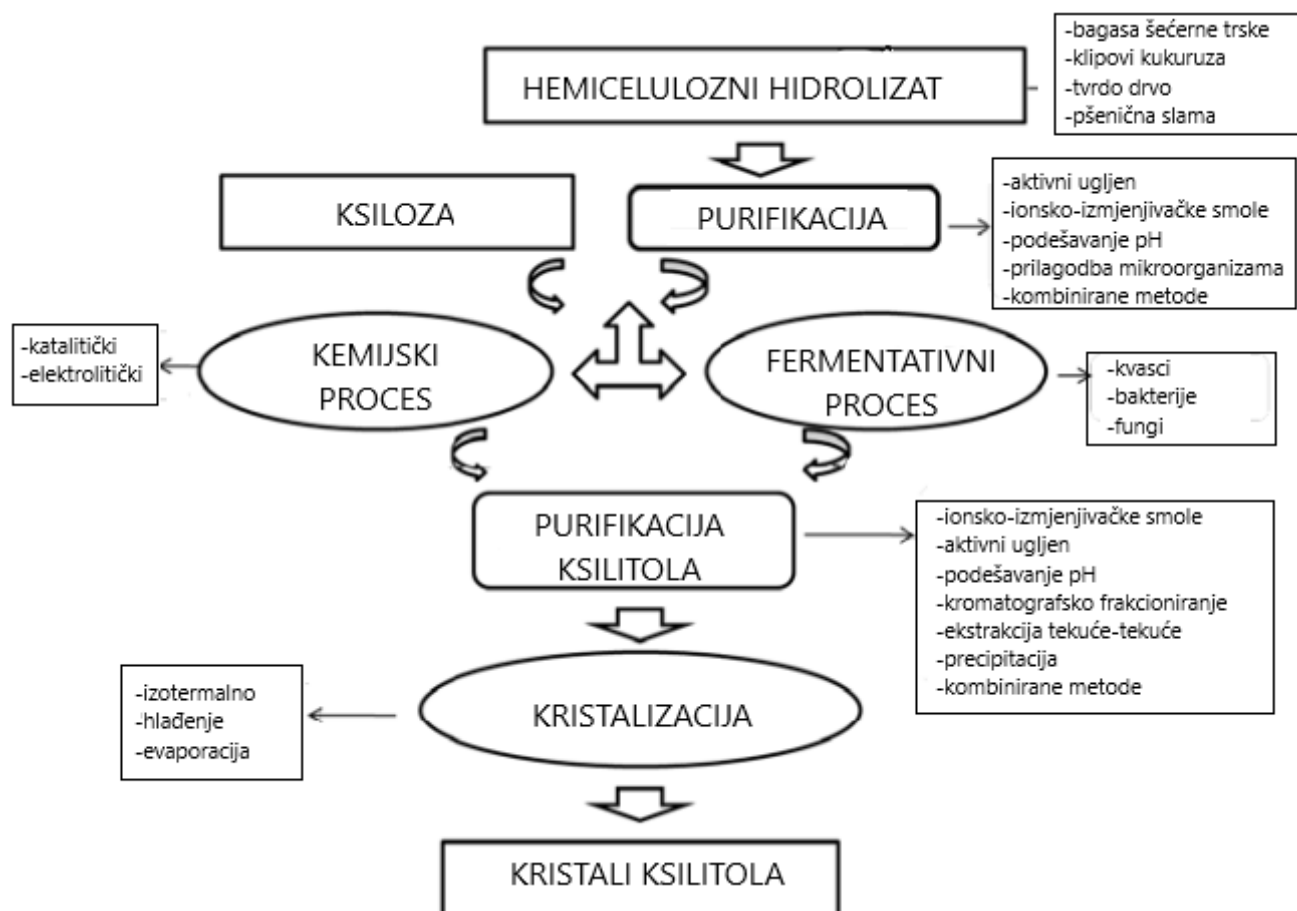
Industrijska proizvodnja ksilitola provodi se kemijskom hidrogenacijom D-ksiloze u ksilitol pomoću metalnog katalizatora. Sredinom 20. stoljeća raste zanimanje za proizvodnju ksilitola kao zaslađivača za dijabetičare. Zbog visoke cijene D-ksiloze, u prvobitnim istraživanjima proizvodnje ksilitola kao supstrat je korištena D-glukoza. Razvojem kromatografskih metoda separacije različitih hemiceluloznih šećera omogućena je proizvodnja veće količine čiste D-ksiloze. To je omogućilo razvoj metode kojom se pri visokom tlaku vodika D-ksiloza reducira do ksilitola pomoću metalnog katalizatora. Supstrat se dobiva iz drvnih hidrolizata, no potrebno je provesti nekoliko postupaka pročišćavanja kako bi se dobila čista ksiloza potrebna za provedbu kemijske redukcije. Ovakvim postupkom moguće je dobiti prinos ksilitola od 50-60% od ukupnog udjela ksilana u hemiceluloznoj sirovini (Granström i sur., 2007).

Dobiveni ksilitol potrebno je izdvojiti i pročistiti korištenjem tehnika poput membranske separacije, kromatografskih metoda, ekstrakcije tekuće-tekuće, primjenom aktivnog ugljena, kristalizacije i kombinacije različitih metoda. Kristalizacija je široko rasprostranjena metoda izolacije kemijski proizvedenog ksilitola budući da zahtijeva manje energije, a omogućuje dobivanje čistog proizvoda u jednom koraku. Otopljeni ksilitol može se kristalizirati metodama kao što su evaporacija otapala, hlađenje, taloženje ili isoljavanje. Izbor same metode ovisi o topljivosti, zasićenosti i temperaturi (Martínez i sur., 2015). Proces proizvodnje i nabrojane tehnike purifikacije shematski su prikazane na Slici 2.

Komercijalna proizvodnja ksilitola temelji se na redukciji ksiloze uz nikal kao katalizator te je energetski i ekonomski zahtjevna. Stoga se pokušava orijentirati prema biotehnološkim procesima i upotrebi mikroorganizama od kojih značajniju ulogu imaju kvasci roda *Candida*.

Jedna finska kompanija pokrenula je proizvodnju ksilitola 1960-tih godina, a ubrzo nakon toga počinje i značajan porast njegovog tržišta (Ravella i sur., 2012).

Ur-Rehman i sur. (2013) navode da se podatke za svjetsko tržište ksilitola prema kojima se tada proizvodilo 20 000 - 40 000 tona ksilitola godišnje, čime je postignuta ukupna cijena od 90 do 340 milijuna dolara. Ravella i sur. (2012) navode podatke za vrijednost ksilitola od 537 milijuna dolara na globalnoj razini za 2012. godinu, što se razlikuje od prethodno navedenih ukupnih cijena. Također navode svoja predviđanja o porastu vrijednosti ksilitola na globalnoj razini. Navode tadašnju cijenu ksilitola od 4 - 5 \$/kg što je bilo nešto jeftinije nego u prethodnih 10 godina zbog ekonomski povoljnijeg procesa proizvodnje.



Slika 2. Shematski prikaz procesa u proizvodnji ksilitola korištenjem kemijskih ili biotehnoških tehnika (Martínez i sur., 2015)

Prema Ravella i sur. (2012), u Aziji se proizvodi 50% svjetskog ksilitola, a ostatak otpada na Europu, SAD i Australiju. Ksilitol se najviše primjenjuje u proizvodnji žvakaćih guma i konditorskih proizvoda što obuhvaća oko 70% svjetske konzumacije ksilitola. Najveći svjetski proizvođači i distributeri ksilitola su SAD i Kina. Tvrtka *DuPont Danisco*, vodeći proizvođač, upotrebljava ksilozu iz papira i pulpe biljaka, a za proizvodnju koristi kemijsku katalizu. Ostali proizvođači poput *Thomson Biotech (Xiamen) Co.* ili *ZuChem Inc.* također su zbog ekonomičnosti počeli primjenjivati kombinaciju kemijskih postupaka i mikrobne procese. Osim primjene u prehrani, ksilitol se može koristiti kao bazna kemikalija za proizvodnju spojeva poput glikola, 1,2-propandiola, hidroksifurana te kao jeftina zamjena za petrokemikalije (Jain i Ghosh, 2021). Tablica 2. sažeto prikazuje najznačajnije proizvođače na području Kine i SAD-a, njihove godišnje proizvodnje te korištene sirovine. *DuPont Danisco* jedini ne koristi kukuruzne oklaske kao sirovinu.

Tablica 2. Najveći svjetski proizvođači ksilitola (Ravella i sur., 2012)

Kompanija	Proizvodnja (tona /godina)	Izvor sirovine
Futaste Pharmaceutical Ltd., China	35 000	oklasci kukuruza
Zhejiang Huakang Enterprise Co., Ltd. China	20 000	oklasci kukuruza
Yucheng Lujian Biological Technology Co., Ltd. China	16 000	oklasci kukuruza
Hangzhou Shouxing Biotechnology Co., Ltd. China	15 000	oklasci kukuruza
Shijiazhuang Acid Chemical Co., Ltd	10 000	oklasci kukuruza
Thomson Biotech (Xiamen) Pte. Ltd. China	10 000	oklasci kukuruza
Shandong Biobridge Technology Co., Ltd. China	6000	oklasci kukuruza
Jining Hengda Green Engineering Co., Ltd. China	5000	oklasci kukuruza
DuPont (Danisco) USA	2000	otpad od proizvodnje papira

Na tržištu Republike Hrvatske, moguće je pronaći ksilitol za prehrambene potrebe različitih distributera (Tablica 3), kao npr. *Kernnel*, *Rabb Vitalfood*, *Ekozona*, *GreenLab*, *Nature's finest* i *Nutrigold*.

Tablica 3. Distributeri ksilitola i njihove cijene na tržištu.

Distributeri	Cijena [kn /kg]
<i>Nutrimedica doo.</i>	79,90
<i>Balancefood</i>	57,75
<i>Gymbeam</i>	79,00
<i>Soulfood</i>	89,90
<i>GreenLab</i>	142,57
<i>Nutrigold</i>	90
<i>Kernnel</i>	154



Slika 3. Ksilitol dostupan na domaćem tržištu (Anonymous 2, 2022)

2.4. Metode proizvodnje ksilitola

Kemijski procesi proizvodnje ksilitola su ekonomski i energetska zahtjevni te je potrebno provesti više koraka pročišćavanja, no i dalje postoje veliki gubitci proizvoda. Alternativu konvencionalnim kemijskim metodama predstavljaju biotehnoške metode koje se mogu provoditi pri blažim uvjetima. Proizvodnja se može bazirati na lignoceluloznim hidrolizatima, a konverzija može provesti pomoću mikroorganizama ili enzima. Biotehnoške metode mogu smanjiti troškove proizvodnje ksilitola jer koriste manje energije i izdvajanje produkta iz hranjive podloge se provodi u samo jednom koraku. Hemicelulozni hidrolizat prije fermentacije potrebno je detoksicirati, no budući da mikroorganizmi koriste anorganske tvari i organske kiseline kao nutrijente, pročišćavanje je zapravo jeftinije i lakše nego kod kemijskih metoda (Jain i Ghosh, 2021).

Ukoliko pri kemijskim postupcima proizvodnje u hidrolizatu ima i drugih šećera pored ksiloze, onda to negativno utječe na prinos ksilitola. U biotehnoškim procesima ovaj efekt je manje izražen. Kod kemijskih metoda potrebno je provesti detoksikaciju kako bi se dobili čisti kristali ksiloze prije konverzije u ksilitol, a za biotehnoški proces detoksikacija je potrebna kako bi se iz hidrolizata uklonili inhibitori.

Razlike između kemijskog i biotehnoškog postupka postoje i u uvjetima vođenja procesa. Kemijski postupak zahtijeva visoke temperature i tlakove (80-140°C, 50 atm) te primjenu skupog katalizatora. Nasuprot tome, biotehnoški procesi se mogu provoditi pri manjim temperaturama (25-35°C), a kao mogući radni mikroorganizmi istražuju se kvasci, bakterije i plijesni. Velik utrošak energije, negativan utjecaj na okoliš, potreba za kristalizacijom prvo

ksiloze kao sirovine, a potom proizvedenog ksilitola kao i kompleksna i spora separacija ksilitola od drugih šećera samo su neke negativne strane kemijske proizvodnje. Biotehnoški procesi su održivi jer zahtijevaju manje energije i manje nepovoljno utječu na okoliš. Također je u njima potreban je samo jedan korak kristalizacije jer se kristalizira samo proizvod, a izdvajanje ksilitola se provodi brže i lakše nego kod kemijske metode. Kromatografske metode za separaciju ksiloze i ksilitola nije prikladne u kombinaciji s kemijskim metodama, ali bi se mogle uspješno primijeniti za izdvajanje ksilitola proizvedenog biotehnoškim putem (Hou-Rui, 2012; Dasgupta i sur., 2017; Jain i Gosh, 2021).

2.5. Primjena ksilitola i sigurnost njegove primjene

Ksilitol se primjenjuje u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Značajna svojstva ksilitola (poput niske energetske vrijednosti, antikariogenosti, prevencije infekcija uha i respiratornog sustava) povezana s njegovim utjecajem, razlog su sve većeg zanimanja za ovaj poliol (Azizah, 2019).

U prehrambenoj industriji ksilitol se koristi kako bi se produžio rok trajanja nekih proizvoda te očuvali boja i okus željenog proizvoda. Ksilitol ne podliježe Maillardovim reakcijama pa ne potamnjuje i ne smanjuju se nutritivne vrijednosti proteina. Može se dodavati u konditorske proizvode za djecu i odrasle, samostalno ili u kombinaciji s drugim šećernim zamjenama (Ur-Rehman i sur., 2013). Zbog svih navedenih karakteristika najviše se koristi u prehrambenoj industriji u proizvodnji različite hrane i konditorskih proizvoda kao što su kruh bez šećera, keksi, čokolada i gume za žvakanje (Azizah, 2019). Najznačajnija primjena ksilitola je u žvakaćim gumama bez šećera (engl. sugar free) jer daje slatkoću i efekt hlađenja. Također, koristi se i za premazivanje peletnih formi žvakaćih guma zbog svog brzog sušenja i kristalizacije. Proizvođači najčešće dodaju samo ksilitol ali može ga se i kombinirati s drugim zaslađivačima kako bi se osigurala zadovoljavajuća slatkoća, trajnost i teksturu proizvoda (Ur-Rehman i sur., 2013). Osim upotrebe pri kuhanju i pečenju, kristali ksilitola se mogu posipati po voću i proizvodima dobivenim iz žitarica ili umiješati u preljeve za salatu (Mussatto, 2012). Također se mogu koristiti kao sastojak džemova, pudinga, sladoleda, gaziranih pića i raznih drugih proizvoda. Dodatak ksilitola smrznutim desertima i jogurtima poboljšava teksturu, boju, okus i stabilnost ovih proizvoda. Može djelovati kao antioksidans, stabilizator i krioprotektor. U proizvodnji torti i pečenih proizvoda ksilitol se koristi zbog vezanje vlage i pozitivnog učinka na teksturu i trajnost. Primjena ksilitola u prehrambenim proizvodima je dozvoljena i odobrena od nadležnih međunarodnih agencija. Ljudski organizam dobro podnosi konzumaciju ksilitola

čija je dozvoljena maksimalni dnevni unos čak 60 g. Veće količine mogu imati privremene negativne gastrointestinalne učinke poput nadutosti i dijareje. Upotreba ksilitola dozvoljena je u više od 50 svjetskih zemalja u obliku sladila te kao sastavni dio lijekova i kozmetike (Mussatto, 2012).

U farmaceutskoj industriji ksilitol se primjenjuje kao zaslađivač ili pomoćna tvar u različitim pripravcima. Pogodan je za dijabetičare, antikariogenih je svojstava, ne fermentira, kemijski je inertan pa ne reagira s ostalim sastojcima i ne podliježe Maillardovim reakcijama. Sirupi, tonici i vitaminski pripravci koji sadrže ksilitol ne mogu fermentirati niti u njima dolazi do porasta plijesni (Ur-Rehman i sur., 2013).

Antikariogenost, sposobnost zadržavanja vlage i djelovanje na smanjenje nastajanja zubnog plaka značajna su svojstva ksilitola zbog kojih se on može primjenjivati u dentalnim proizvodima. Odgovoran je i za povećanu mineralizaciju zubnog tkiva jer utječe na protok sline obogaćene fosfatima i kalcijem. Osim toga, smanjuje formiranje oralnog biofilma inhibiranjem bakterijskih β -glukozidaza u ljudskoj slini. Zato ksilitol pronalazi primjenu u zubnim pastama, vodicama za ispiranje usta i umjetnoj slini (Gasmi Benahmed i sur., 2020).

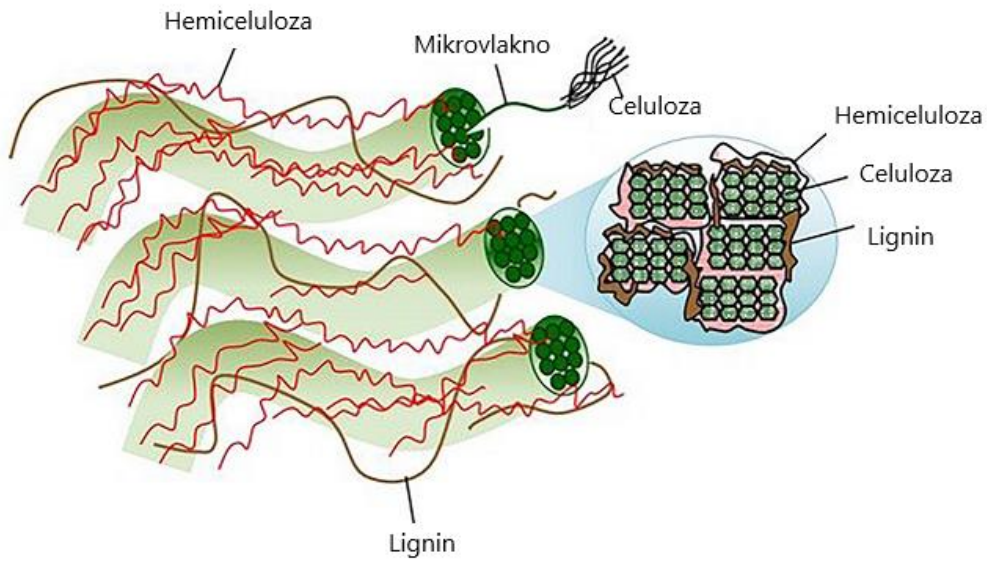
Ksilitol može štetno djelovati na životinje, posebice na pse. Konzumacija 0,1g ksilitola/kg tjelesne mase kod pasa može izazvati po život opasnu hipoglikemiju (preniska razina šećera u krvi). Hipoglikemija može uzrokovati gubitak koordinacije, depresiju, nesvjesticu i napadaje u već samo 30 min. Unos velike koncentracije ksilitola može uzrokovati akutno otkazivanje jetre (Dunayer i Murphy, 2018).

3. Mogućnosti biotehnoške proizvodnje ksilitola

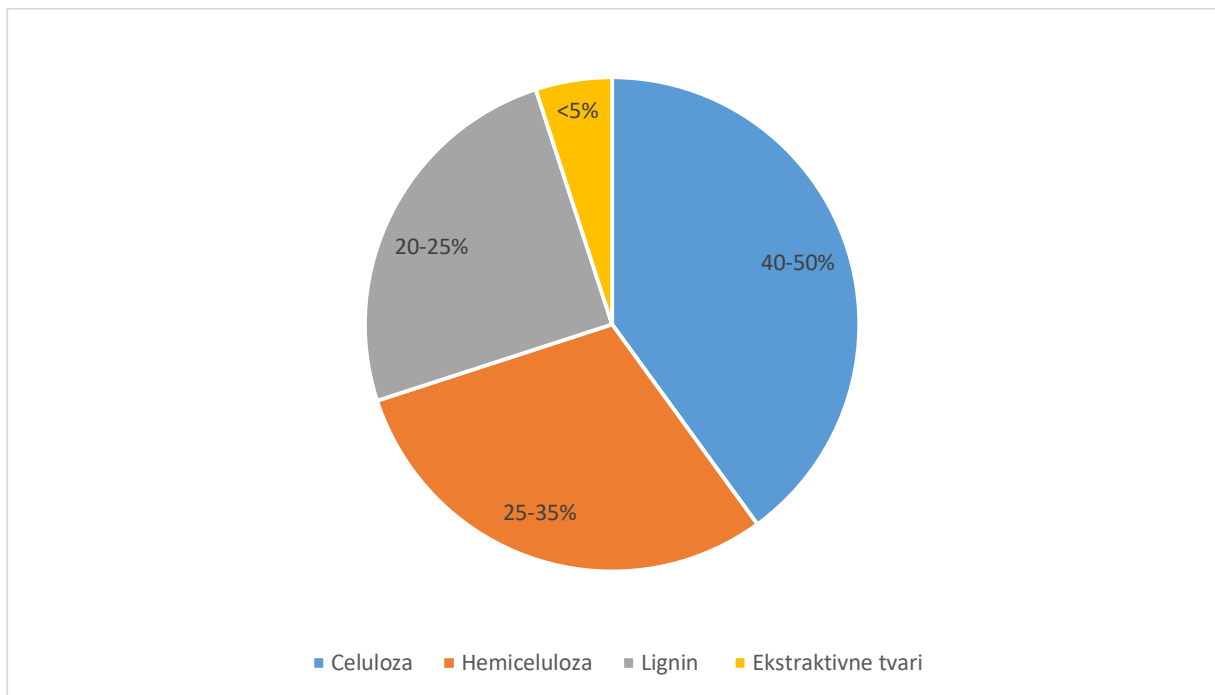
3.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine su široko rasprostranjeni, obnovljivi, dostupni i ekonomski isplativi izvori ugljika koji se koriste u proizvodnji ksilitola. Najznačajnije sirovine su poljoprivredni, agroindustrijski i drveni ostaci (Ur-Rehman i sur., 2013). Lignocelulozni materijali sastoje se od 3 strukturalna polimera (celuloze, hemiceluloze i lignina) te manje količine pektina, škroba i proteina te ekstraktivnih tvari. Navedeni strukturalni polimeri odgovorni su za oblik stanica te fizikalna i kemijska svojstva lignoceluloznih sirovina (Bogel-Lukasik i sur., 2012) a sastav lignoceluloze razlikuje se ovisno o biljnoj vrsti, starosti i uvjetima rasta (Ur-Rehman i sur., 2013). Stanična stijenka biljaka izgrađena je na način da je celulozna osnova okružena molekulama hemiceluloze u obliku uzastopnih struktura nalik mašnjama a prazan prostor

između hemicelulze zauzima lignin (Bogel-Lukasik i sur., 2012). Na Slici 4. prikazana je struktura lignoceluloze, a na Slici 5. udio glavnih građevnih komponenti .



Slika 4. Struktura stanične stijenke biljke i poprečni presjek mikrofibriila, celulozne molekule ugrađene u matricu hemiceluloze i lignina (Espinoza-Acosta, 2020)



Slika 5. Prosječni sastav lignoceluloze (Jakeer, 2018)

Tablica 4. Kemijski sastav raznih lignoceluloznih materijala (Palonen, 2004)

Materijal	Celuloza [%]	Ksilan [%]	Manan [%]	Galaktan [%]	Arabinan [%]	Lignin [%]	Ekstraktivne tvari [%]
smreka (lat. <i>Picea abies</i>)	41,6	6,1	14,3	nije navedeno	1,2	27,1	9,6
bor (lat. <i>Pinus silvestris</i>)	37,7	4,6	7,0	nije navedeno	nije navedeno	27,5	10,8
breza (lat. <i>Betula pendula</i>)	38,2	18,5	1,2	nije navedeno	nije navedeno	22,8	4,8
topola (lat. <i>Populus alba</i>)	49,9	17,4	47	1,2	1,8	18,1	nije navedeno
kukuruzovi na (engl. corn stover)	36,4	18,0	0,6	1,0	3,0	16,6	7,3
slama pšenice (engl. wheat straw)	38,2	21,2	0,3	0,7	2,5	23,4	13,0
trave (engl. grasses)	31,0	20,4	0,3	0,9	2,8	17,6	17,0

Hemiceluloza je heterogeni polimer koji se sastoji od pentoza (ksiloza, arabinoza), heksoza (manoza, glukoza i galaktoza) i šećernih kiselina. Primjeri kemijskog sastava nekih lignoceluloznih materijala navedeni su u Tablici 4. Različite vrste biljne biomase poput poljoprivrednog otpada od proizvodnje kukuruza, bagase šećerne trske, pivskog tropa, obrezanih maslinovih grana, eukaliptusa, rižine slame, kore od banane, sojinih ovojnica, zobene pljeve i ljusaka kave mogu se iskoristi kao sirovina u biotehnoškim procesima (Ur-Rehman, 2015).

Kako bi se mogle koristiti u proizvodnji biogoriva i visoko vrijednih kemikalija, lignocelulozne sirovine je prethodno potrebno obraditi odgovarajućim metodama. Predtretman sirovine je jedan od najvažnijih koraka prilikom frakcioniranja. Odabir metode predtretmana ovisi o cijeni, mogućnosti očuvanja hemicelulozne frakcije te količini inhibitora koji se dobiju na kraju predtretmana. Najčešći inhibitori fermentacije prisutni u hidrolizatu su kemijski spojevi poput fenolnih spojeva i alifatskih kiselina, furalaldehida i slabih kiselina (Jain i Ghosh, 2021).

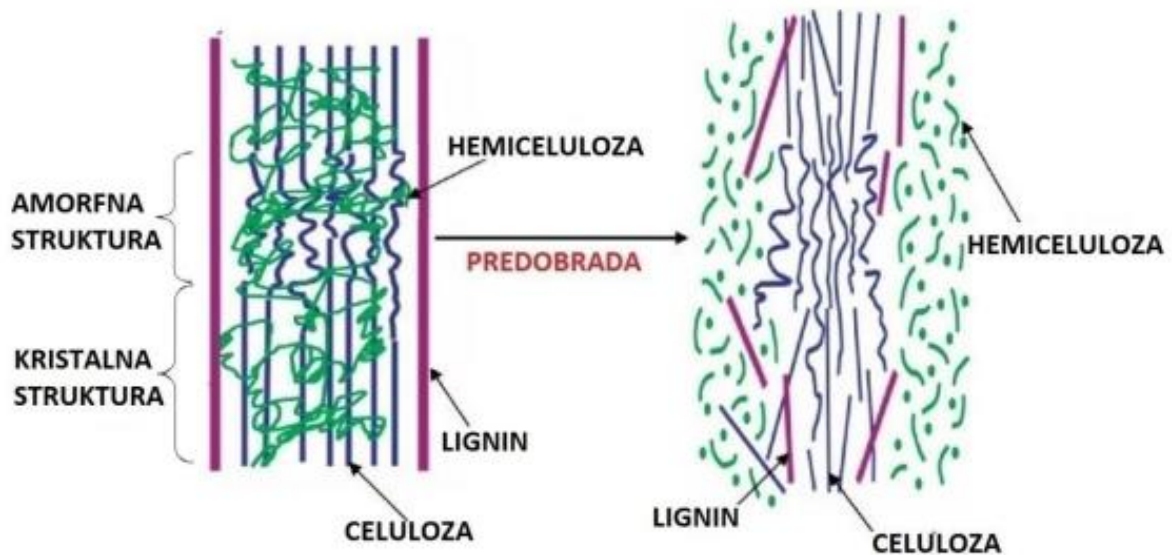
Kiselinska hidroliza je jedna od najpopularnijih metoda predtretmana. Brza je i jednostavna, a može koristiti razrijeđenu ili koncentriranu kiselinu. Načelno se preferira korištenje razrijeđene kiselinske hidrolize zbog manje cijene i efikasnosti razaranja lignoceluloznog matriksa (Jain i Ghosh, 2021). Najčešće se koristi sumporna kiselina, no primjenjuju se i klorovodična, dušična i trifluorocetna kiselina. Također, moguće je korištenje fosforne, octene, jantarne i limunske kiseline. Koncentrirane kiseline hidroliziraju i hemicelulozu i celulozu, pri čemu se ovakvi procesi mogu provoditi pri nižim temperaturama što smanjuje troškove proizvodnje. Međutim, ono što je nedostatak ovakvog pristupa jest korozija opreme. Proces koji koristi razrijeđene kiseline djeluju specifično na hemicelulozu, dok celuloza ostaje nehidrolizirana u čvrstoj frakciji. Prednosti ove metode su manji problemi s korozijom u odnosu na koncentrirane kiseline, manja potrošnja kiselina i manje potrebne energije za recikliranje kiseline. Prije fermentacije potrebno je ukloniti ili neutralizirati korištenu kiselinu što dovodi do gubitka dijela hidrolizata (Bogel-Lukasik i sur., 2012).

Ekonomski i ekološki atraktivna metoda predtretmana, koja ne koristi kemijske katalizatore, naziva se hidrotermalni tretman. Dvije varijante ove metode su autohidroliza i tretman parnom eksplozijom. Autohidroliza koristi vruću vodu (150-230 °C) pri visokom tlaku za degradaciju lignoceluloznih sirovina. Nedostatci ove metode su gubitak dijela ksilana i moguća tvorba inhibitora (Jain i Ghosh, 2021).

Dodatakom anorganskih soli može se povećati brzina hidrolize hemiceluloze i celuloze tijekom hidrolize razrijeđenim kiselinama. Najznačajnije soli su FeCl_3 , FeSO_4 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, AlCl_3 i MgSO_4 (Bogel-Lukasik i sur., 2012).

Tretmani lužinom su metoda koja djeluje na hemicelulozu i lignin. Ovisno o katalizatoru podijeljeni su na tretmane koji koriste natrijev, kalijev ili kalcijev hidroksid i tretmane koji koriste amonijak. Glavni učinak ovakvih tretmana nije izdvajanje hemiceluloze već povećanje razgradivosti celuloze. Dobiveni hidrolizati bogati su glukozom, dok je ksiloza prisutna u manjim koncentracijama što ovakve predtretmane čini nepovoljnima za proizvodnju ksilitola. Veliki utrošci lužine i vode za ispiranje, te gubitci lignoceluloznog materijala najznačajniji su

nedostatci ove metode. Osim opisanih metoda u literaturi se spominju i tretmani ionskim tekućinama (engl. ionic liquids), superkričnim fluidima (engl. supercritical fluid), vlažnom oksidacijom, organosolv i enzimaska hidroliza. Ove tretmane moguće je koristiti za obradu lignoceluloznih sirovina no neki do njih su komplicirani, skupi ili neisplativi u procesima proizvodnje ksilitola (Bogel-Lukasik i sur., 2012). Slika 6. prikazuje izgled lignoceluloze prije predtretmana te razaranje strukturne nakon obrade.



Slika 6. Struktura lignoceluloze prije i nakon obrade (Kumar i sur., 2009)

3.2. Radni mikroorganizmi i metabolički putevi biosinteze ksilitola

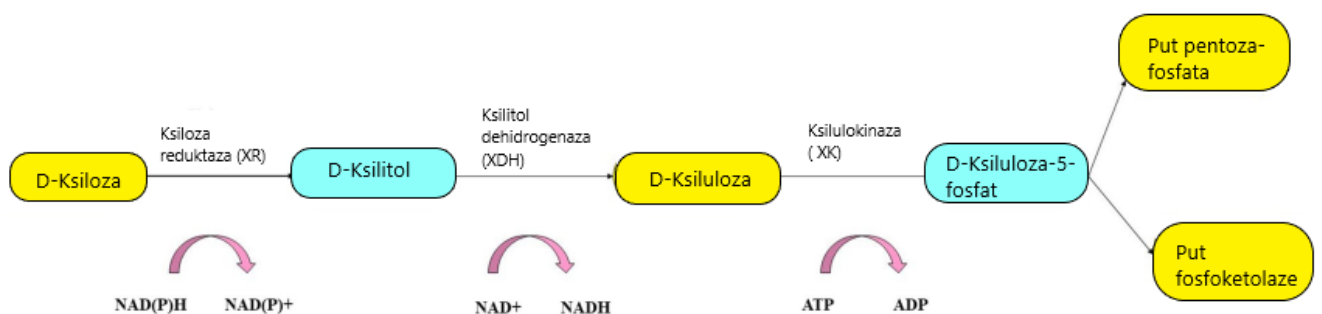
Biotehnološki postupci zahtijevaju prisutnost mikroorganizama koji mogu prevesti ksilozu do ksilitola. U proteklih dvadeset godina istraživani su kvasci, bakterije i plijesni koji imaju tu sposobnost (Tablica 5). Smatra se da su kvasci bolji proizvođači ksilitola, a među njima se ističu vrste *Candida guilliermondii*, *Debaromyces hansenii*, *Candida tropicalis* i *Candida boidinii*. Ksiloza se može konvertirati i pomoću rekombinantnih mikroorganizama kao što su *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* i *Saccharomyces cerevisiae* (Goli i sur., 2012).

Tablica 5. Mikroorganizmi istraživani za proizvodnju ksilitola (Goli i sur., 2012)

Kvasci	Plijesni	Bakterije
<i>Petromyces albertensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Candida boidinii</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>C. maltosa</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>smegmatis</i>
<i>C. mogii</i>	<i>P. expansum</i>	<i>Enterobacter liquifaciens</i>
<i>C. tropicalis HXP2</i>	<i>P. purpurogenum</i>	
<i>Debaromyces hansenii UFV-170</i>	<i>P. janthinellum</i>	
<i>Hansenula polymorpha</i>	<i>P. chrysogenum</i>	
<i>Pachysolen tannophilus</i>	<i>P. crustosum</i>	
<i>Pichia caribica</i>	<i>P. griseoroseum</i>	
<i>C. guilliermondii FTI-20037118</i>	<i>P. roqueforti</i>	
<i>C. intermedia</i>	<i>P. italicum</i>	

Neke bakterije poput *Enterobacter liquefaciens*, *Corynebacterium sp.*, *Mycobacterium smegmatis* i *Gluconobacter oxydans* mogu proizvesti ksilitol u manjim količinama dok sojevi roda *Enterobacter* mogu rasti na D-ksilozi i proizvesti ekstracelularni ksilitol. Bakterija roda *Corynebacterium* mogu proizvoditi ksilitol samo kada rastu na podlogama koje sadrže i ksilozu i glukonat. Unatoč mogućnosti konverzije, nastaju vrlo male količine ksilitola pa divlji sojevi bakterija nemaju praktičnu primjenu. Filamentozne plijesni poput *Aspergillus*, *Byssoschlamys*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Neurospora sp.* mogu proizvesti male količine ksilitola pri uzgoju na mediju koji sadrži ksilozu. Zbog malog prinosa i duljeg vremena inkubacije, plijesni nisu toliko istraživane za proizvodnju ksilitola (Rafiqul i Sakinah, 2012).

Konverzija D-ksiloze do D-ksiluloze u većini kvasaca i plijesni odvija se u dva koraka (Slika 7). Prvi korak je redukcija D-ksiloze do D-ksilitola pomoću NADPH ili NADH ovisne ksiloza reduktaze (XR). Nastali ksilitol može se izlučiti ili se dalje oksidira do D-ksiluloze pomoću NAD⁺ ovisne ksilitol dehidrogenaze. Neki sojevi kvasaca D-ksilulozu dalje mogu metabolizirati do ksiluloza-5-fosfata pomoću enzima ksilulokinaze, koja onda može ući u pentoza-fosfatni put. Alternativa je fosfoketolazni put kojim se ksiluloza-5-fosfat metabolizira do gliceraldehid-3-fosfata i acetil fosfata. Rast stanica ovisi o metaboličkim produktima dobivenima nakon ksilitola zbog čega se metabolički put ne zaustavlja već nakon nastanka ksilitola. Za dobivanje zadovoljavajućeg prinosa, koncentracije ksilitola koje nastaju i koje sudjeluju u daljnjim reakcijama moraju biti uravnotežene (Goli i sur., 2012).



Slika 7. Metabolički put ksiloze u kvascima (Jain i Ghosh, 2021)

Među sojevima kvasaca koji prirodno proizvode ksilitol izuzetno je zanimljiva *Candida sp.* Sposobnost korištenja D-ksiloze i održavanja redukcijско-oksidacijske ravnoteže prilikom nakupljanja ksilitola daje kvascima roda *Candida* prednosti u odnosu na *S.cerevisiae*. Zbog patogenosti nekih sojeva kvasaca iz roda *Candida*, njihova upotreba u prehrani je ograničena (Granström i sur., 2007). U određenom broju radova zabilježeni su veliki prinosi i produktivnosti postignuti primjenom ovih kvasaca. Kako bi povećali prinos, *Candida tropicalis* se može tretirati UV svjetlom što omogućava povećanje aktivnosti enzima ksiloza reduktaze i time povećava nastajanje ksilitola. Ako je soj mutant za ksilitol dehidrogenazu onda je moguće proizvesti ksilitol pomoću glicerola kao kosupstrata (Goli i sur., 2012).

Ksilitol se može proizvesti i pomoću rekombinantnih sojeva. Najviše je konstruirano rekombinantnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u koje su umetnuti geni za ksiloza reduktazu koji potječu iz kvasaca *Pichia stipitis* i *C. shehatae*. pri čemu ovakvi sojevi zahtijevaju prisutnost kosupstrata glukoze ili etanola. Ovi sojevi daju relativno visok prinos, no produktivnost samog procesa je znatno manja u odnosu na divlje tipove kvasca koji proizvode ksilitol (Rafiqul i Mimi Sakinah , 2012).

Izvor ugljika i dušika, pH vrijednost, temperatura, koncentracija supstrata i aeracija su važni parametri koji utječu na produktivnost bioprocasa. Koncentracija dostupnog kisika, odnosno aeracija, utječe na aktivnost enzima metabolizma ksiloze (ksiloza reduktaza), a time i na nakupljanje ksilitola (Azizah, 2019). Kvasci obično imaju širi raspon tolerancije za pH pa prema tome podnose raspone od pH 2.5 do 8, odnosno bolje rastu u kiselijim medijima, a većina kvasaca raste u temperaturnom rasponu 30 - 38 °C (Jain i Ghosh, 2021). Tamburini i suradnici (2015) istraživali su kvasac *Candida tropicalis* pri temperaturama 29 - 34°C. Zhang i suradnici 2014. godine koristili su rekombinantni soj *Kluyveromyces marxianus* koji daje visoki prinos ksilitola pri 42 °C. Temperatura utječe na rast mikroorganizama i proizvodnju ksilitola pošto aktivnost enzima vezanih uz transport i metabolizam ksilitola ovisi o temperaturi (Umai i sur., 2022).

3.3. Odabrani primjeri proizvodnje ksilitola na lignoceluloznim sirovinama

Postupci proizvodnje ksilitola međusobno se razlikuju obzirom na supstrat, uvjete fermentacije, parametre proizvodnje te radne mikroorganizme. Glavni koraci biotehnoške proizvodnje su: 1. predtretman lignocelulozne biomase; 2. koncentriranje hidrolizata hemiceluloze i detoksikacija; 3. biokonverzija ksiloze u ksilitol; 4. pročišćavanje ksilitola. Nakon što se predtretmanom odvoji hemiceluloza, potrebno je provesti detoksikaciju kako bi se smanjile koncentracije nešećernih spojeva koji mogu djelovati inhibicijski. Za ovaj korak može se koristiti adsorpcija na aktivni ugljen, nanofiltracija, enzimi, reverzna osmoza ili biopolimeri. Nakon odabira odgovarajućeg radnog mikroorganizma potrebno je uspostaviti uvjete kojima se dobiva najveći prinos ksilitola. Bitni parametri su pH vrijednost, temperatura, koncentracija supstrata i aeracija. Zadnji korak proizvodnje čini izolacija i purifikacija ksilitola iz prevrele hranjive podloge i ovaj korak je ujedno najskuplji u cjelokupnoj proizvodnji. Radi većeg prinosa može se koristiti kombinacija različitih metoda pročišćavanja (Queiroz i sur., 2022).

U Tablici 6 prikazani su neki primjeri istraživanja proizvodnje ksilitola tijekom dužeg vremenskog perioda kako bi se mogle usporediti uspješnosti procesa. Neki od navedenih mikroorganizama više se ne istražuju jer su se drugi procesi pokazali uspješnijima.

Proces proizvodnje ksilitola, kojeg su proveli Alves i suradnici (1998), koristi bagasu šećerne trske koja sadrži 20 do 35 % hemiceluloze kao sirovinu. Predtretman je obavljen kiselinskom hidrolizom pomoću H₂SO₄ a dobiveni hidrolizat potom je filtriran i koncentriran. Detoksikacija je provedena promjenom pH sa CaO, potom dodatkom H₂SO₄ i aktivnog ugljena

te zatim uklanjanjem taloga putem vakuuma. Kao radni mikroorganizam korišten je kvasac *Candida guilliermondii*. Hidrolizat s početnom koncentracijom ksiloze 43-48 g/L korišten je uz dodatne nutrijente, a fermentacija je provedena u Erlenmeyer-ovim tikvicama pri 30 °C. Rezultati su pokazali da detosikacija hidrolizata aktivnim ugljenom povećava produktivnost na čak 0,52 g/Lh, dok je najveći prinos iznosio 0,79 g/g (Alves i sur., 1998).

Nadalje, provedeno je i istraživanje sa pulpom plodova palme uljarice (engl. oil palm empty fruit bunch) budući da samo 23 % ploda završava kao ulje dok ostatak postaje otpadna biomasa. Kresnowati i suradnici (2016) odlučili su iskoristiti ovu ksilozom bogatu biomasu kao sirovinu u proizvodnji ksilitola. Kao radni mikroorganizam korišten je kvasac *Debaryomyces hansenii* dok je sirovina predtretirana enzimskom hidrolizom. Fermentacija je provedena na tresilici pri temperaturi od 30 °C i semiaerobnim uvjetima. Početna koncentracija ksiloze bila je 2 g/L, a glukoze 1,4 g/L. Rezultati su pokazali da na rad ovog kvasca utječu početna koncentracija stanica i pH vrijednost. Kod pH 5 i početne koncentracije stanica $4 \cdot 10^7$ postignut je prinos od 0.059 g ksilitola/g ksiloze. Istraživanje je pokazalo da ovako pripremljena sirovina ne sadrži inhibitore kvasca te se može koristiti u proizvodnji ksilitola (Kresnowati i sur., 2016).

Bagasa šećerne trske ostaci su šećerne trske dobiveni nakon ekstrakcije soka. Velike količine ove biomase koriste se za proizvodnju energije, stočne hrane, papira, enzima i etanola. Santos i suradnici (2008) odlučili su iskoristiti ovaj bogat izvor ksiloze za proizvodnju ksilitola. Vlakna bagase šećerne trske iskorištena su kao materijal za imobilizaciju kvasca *Candida guilliermondii* s ciljem razvoja kontinuiranog ili uzastopnog procesa biokonverzije ksilitola. Bagasa šećerne trske nakon usitnjavanja pripremljena je nizom pranja, sušenja i alkalnog pranja. Nakon uzgoja kvasaca pripremljena je suspenzija visoke koncentracije stanica. Fermentacija je provedena na tresilici (30 °C / 24 sata). Masa simobiliziranih stanica određivana je gravimetrijski. Dobiven je prinos ksilitola od 0.65 g/g te iskorištenje od 70.8 %. Imobilizacija stanica pokazala se uspješnom, što sugerira moguće recikliranje stanica i činjenicu da se postupak može voditi kontinuirano (Santos i sur., 2008).

Značajnu sirovinu predstavlja i otpad od proizvodnje kukuruza koja uključuje stabljike, oklaske i komušinu. Rahayu i suradnici (2022) odlučili su iskoristiti oklaske kukuruza te kvasac *Candida sp.* za proizvodnju ksilitola. Kukuruzni oklasci su samljeveni, pomiješani sa H₂SO₄, zagrijani na 121 °C te potom ohlađeni na sobnu temperaturu. Hidrolizat je neutraliziran s NaOH, nakon čega je provedena adsorpcija na aktivnom ugljenu i filtracija. Kultura kvasaca *C.guilliermondii* i *C.tropicalis* pripremljena je na sladnom agaru. Inokulum je pomiješan s hidrolizatom a fermentacija je provedena na tresilici (30 °C / 5 dana), s time da je u jednu od tikvica dodana glukoza kao kosupstrat. Nešto niži prinosi u rangu od 4 do 13,48 % posljedica

su inhibicije konverzije ksiloze u ksilitol zbog nestabilnih uvjeta rasta kvasaca. Primijećeno je da prilikom fermentacije uz kosupstrat koncentracija ksilitola raste s vremenom trajanja procesa, dok koncentracija ksiloze raste do trećeg dana nakon čega se počinje smanjivati. U tikvicama bez dodane glukoze koncentracija ksiloze se neprestano smanjivala, no koncentracija ksilitola se ovdje nakon trećeg dana lagano počela smanjivati. Razlog smanjenja je sinteza enzima koji konvertiraju ksilitol. Prisutnost dodane glukoze povećava udio izvora ugljika što pozitivno djeluje na rast kvasca. Njen dodatak povećava iskorištenje ksiloze i u konačnici proizvodnju ksilitola. Na temelju dobivenih rezultata predložena je metoda proizvodnje ksilitola trodnevnom fermentacijom korištenjem kvasca *Candida tropicalis* sa glukozom kao kosupstratom (Rahayu i sur., 2022).

Lignocelulozna sirovina koja je prisutna u većim količinama diljem Sredozemlja je ekstrahirana komina maslina koja ostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja. Lopez-Linares i suradnici (2020) proveli su istraživanje proizvodnje ksilitola iz hidrolizata ekstrahirane komine maslina pomoću kvasca *C. boidinii*. Sirovina je tretirana razrijeđenom H₂SO₄ nakon čega je provedena vakuum-filtracija. Kako bi se smanjile koncentracije inhibitora, provedena je detoksikacija aktivnim ugljenom ili ionskom izmjenom. Prethodno uzgojeni inokulum kulture *Candida boidinii* centrifugiran je te resuspendiran u hranjivom mediju. Fermentacija je provedena na 30 °C a hidrolizat dobiven kiselom hidrolizom komine iskorištenih maslina sadržavao je čak 64 % ksiloze. Na kraju eksperimenta postignut je maksimalni prinos ksilitola od 4,3 g/g. Tijekom fermentacije na sintetičkim medijima najveća koncentracija ksilitola postignuta je nakon 48 sati uzgoja. Najveće koncentracije ksilitola i prinos od 0,58 g/g postignuti su kada glukoza nije bila prisutna što znači da glukoza ima negativan efekt na metabolizam ksilitola kod *C. boidinii*. Hidrolizat dobiven nakon detoksikacije ionskom izmjenom daje prinos od 0,43 g/g dok primjenom aktivnog ugljena prinos iznosi 0,36 g/g. U ovom slučaju ionska izmjena je efikasnija metoda detoksikacije jer uklanja više inhibicijskih supstanci, primjerice octenu kiselinu. Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da hidrolizati ekstrahirane komine maslina mogu biti prikladni mediji za proizvodnju ksilitola kvascem *C. boidinii* s time da je obavezno provesti detoksikaciju, a najboljom metodom pokazala se ionska izmjena dajući maksimalne prinose ksilitola nakon fermentacije od 0,43 g/g. Prisutnost glukoze pokazala se negativnom za proizvodnju ksilitola ovim kvascem (Lopez-Linares i sur., 2020).

Suarez Lizarazo i suradnici (2022) su također koristili bagasu šećerne trske kako bi proizveli ksilitol. Kao radni mikroorganizam primijenili su modificirani kvasac *S. cerevisiae*, transformiran genom koji kodira za ksiloza reduktazu. Predtretman bagase šećerne trske

sastojao se od eksplozije vodenom parom i enzimske hidrolize enzimskim kompleksom celulaza-hemicelulaza. Amonijev hidroksid korišten je za podešavanje pH vrijednosti podloge na 5 pH jedinica. Fermentacija nedetoksiciranog hidrolizata odvijala se pri aerobnim uvjetima na temperaturi od 30 °C. Ovim istraživanjem testirani su fermentacijski uvjeti poput povećanja koncentracije inokuluma i dodaci hranjivoj podlozi baziranoj na hidrolizatu nakon čega je primijenjen elektro-fermentacijski sistem kako bi se procijenio utjecaj električne struje na produkciju ksilitola. Određena je optimalna početna koncentracija inokuluma od 8 g/L koja omogućuje najbolju produktivnost. Napravljen je i test suplementacije hidrolizata peptonom i kvašćevim ekstraktom bez povećanja koncentracije inokuluma. Nakon 145 satne fermentacije vidljivo je povećanje prinosa ksilitola u odnosu na postupak proveden bez dodataka. Time je dokazano da suplementacija medija omogućuje bolju proizvodnju ksilitola u odnosu na fermentaciju provedenu samo povećanjem inokuluma. Obavljen je i test primjenjujući oba uvjeta. Dobiveni su znatno veći prinosi te produktivnost od 0,123 g/Lh. Također su istraživali mogućnost elektro-fermentacije kod koje se primijenilo povećanje koncentracije inokuluma, dodaci hidrolizata i 1 V električnog napona. U ovom slučaju zabilježen je nešto niži prinos ksilitola zbog aeracijskih uvjeta. Obzirom na kontrolnu fermentaciju bez utjecaja električne struje, vidljivo je povećanje od 54,8 % u proizvodnji ksilitola. Najveća produktivnost među svim postupcima zabilježena je prilikom kombinacije povećanja inokuluma i suplementacije hidrolizata. Zaključeno je da se poboljšanje proizvodnje ksilitola može postići primjenom povećanja inokuluma i dodatkom suplemenata. Elektro-fermentacija također pozitivno utječe na proizvodnju, no za bolje rezultate treba pripaziti na aeracijske uvjete (Suarez Lizarazo i sur., 2022).

Almeida e Silva i sur.(2004) odlučili su primijeniti eukaliptus kao lignoceluloznu sirovinu. Hidrolizat se može tretirati ionskom izmjenom ili kombinacijom adsorpcije na aktivni ugljen i podešavanjem pH s ciljem uklanjanja hihroksimetilfurfurala i octene kiseline. U istraživanju je korišten kvasac *Candida guilliermondii*. Dodatnom obradom hidrolizata s aktivnim ugljenom i podešavanjem pH vrijednosti, dobiven je prinos ksilitola od 0,4 g/g i produktivnost od 0,3 g/Lh. Prinos ksilitola od 0,66 g/L i produktivnost od 0,5 g/Lh dobivena je primjenom istog tretmana no pri više koncentriranom hidrolizatu. Nakon ionske izmjene dobiven je maksimalni prinos ksilitola od 0,76 g/g i produktivnost od 0,68 g/Lh. Ovo istraživanje pokazuje da se koncentriraniji hidrolizati eukaliptusa te primjena ionske izmjene efektivno mogu koristiti u proizvodnji ksilitola (Almeida e Silva i sur., 2004).

Rižina slama također se može koristiti kao sirovina u proizvodnji ksilitola. Mussatto i Roberto (2011) također su proveli fermentaciju hidrolizata rižine slame uz pomoć kvasca

Candida guilliermondii. Sirovina je osušena i samljevena, nakon čega je uslijedila hidroliza pomoću H₂SO₄ (0,1 mol/L) i vakuum koncentriranje. Hidrolizatu je dodatno podešena pH vrijednosti pomoću NaOH nakon čega je uslijedilo centrifugiranje i adsorpcija na aktivni ugljen kako bi se uklonili prisutni inhibitori. Fermentacija je provedena na treslici (30 °C / 96 sati). Maksimalan prinos od 0,72 g/g i produktivnost od 0,61 g/Lh postignuti su kad je omjer hidrolizata i aktivnog ugljena prilikom detoksikacije iznosio 40 g/g. Uočeno je da su manje količine aktivnog ugljena pokazale pozitivan utjecaj na biokonverziju. Adsorpcija na aktivni ugljen pokazala se dobrom metodom za uklanjanje inhibitora hidrolizata rižine slame (Mussatto i Roberto, 2001).

Na temelju podataka prikazanih u Tablici 6, koji sadrže pokazatelja učinkovitosti različitih bioprocasa za proizvodnju ksilitola vidljivo je da je *Candida sp.* najviše korišteni kvasac u istraživanjima. Primjenom kvasaca najbolji dobiveni prinosi ksilitola su 0,79 g/g kod bagase i 0,72 g/g kod rižine slame dok plijesni pokazuju znatno manje sposobnosti proizvodnje ksilitola. Rekombinantno dobivene bakterije poput *E.coli* i *Corynebacterium glutamicum* pokazuju najbolje rezultate sa maksimalnom produktivnošću od 1,4 g/Lh i 7,9 g/Lh.

Tablica 6. Primjeri istraživanja proizvodnje ksilitola biotehnološkim metodama na lignoceluloznim sirovinama

Radni mikroorganizam	Sirovina / Supstrat	Predtretman	Uvjeti fermentacije	Pokazatelji učinkovitosti	Referenca
<i>Candida boidinii</i>	Ekstrahirana komina maslina	Aktivni ugljen ili ionska izmjena	$V_k = 50$ mL 30 °C	$Y_{P/S} = 0,43$ g/g	Lopez-Linares i sur. (2020)
<i>Candida guilliermondii</i>	Bagasa šećerne trske	Kiselinska hidroliza, aktivni ugljen	tresilica aerobno 30 °C	$Y_{P/S} = 0,79$ g/g $Pr = 0,52$ g/Lh	Alves i sur. (1998)
<i>Candida guilliermondii.</i>	Rižina slama	Kiselinska hidroliza, aktivni ugljen	tresilica aerobno 30 °C	$Y_{P/S} = 0,72$ g/g $Pr = 0,61$ g/Lh	Mussatto i Roberto (2001)
<i>Candida guilliermondii</i>	Bagasa šećerne trske	Alkalna hidroliza	tresilica aerobno 30 °C	$Y_{P/S} = 0,65$ g/g	Santos i sur. (2008)
<i>Candida sp</i>	Oklasci kukuruza, kosupstrat glukoza	NaOH, aktivni ugljen	tresilica aerobno 30 °C	$Y_P = 0,049 - 0,088$ g/L	Rahayu i sur. (2022)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Pulpa plodova palme uljarice	Enzimaska hidroliza	$V_k = 500$ mL tresilica semiaerobno 30 °C	$Y_{P/S} = 0,59$ g/g	Kresnowati i sur. (2016)
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Bagasa šećerne trske	Eksplוזija parom, enzimaska hidroliza	$V_k = 50$ mL aerobno 30 °C	$Y_P = 19,24$ g/L $Pr = 0,123$ g/Lh	Suarez Lizarazo i sur. (2022)
Mutanti <i>Aspergillus niger</i>	D-ksiloza, ksilan bukve, pšenične mekinje	Nije navedeno	$V_k = 50$ mL tresilica aerobno 30 °C	$c = 2,4$ mmol/L $\gamma = 0,365$ g/L	Croumpi i sur. (2022)

Tablica 6. Primjeri istraživanja proizvodnje ksilitola biotehničkim metodama na lignoceluloznim sirovinama (nastavak)

Radni mikroorganizam	Sirovina / Supstrat	Predtretman	Uvjeti fermentacije	Pokazatelji učinkovitosti	Referenca
<i>Penicillium sp.</i>	D-ksiloza	Nije navedeno	$V_k = 10$ mL 30 °C	$Y_p = 0,14 - 0,52$ g/L $Pr = 0,006$ g/Lh	Chaves-Alves i sur. (2003)
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	D-ksiloza Kukuruzni sirup	Nije navedeno	$V_k = 100$ mL aerobno 30 °C	$Y_p = 33,3$ mg/mL	Imai i sur. (1973)
Mutanti bakterije <i>Corynebacterium glutamicum</i>	D-ksiloza	Nije navedeno	Šaržno uz limitaciju kisika	$S_0 = 30$ g/L $Y_p = 166$ g/L $Pr = 7,9$ g/Lh	Inui i sur. (2009)
Modificirana bakterija <i>Escherichia coli</i>	Hidrolizat kukuruznih oklasaka	Nije navedeno	$V_k = 50$ mL tresilica 30°	$Y_p = 20,5$ g/L $Pr = 0,85$ g/Lh	Su i sur. (2016)
			$V_U = 5$ L, $V_k = 3$ L Šaržno, bioreaktor	$Y_p = 150$ g/L $Pr = 1,4$ g/Lh	
			$V_U = 15$ L, $V_k = 8$ L Šaržno s pritokom supstrata, bioreaktor 30 °C	172,4 g/L ksilitola nakon 110 h, prosječna $Pr = 1,57$ g/Lh	

Y_p – prinos ksilitola [g/L]

$Y_{p/S}$ – koeficijent koverzije supstrata u produkt [g ksilitola/g supstrata]

Pr – produktivnost [g ksilitola/Lh]

V_k – korisni volumen

V_U – ukupni volumen

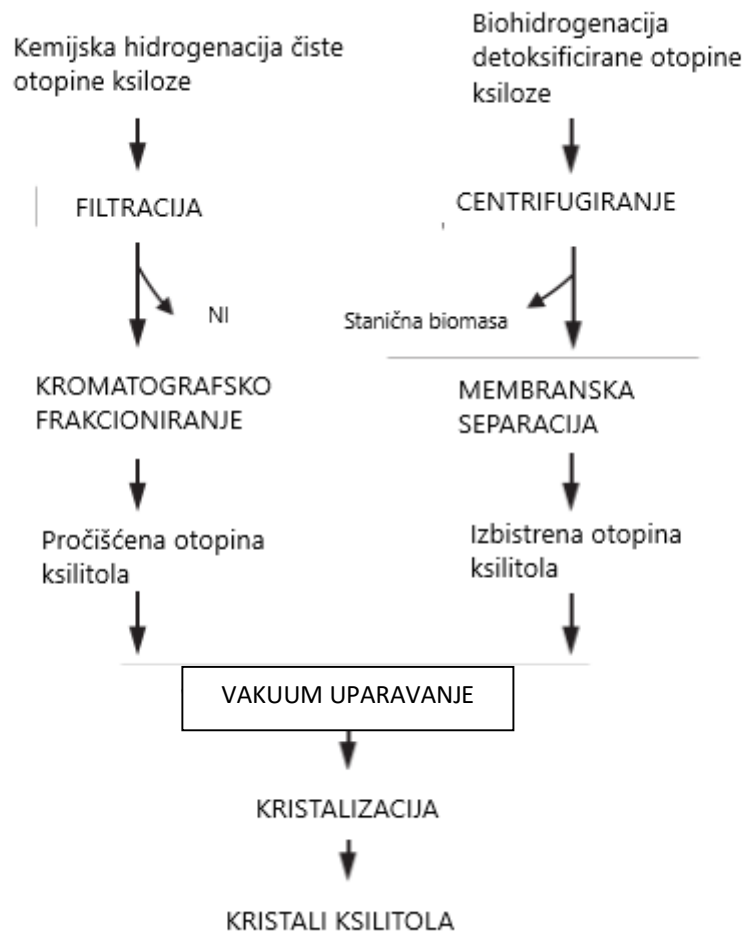
γ – masena koncentracija [g/L]

c – molarna koncentracija [mol/L]

3.4. Pročišćavanje i izolacija ksilitola

Fermentirana podloga pored ksilitola sadrži ostatke biomase, neiskorištene komponente hranjive podloge i nusprodukte fermentacijekoje je potrebno ukloniti. Tehnike korištene za izolaciju ksilitola ovise o željenoj kvaliteti proizvoda te sastavu fermentirane podloge. Kako bi se efikasno uklonila prisutna biomasa podloga se centrifugira ili filtrira te se provodi kristalizacija ksilitola. Također, za dodatno izdvajanje zaostalih stanica, proteina, ugljikohidrata i masti moguće je koristiti i ultracentrifugu pri čemu je potrebno paziti na moguće začepljenje membrane proteinima, što može dovesti do tehnoloških gubitaka (Salam i sur., 2022). Metode predobrade poput korištenja aktivnog ugljena, podešavanja pH vrijednosti, ionsko-izmjenjivačkih smola, membranske separacije, kromatografskih metoda, ekstrakcije tekuće-tekuće i taloženja pokazale su se uspješne za separaciju i izolaciju ksilitola (Martínez i sur., 2015). Na proces membranske separacije, koji se također može koristiti u postupku izdvajanja, mogu utjecati koncentracija otopine, temperatura, pH vrijednost i vrste nečistoća (Salam i sur., 2022).

Moguće je primijeniti i različite adsorbense koji služe za uklanjanje nečistoća koje se vežu na njihovu površinu. Najčešći adsorbens je aktivni ugljen. Nadalje, koncentriranje otopine ksilitola provodi se kako bi se postigla točka zasićenja i započeo sam proces kristalizacije, a ona se može postići uparavanjem otapala pri određenoj temperaturi i tlaku. U literaturi su opisana istraživanja vakuum-uparavanja pri različitim koncentracijama fermentirane hranjive podloge i temperaturama. Membranska destilacija temelji se na prolazu plinovitih tvari kroz pore membrane, a može poslužiti za uklanjanje octene kiseline i još nekih spojeva (Salam i sur., 2022). Slika 7. shematski prikazuje primjenu navedenih tehnika pročišćavanja ksilitola.



Slika 8. Pojednostavljeni prikaz pročišćavanja ksilitola (Rafqul i Mimi Sakinah, 2013)

4. Zaključci

1. Ksilitol je poliol visoke ekonomske vrijednosti koji ima najznačajniju ulogu kao sladilo za kojim postoji povećana potražnja.
2. Industrijski se ksilitol do sada proizvodio kemijskim postupkom koji je ekonomski i ekološki nepovoljan. Međutim kao alternativa se razvijaju biotehnološki postupci koji omogućavaju biokonverziju ksiloze u ksilitol primjenom mikroorganizama, pri čemu se koriste lignocelulozne sirovine.
3. Zbog kompleksne kemijske strukture, lignoceluloza se prije same fermentacije mora obraditi odgovarajućim metodama kako bi se iz nje dobili fermentabilni šećeri. U svrhu poboljšanja učinkovitosti i produktivnosti bioprocasa provedenog na dobivenom hidrolizatu, potrebno je ukloniti inhibitore koji nastaju tijekom predtretmana.
4. Prema dostupnoj literaturi, najčešće se za istraživanje proizvodnje ksilitola koriste kvasci roda *Candida* i modificirani kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Neki modificirani sojevi bakterija *Escherichiacoli* i *Corynebacterium glutamicum* također su pokazali zanimljive rezultate.
5. U svrhu daljne optimizacije i povećanja pokazatelja uspješnosti bioprocasa, potrebno je provesti dodatna istraživanja.

5. Literatura:

1. Almeida e Silva JB, Canilha L, Napoles Solenzal AI (2004) Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process Biochemistry*, 39, 1909 - 1912, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.009>
2. Alves LA, Felipe MGA, Almeida e Silva JB, Silva SS, Prata AMR (1998) Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. U: Finkelstein, M., Davison, B.H. (edit.) *Biotechnology for Fuels and Chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1814-2_9
3. Anonymous 1 (2022) Xylitol <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Xylitol#section=Structures>> Pristupljeno 12. kolovoza 2022.
4. Anonymous 2 (2022) Brezin šećer, ksilitol, <<https://www.365nature.hr/hr/wellness-shop/zacini-zasladvaci-i-hrana/zasladvaci/brezin-secer-ksilitol/>> Pristupljeno 18. kolovoza 2022.
5. Antunes FAF, Brumano LP, dos Santos JC, d.S. Milessi TS, Gaikward S, Peres GFD i sur. (2017) *Biotechnological production of xylitol from biomass*. U: Fang Z, Smith RL, Qi X (ured.) *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources*, 1.izd, Springer Singapore, str. 311-342
6. Azizah N (2019) Biotransformation of xylitol production from xylose of lignocellulose biomass using xylose reductase enzyme: Review. *Journal of Food and Life Sciences*, 3 (2), str. 103-112. <https://doi.org/10.21776/ub.jfls.2019.003.02.06>
7. Bogel – Lukasik R, Calvarheiro F, Duarte LC, Girio FM (2012) Deconstruction of the Hemicellulose Fraction from Lignocellulosic Materials into Simple Sugars. U: da Silva S, Kumar Chandel A (edit) *D-Xylitol*, 1.izd., Springer Berlin, Heidelberg, str. 3 - 37
8. Chaces – Alves VM, Coelho JLC, Coelho Sampaio F, da Silveira WB, Lopes Passos FM, (2003) Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34 (4). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400007>
9. Chroumpi T, de Vries RP, Makela MR, Meng J (2022) Xylitol production from plant biomass by *Aspergillus niger* through metabolic engineering. *Bioresource Technology*, 344, Part A, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126199>

10. Dasgupta D, Bandhu S, Adhikari DK, Ghosh D (2017) Challenges and prospects of xylitol production with whole cell biocatalysis: a review. *Microbiol Research*, 197, 9-21.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.012>
11. Dunayer EK, Murphy LA (2018) Xylitol toxicosis in dogs: An update, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48, 6, 985 – 990
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.06.004>
12. Espinoza-Acosta JL (2020) Biotechnological production of xylitol from agricultural waste. *Biotechnia*, 22, 126-134 <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v22i1.1160>. Pristupljeno: 17. kolovoza 2022.
13. Gasmi Benahmed A, Gasmi A, Arshad M, Shanaida M, Lysiuk R, Peana M, Pshyk-Titko I, Adamiv S, Shanaida Y, Bjørklund G (2020) Health benefits of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7225-7237. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10708-7> .
14. Goli JK, Panda SH, Linga VR (2012) Molecular mechanism of D-xylitol production in yeasts: Focus on molecular transportation, catabolic sensing and stress response. U: da Silva S., Kumar Chandel A. (ured.) *D-Xylitol*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 85-107.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_4
15. Granström TB, Izumori K, Leisola M (2007) A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2), str. 273-276. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0760-4>.
16. Hou-Rui Z (2012) Key drivers influencing the large scale production of xylitol. U: da Silva, S., Kumar Chandel A. (ured.) *D-Xylitol*, Springer, Berlin, Heidelberg str. 267-289.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_12.
17. Inui, M, Jojima T, Sasaki M, Yukawa H (2009) Xylitol production by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1057–1066. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2372-2>
18. Imai T, Ishizaki H, Shimamura M, Yoshitake J (1973) Xylitol production by an *Enterobacter* species. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(10), 2261–2267
<https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10861002>
19. Jain V, Ghosh S (2021) Biotransformation of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01904-0>
20. Jakeer S (2018) . U: Kumar S, Dheeran P, Taherzadeh M, Khana S (edit.) *Fungal Biorefineries*, 1. izd., Springer Cham, str. 107-120

21. Kresnowati MTAP, Setiadi T, Tantra TM, Rusdi D (2016) Microbial production of xylitol from oil palm empty fruit bunch hydrolysate: Effects of inoculum and pH. *Journal of Engineering and Technological Sciences*, 48(5), str. 523-533.
<https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2016.48.5.2>
22. Kumar P, Barrett, DM, Delwiche MJ, Stroeve P (2009a) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
23. López-Linares JC, Ruiz E, Romero I, Castro E, Manzanares P (2020) Xylitol production from exhausted olive pomace by *Candida boidinii*. *Applied Sciences*, 10(19).
<https://doi.org/10.3390/app10196966>
24. Mäkinen KK (2014) Authorised EU health claims for xylitol and sugar-free chewing gum (SFCG). *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims*, str. 46-72. Woodhead Publishing Series u Food Science, Technology and Nutrition.
<https://doi.org/10.1533/9780857098481.2.46>
25. Martínez EA, Canettieri EV, Bispo JAC, Giulietti M, de Almeida e Silva JB, Converti A (2015) Strategies for xylitol purification and crystallization: A Review, Separation Science and Technology. *Separation Science and Technology* 50 (14), str. 2087-2098.
<https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1009115>.
26. Mussatto SI (2012) Application of xylitol in food formulations and benefits for health. U: da Silva S., Kumar Chandel A. (edit.) *D-Xylitol*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 309-323. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_14.
27. Mussatto SI, Roberto IC (2001) Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters* 23, 1681–1684.
<https://doi.org/10.1023/A:1012492028646>
28. Palonen, H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT Technical Research Centre of Finland.
<https://publications.vtt.fi/pdf/publications/2004/P520.pdf>.
29. Queiroz SS, Jofre FM, Mussatto SI, Solange IF, Felipe MGA (2022) Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111789>
30. Rafiqul SM, Sakinah AMM (2013): Processes for the production of xylitol-A review. *Food Reviews International*, 29 (2) 127-156.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714434>

31. Ravella SR, Gallagher J, Fish S, and Prakasham RS (2012) Overview on commercial production of xylitol, economic analysis and market trends. U: da Silva S., Kumar Chandel A. (edit.) D-Xylitol. Springer, Berlin, Heidelberg https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_13
32. Rahayu E, Hidayah N, Adiandri S (2022) Production of xylitol from corn biomass using *Candida* sp. as microbial agent. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1024 . <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1024/1/012075>
33. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients 6. izd., Pharmaceutical Press, London, Engleska, str. 786-789
34. Salam WQ, Julian H, Kresnowati MTAP (2022) Fermentation based sugar-alcohol downstream processing: A Review. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 1034 <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1034/1/012059>
35. Santos DT, Sarrouha BF, Rivaldia JD, Convertib A, Silvaac AS (2008) Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *Journal of Food Engineering*, 86 (4), 542-548. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.004>
36. Su B, Lin, J, Wu M, Yang L, Zhang Z (2015) Efficient production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate using engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 31, 112–122. <https://doi.org/10.1038/srep26567>
37. Suarez Lizarazo FU, Guimarães Pereira GA, Bezerra de Mello FS (2022) Strategies for improved xylitol production in batch fermentation of sugarcane hydrolysate using *Saccharomyces cerevisiae*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.25.493426>
38. Tamburini E, Costa S, Marchetti MG, Pedrini P (2015) Optimized production of xylitol from xylose using a hyper-acidophilic *Candida tropicalis*. *Biomolecules*, 5(3), 1979–1989. <https://doi.org/10.3390/biom5031979>
39. Umai D, Kayalvizhi R, Kumar V, Jacob S (2022) Xylitol: Bioproduction and applications-A review. *Front. Sustain.* 3:826190 <https://doi.org/10.3389/frsus.2022.826190>
40. Ur-Rehman S, Mushtaq Z, Zahoor T, Jamil A, Murtaza MA (2015) Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1514 -1528. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.702288>
41. Zhang J, Zhang B, Wang D, Gao X, Hong J (2014) Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 152, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.109>

Izjava o izvornosti

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

Vuradin

Vlastoručni potpis