

Proizvodnja arabitola iz glicerola pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990

Vlahović, Toni

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:302590>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Toni Vlahović

**PROIZVODNJA ARABITOLA IZ GLICEROLA
POMOĆU KVASCA *Debaryomyces hansenii*
JCM 1990**

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

Diplomski rad izrađen je u okviru HRZZ projekta „Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina“ (Biorefinery-NFLRM; IP-2022-10-3075).

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Mariu Novaku na uloženom vremenu, pomoći, razumijevanju i iznimnoj susretljivosti tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala i dr. sc. Nenadu Marđetku na savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada. Također se želim zahvaliti i ostalim djelatnicima Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na ljubaznosti i ugodnoj atmosferi.

Želim zahvaliti svojoj obitelji na neizmjernom strpljenju, ljubavi i podršci tijekom dosadašnjeg školovanja.

Također se želim zahvaliti i Niki, koja mi je bila podrška na svakom koraku i s kojom sam dijelio najbolje i najgore trenutke tijekom fakultetskog obrazovanja. Hvala što si uvijek tu za mene.

Na kraju, htio bih se zahvaliti prijateljima i svima koji su me oblikovali u osobu kakva sam danas.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PROIZVODNJA ARABITOLA IZ GLICEROLA POMOĆU KVASCA *Debaryomyces hansenii* JCM 1990
Toni Vlahović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058214753

Sažetak: Zbog modernizacije, ljudi su uvijek u potrazi za novim obnovljivim izvorima energije. Glicerol, nusproizvod industrije biodizela, predstavlja zanimljivu priliku za pretvaranje proizvoda niske vrijednosti u proizvode kao što su arabitol i ksilitol, visokovrijedni šećerni alkoholi koji se koriste u raznim industrijama, uglavnom u prehrambenoj industriji kao umjetni zaslađivači. Kemijska sinteza navedenih tvari često je skupa, pa se razmatra biotehnološki pristup. *Debaryomyces hansenii*, ne-*Saccharomyces* kvasac, ima sposobnost sintetizirati arabitol koristeći glicerol kao supstrat. Svrha ovog rada bila je odrediti optimalnu pH vrijednost, početnu koncentraciju glicerola i koncentraciju natrijevog klorida za proizvodnju arabitola pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990. Najveća produktivnost ($Pr_{\text{arabitol}} = 0,035 \text{ g/Lh}$) kao i najveći prinos ($Y_{\text{arabitol}} = 4,235 \text{ g/L}$) uočeni su u mediju s 50 g/L glicerola, 0 g/L NaCl i pH vrijednosti 6.

Ključne riječi: glicerol, arabitol, šećerni alkoholi, *Debaryomyces hansenii*, bioreaktor s miješalom

Rad sadrži: 42 stranica, 11 slika, 9 tablica, 40 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Nenad Marđetko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 28.11.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

PRODUCTION OF ARABITOL FROM GLYCEROL BY YEAST *Debaryomyces hansenii* JCM 1990

Toni Vlahović, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058214753

Abstract: Due to modernization, humans are always searching for new renewable energy sources. Glycerol, a byproduct of the biodiesel industry, presents an interesting opportunity to turn low value product into products such as arabitol and xylitol, which are high value sugar alcohols that are used in various industries, mainly in food industry as artificial sweeteners. Chemical synthesis of said substances is often expensive, so a biotechnological approach is considered. *Debaryomyces hansenii*, a non-*Saccharomyces* yeast, has a capability to synthesize arabitol using glycerol as substrate. The purpose of this paper was to determine the optimal pH level, initial glycerol concentration and sodium chloride concentration for arabitol production using the yeast *Debaryomyces hansenii* JCM 1990. Highest productivity ($Pr_{arabitol} = 0,0353$ g/Lh) as well as highest yield ($Y_{arabitol} = 4,235$ g/L) were observed in medium with 50 g/L glycerol, 0 g/L NaCl and a pH level of 6.

Keywords: glycerol, arabitol, sugar alcohols, *Debaryomyces hansenii*, stirred-tank bioreactor

Thesis contains: 42 pages, 11 figures, 9 tables, 40 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Mario Novak, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Nenad Marđetko, PhD

Reviewers:

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

Thesis defended: November 28th, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
1.1. ODRŽIVA BIOTEHNOLOGIJA	3
2.1.1. Glicerol	4
1.2. ŠEĆERNI ALKOHOLI	6
1.1.1. Ksilitol.....	7
1.1.2. Arabitol.....	8
1.1.3. Sorbitol.....	8
1.1.4. Maltitol.....	9
2.3. PROIZVODNJA ARABITOLA BIOTEHNOLOŠKIM PUTEM	9
2.3.1. Metabolički putevi sinteze arabitola	9
2.3.2. Kvasac <i>Debaryomyces hansenii</i>	11
2.3.3. Biotehnološka primjena kvasca <i>Debaryomyces hansenii</i>	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Hranjive podloge.....	16
3.2. APARATURA I PRIBOR	17
3.2.1. Bioreaktor s miješalom	17
3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)	18
3.2.3. Spektrofotometar	18
3.2.4. Ostala aparatura i pribor	18
3.3. METODE RADA.....	19
3.3.1. Priprema hranjive podloge.....	19
3.3.2. Uzgoj kvasca <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 1990	19
3.4. METODE ANALIZE	20
3.4.1. Određivanje koncentracije biomase kvasca	20
3.4.2. Određivanje optičke gustoće	21
3.4.3. Priprema i analiza uzoraka pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti	21
3.5. PARAMETRI USPJEŠNOSTI.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23

4.1. Utjecaj dodanog NaCl na rast i proizvodnju arabitola tijekom uzgoja kvasca <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 1990 u podlogama s 25 g/L glicerola i različitim pH vrijednostima.....	24
4.2. Utjecaj dodanog NaCl na rast i proizvodnju arabitola tijekom uzgoja kvasca <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 1990 u podlogama s 50 g/L glicerola i različitim pH vrijednostima.....	28
4.3. Utjecaj dodanog NaCl na rast i proizvodnju arabitola tijekom uzgoja kvasca <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 1990 u podlogama sa 100 g/L glicerola i različitim pH vrijednostima.....	32
4.4. Uzgoj kvasca <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 1990 u bioreaktoru s miješalom.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

U posljednjih nekoliko desetljeća potreba za energijom je znatno porasla zbog povećanja svjetske populacije i ambicioznih razvojnih potreba. Zalihe fosilnih goriva, koja su do sada bila glavni, obnovljivi izvor energije se smanjuju i stoga se istražuju obnovljivi izvori energije koji bi ih mogli nadomjestiti. U tu skupinu spadaju solarna, geotermalna energija, hidroenergija i bioenergija (Mondal i sur., 2023). Bioenergija i biogoriva koriste biomasu kao sirovinu za proizvodnju, a biomasa je dostupna tijekom cijele godine te su stoga biogoriva najopsežnije korišten izvor obnovljive energije (Duarah i sur., 2022). Biogoriva se mogu podijeliti s obzirom na različite sirovine iz kojih potječu, prema čemu se dijele na bioplín, biodizel, bioetanol, biovodik itd. (Zhang i Zhang, 2019). Biodizel se proizvodi procesom transesterifikacije lipida s alkoholima te se procesom razdvajaju dvije faze – biodizel i glicerol. Glicerol se u proizvodnji biodizela smatra nusproizvodom, ali pročišćavanjem nečistoća iz glicerola moguće ga je pretvoriti u vrijednu sirovinu za biotehnošku proizvodnju. Zbog niske cijene i široke dostupnosti, te svojstava poput higroskopnosti, niske hlapivosti, topivosti, netoksičnosti i dr. našao je primjenu u kemijskoj i biotehnoškoj proizvodnji (Monteiro i sur., 2018).

Glicerol, između ostalog, može se koristiti u kemijskoj i biotehnoškoj proizvodnji šećernih alkohola. Oni imaju široku primjenu u dentalnoj medicini te prehrambenoj industriji kao zaslađivači koji se nepotpuno apsorbiraju u krvotok i time osiguravaju manju promjenu koncentracije glukoze u krvi (Awuchi, 2017). Kemijski procesi proizvodnje zahtijevaju visoke temperature i tlakove, čiste supstrate i katalizatore što proces čini ekonomski neisplativim. Za razliku od toga, proizvodnja šećernih alkohola biotehnoškim putem ne zahtjeva takve uvjete, a temelji se na korištenju enzima i mikroorganizama koji sadrže metaboličke puteve pretvorbe izvora ugljika u šećerne alkohole (Erian i Sauer, 2022). Među šećerne alkohole spadaju ksilitol, arabitól, sorbitól, manitol, laktitol i drugi. Arabitol je šećerni alkohol bez boje, niskog kalorijskog sadržaja i dobrih svojstava rehidracije i ovlaživanja. Kao takav je našao primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te dentalnoj medicini (Zheng i sur., 2020). Proizvodnja istog kemijskim putem zahtjeva visoke temperature i tlak, nastaju značajne količine nusproizvoda te zahtjeva kompleksne metode pročišćavanja. Biotehnoški put proizvodnje zahtjeva manje ulaganja, a koriste se mikroorganizmi, najčešće osmotolerantni kvasci koji ga mogu sintetizirati metaboličkim putevima iz glicerola, saharoze, laktoze, ksiloze i drugih izvora ugljika (Ravikumar i sur., 2022).

Skupina ne-*Saccharomyces* kvasaca može koristiti brojne supstrate kao izvor ugljika te može rasti i nakupljati metabolite u stresnim uvjetima kao što su visoke koncentracije soli, visoki osmotski tlak te u prisutnosti fenola i slabih kiselina koje se smatraju inhibitornim tvarima (Mukherjee i sur., 2017). U tu skupinu spada kvasac *Debaryomyces hansenii*, osmo-, halo-, kserotolerantan kvasac koji ima mogućnost rasta na podlogama s visokim koncentracijama natrijevog klorida i glukoze te može asimilirati široki spektar različitih izvora ugljika (Breuer i Harms, 2006).

Cilj ovog rada je istraživanje optimalnih uvjeta proizvodnje arabitola pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii* pri različitim koncentracijama glicerola uz promjenu pH vrijednosti i koncentracije natrijevog klorida.

2. TEORIJSKI DIO

1.1. ODRŽIVA BIOTEHNOLOGIJA

Povećanjem populacije i promjenom životnog stila ljudi s obzirom na tehnološke napretke dovelo je do eksponencijalnog povećanja potrebe za energijom. Većina trenutnih kućnih i industrijskih operacija ovisi primarno o fosilnim gorivima za energetske potrebe, a s obzirom da su to neobnovljivi izvori energije, zalihe se smanjuju. Osim toga, korištenje fosilnih goriva kao energetskog resursa povlači za sobom i probleme sa zagađenjem okoliša (Gautam i sur., 2020). Iz tih razloga se istražuju obnovljivi izvori energije uključujući solarnu, geotermalnu energiju, hidroenergiju i bioenergiju (Chilakamarry i sur., 2021). Neki od navedenih obnovljivih izvora energije su prikladni za generiranje topline, ali ne i generiranje snage ili upotrebu u transportu. U tu skupinu spadaju solarna, geotermalna, hidroenergija i energija vjetra te se ovisno o području na kojem je energija potrebna, koristi ona koje ima u obilju. S druge strane, biomasa je kao sirovina dostupna tijekom cijele godine te su stoga biogoriva najopsežnije korišten izvor obnovljive energije (Duarah i sur., 2022). Biogoriva su goriva proizvedena iz biomase, odnosno organskog materijala biljaka, algi i životinjskog otpada te se zbog svog podrijetla smatraju važnima za globalnu energetske ekonomiju kao primarni način dekarbonizacije okoliša. Međutim, skuplja su od fosilnih goriva te se razvija briga o količini potrebnog zemljišta ukoliko se proizvodnja biogoriva proširi na razine potrebne za značajniju dekarbonizaciju. U posljednjem desetljeću, proizvodnja se povećala za 4 %. Ta vrijednost je neznatna s obzirom na energetske potrebe u transportu, od kojih biogoriva čine svega 3,6 % zadovoljenih energetske potreba, a prema Internacionalnoj energetskej agenciji (*eng.* International Energy Agency – IEA) smatra se da bi biogoriva trebala ispunjavati 64 % energetske potreba u transportu do 2050. godine za postizanje ciljeva u dekarbonizaciji okoliša (Spandagos, 2024).

Biogoriva se mogu kategorizirati s obzirom na komponente i postojeće oblike, npr. čvrsta, tekuća i plinovita biogoriva. Čvrstim biogorivima se smatraju goriva sirove biomase, obrađene biomase i ostacima nakon konverzije biomase. Tekuća i plinovita biogoriva su oboje produkti konverzije biomase te su poznatiji pod nazivima bio-ulja i sintetički plinovi. Druga, poznatija podjela temelji se na različitim sirovinama iz koje potječu, prema čemu se dijele na bioplin, biodizel, bioetanol, biovodik itd. (Zhang i Zhang, 2019). Biodizel se proizvodi iz lipida procesom transesterifikacije triglicerida s alkoholom poput metanola ili etanola uz prisutnost kiselinskog katalizatora. Procesom se razdvajaju dvije faze od kojih je gornja faza biodizel (metilni ili etilni

esteri), a donja faza je sirovi glicerol. Ovisno o korištenoj sirovini, kvaliteta produkata varira te zahtjeva različite metode pročišćavanja (Kaur i sur., 2020).

2.1.1. Glicerol

Glicerol (propan-1,2,3-triol) je organski spoj kemijske formule $C_3H_8O_3$. Pri sobnoj temperaturi je bezbojna, viskozna tekućina bez mirisa koja ima higroskopna svojstva. Vlagu iz atmosfere može vezati vodikovim vezama zbog trihidroksilne skupine u svojoj strukturi te ga je zbog toga također moguće miješati s vodom. Također ga je moguće miješati s etanolom, ali ne s organskim otapalima (Ben i sur., 2022). Svojstva glicerola pri temperaturi od 20 °C prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Svojstva glicerola (*prema* Morais Lima i sur., 2020)

molarna masa	92,09382 g/mol
viskoznost	1,5 Pa s
površinska napetost	64 mN/m
gustoća	1,261 g/mL
temperatura taljenja	18,2 °C
temperatura vrelišta	290 °C

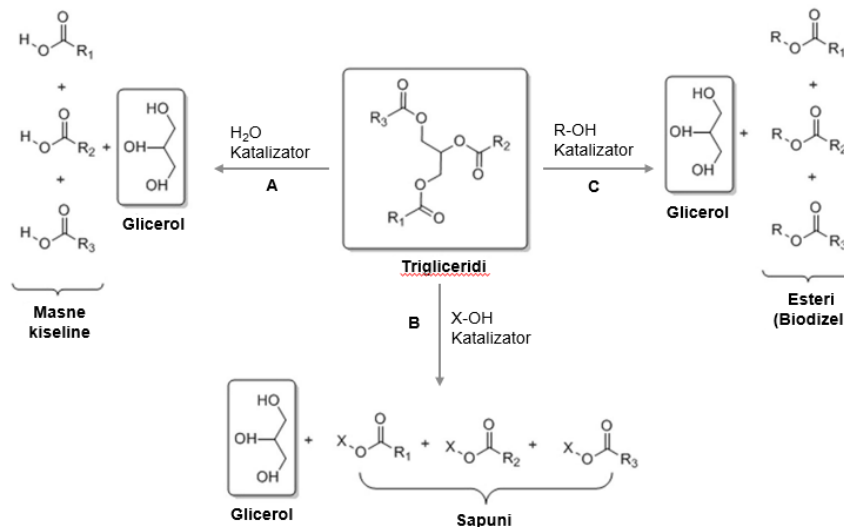
Glicerol ima visoku točku vrelišta koja iznosi 290 °C i klasificiran je kao poluhlapljivi spoj, a iako talište iznosi 18,2 °C, ponovno zamrzavanje glicerola odvija se pri puno nižim temperaturama. U takvim slučajevima postaje ekstremno hladna tekućina, ali se ne smrzava što omogućava njegovu primjenu u proizvodnji antifrizu (Lima i sur., 2020). Površinska napetost glicerola iznosi 0,0634 N/m pri 20 °C, što je neznatno manje od površinske napetosti vode (0,0725 N/m), ali znatno više od površinske napetosti većine organskih otapala (Takamura i sur., 2012).

2.1.1.1. Sinteza i izvori glicerola

Pod pojmom glicerol uglavnom se misli na čistu tvar. Međutim, otopine glicerola i vode koje sadržavaju više od 95 % glicerola se nazivaju glicerini, dok se sirovim glicerolom naziva glicerol dobiven kao nusproizvod u procesu proizvodnje biodizela. Sirovi glicerol uglavnom sadrži između 70 % i 80 % glicerola (Monteiro i sur., 2018).

Neke od metoda sinteze glicerola prikazane su na slici 1. U uobičajene metode sinteze spadaju: hidroliza (slika 1A), saponifikacija (slika 1B) i reakcija transesterifikacije (slika 1C) u proizvodnji biodizela. Iako postoje i drugi načini za sintezu glicerola poput fermentacije, oni nisu u primjeni u industrijskom mjerilu. Prevladavajući način proizvodnje glicerola jest sinteza alkilnih

estera reakcijom transesterifikacije ulja pomoću etanola ili metanola, uz upotrebu katalizatora. Kao nusprodukt ove reakcije dolazi do nastajanja jedne molekule glicerola na tri nastale molekule metilnih ili etilnih estera koje služe kao baza za proizvodnju biodizela (Monteiro i sur., 2018). Glicerol dobiven na ovaj način sadrži niz nečistoća poput: vode, katalizatora, slobodnih masnih kiselina, soli, alkohola i biodizela. Udio spomenutih nečistoća iznosi između 20 % i 60 % te ovisi o samoj sirovini, efikasnosti katalitičke reakcije i koracima proizvodnje i pročišćavanja biodizela (Schwengber i sur., 2016).



Slika 1. Kemijske reakcije u kojima dolazi do sinteze glicerola: hidroliza (A), saponifikacija (B), transesterifikacija (C) (prema Monteiro i sur., 2018)

Glicerol se u prošlosti proizvodio primarno kao nusprodukt saponifikacije masti u proizvodnji sapuna te se koristio kao sirovina u proizvodnji nitroglicerina. Zamjenom prirodnih sapuna sa sintetskim detergentima dovela je do manjka proizvedenog glicerola te je njegova cijena stoga bila visoka. S razvijanjem obnovljive biotehnologije, u proizvodnji biodizela se nakupljala velika količina glicerola kao nusprodukta proizvodnje što je povećalo dostupnost glicerola i dovelo do smanjenja cijena. Zbog cijene i pristupačnosti glicerola, našao je primjenu u biotehnološkoj sirovini kao izvor ugljika (Attarbach i sur., 2023). Širok spektar primjene glicerola u industriji proizlazi iz njegovih fizikalnih i kemijskih svojstava poput: higroskopsnosti, niske hlapivosti, topivosti, stabilnosti, netoksičnosti i visokog viskoziteta. Glicerol je bitna sirovina koja se primjenjuje u kemijskoj industriji za proizvodnju boje, papira i detergenta, ali i u drugim industrijama poput tekstilne industrije i prehrambene industrije kao emulgator i stabilizator ili u proizvodnji šećernih alkohola koji služe kao zaslađivači (Monteiro i sur., 2018).

1.2. ŠEĆERNI ALKOHOLI

Šećerni alkoholi (polioli) su kemijski definirani kao derivati saharida u kojima je ketonska ili aldehidna grupa zamijenjena hidroksilnom grupom. Iako nisu ni šećeri ni alkoholi, naziv su dobili jer se smatraju hibridima molekule saharida i alkohola (Ibrahim, 2016). Bijele su boje i topljivi su u vodi te su prirodno prisutni u malim koncentracijama u voću i povrću. Komercijalno se mogu proizvoditi industrijski kemijskim i biotehnološkim putem iz saharida ili obnovljivih, lignoceluloznih sirovina. Kemijski procesi temelje se na redukciji mono- ili disaharida u odgovarajuće šećerne alkohole. Zahtijevaju čiste supstrate i katalizatore te visoke temperature (100 – 160 °C) i tlakove (40 – 120 bar). Proizvodnja takvim putem ima niske prinose i dolazi do formacije nusproizvoda, ali je ta metoda ekonomski najisplativija (Erian i Sauer, 2022). Proizvodnja šećernih alkohola biotehnološkim putem temelji se na korištenju enzima ili mikroorganizama koji ih sadrže te se metaboličkim putevima supstrati prevode u šećerne alkohole. Prednost u odnosu na kemijske procese je mogućnost korištenja nižih temperatura i tlakova (prilagođeni su aktivnosti enzima i mikroorganizmima) te korišteni supstrati ne moraju biti čisti. Mnoga istraživanja su fokusirana na „scale-up“ takvih procesa do industrijske razine, ali trenutno se jedino eritritol proizvodi biotehnološki na industrijskoj razini. Mikroorganizmi korišteni za proizvodnju šećernih alkohola su osmotolerantni kvasci poput rodova *Yarrowia* sp., *Hansenula* sp., *Debaryomyces* sp. (Erian i Sauer, 2022).

Šećerni alkoholi dijele se u tri grupe s obzirom na broj saharidnih jedinica:

I – derivati monosaharida – ksilitol, arabitol, sorbitol i manitol

II – derivati disaharida – laktitol i maltitol

III – derivati polisaharida kao mješavina šećernih alkohola – izomalt koji je 1:1 smjesa α -D-glukopiranozil-[1,6]-D-sorbitola i α -D-glukopiranozil-[1,6]-D-manitola (Grembecka, 2015).

Na slici 2 prikazana je lista različitih saharida iz kojih se određeni šećerni alkoholi mogu derivirati, najčešće mikrobiološkim putem. Na slici su plavim kvadratima označeni saharidi s odgovarajućim šećernim alkoholom kojeg mogu proizvesti.

	Glicerol	Glukoza	Ksiloza	Arabinoza	Fruktoza	Saharaza	Laktoza
D-arabitol							
L-arabitol							
Eritritol							
Glicerol							
Manitol							
Ksilitol							

Slika 2. Prikaz saharida iz kojih je moguće proizvesti određene šećerne alkohole (*prema Erian i Sauer, 2022*)

Najveću primjenu imaju u prehrambenoj industriji kao nutritivni zaslađivači u „sugar-free“ hrani i prehrambenim proizvodima poput žvakaćih guma, voćnih namaza, slatkiša i sladoleda (Msomi i sur., 2021). Šećerni alkoholi najčešće se nepotpuno apsorbiraju u krvotok kroz tanko crijevo što rezultira manjim promjenama u koncentraciji glukoze u krvi u odnosu na stolni šećer – saharozu. U odnosu na saharozu su manje slatki, ali imaju dovoljno sličan okus da bi mogli biti korišteni za umanjiti neugodne okuse jakih zaslađivača. Također, generalno imaju manju energetska vrijednost u odnosu na saharozu, a iznimke tome su sorbitol, laktitol i glicerol (Awuchi, 2017).

1.1.1. Ksilitol

Ksilitol je šećerni alkohol s 5 molekula ugljika, kemijske formule $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_3\text{CH}_2\text{OH}$. Strukturno se pojavljuje u kristalnom i granuliranom obliku, bijele je boje te je topljiv u vodi (Gasmi Benahmed i sur., 2020). Prirodno se pojavljuje u malim količinama u mnogim biljkama, mikroorganizmima i životinjskim tkivima. U ljudi se pojavljuje kao dio metabolizma ugljikohidrata te se proizvodi prosječno 5 – 15 g po danu (Msomi i sur., 2021). Ksilitol se smatra prehrambenim dodatkom sigurnim za dijabetičare zbog niskog glikemijskog indeksa koji iznosi 7 (glikemijski indeks glukoze je 100). Također, jedan gram ksilitola sadrži 2,43 kcal, dok gram saharoze sadrži 3,87. Ksilitol je, za razliku od drugih šećernih alkohola, pokazao zdravstvene učinke na zdravlje zubi (smanjuje pojavu karijesa), sprječavanje infekcije ušiju te pojavu osteoporoze (Awuchi, 2017).

U biotehnologiji se ksilitol može proizvoditi fermentacijom čiste ksiloze ili iz predobrađenih lignoceluloznih sirovina poput drveta breze koje bakterije ili kvasci prevode u ksilitol (Gasmi Benahmed i sur., 2020).

1.1.2. Arabitol

Arabitol je poliol koji se prirodno pojavljuje u dva oblika – L-arabitol i D-arabitol. L-arabitol se proizvodi iz L-arabinoze, dok se za D-arabitol smatra da proizlazi iz međuprodukata pentoza fosfatnog puta. Ovisno o soju kvasca korištenog za proizvodnju D-arabitola, produkti pentoza fosfatnog puta D-ksiluloza-5-fosfat ili D-ribuloza-5-fosfat se defosforiliraju u D-ksilulozu, odnosno D-ribulozu, koji se daljnjom redukcijom prevode u D-arabitol pomoću enzima arabitol dehidrogenaze (Erian i Sauer, 2022). D-arabitol je bezbojan, niskog sadržaja kalorija (0,2 kcal/g), ima oko 70 % slatkoće saharoze te ima dobra svojstva rehidracije i ovlaživanja. U prirodi je prisutan najviše u mikroorganizmima poput kvasaca, filamentoznih fungi i zelenih algi. U kvascima, zajedno s manitolom, ima ulogu u zaštiti od osmotskog tlaka te kao izvor ugljika, dok u filamentoznim fungima služi kao zaštita od nepovoljnih uvjeta (Ravikumar i sur., 2022).

Kao i u ostalim šećernim alkoholima, metabolizam arabitola nije povezan s inzulinom što omogućuje sporu apsorpciju u probavnom sustavu, čineći ga primjerenim dodatkom u namirnice namijenjene dijabetičarima. D-arabitol primjenu pronalazi i u dentalnoj medicini zbog mogućnosti inhibicije bakterija koje stvaraju kiselinu i potiču stvaranje karijesa, dok u isto vrijeme proizvodi osjećaj hlađenja u ustima prouzrokovanog endotermnim otapanjem. Također, može se koristiti kao posrednik u sintezi određenih lijekova te u proizvodnji kemikalija poput ksilitola, propilen glikola, etilen glikola, herbicida i lijekovima protiv nepatogenih bolesti (Zheng i sur., 2020).

1.1.3. Sorbitol

Sorbitol je alditol sa šest C-atoma te se još naziva D-glucitol. U prirodi se može pronaći u voću poput breskvi, jabuka, marelica i trešanja te u nekom povrću, duhanu i morskoj travi (Msomi i sur., 2021). Bijele je boje, ima kristalnu strukturu te ima četiri kristalne forme ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) i jednu tranzicijsku formu (ϵ). Te forme karakteriziraju različita svojstva higroskopsnosti, čvrstoće, kompresibilnosti i stabilnosti. Na primjer, γ -forma ima visoko talište, dobru stabilnost i nisku higroskopsnost te je zbog tih svojstava našla primjenu u medicini i prehrambenoj industriji. Sve kristalne forme (osim δ) imaju dobru kompresibilnost što ih čini primjenjivima u proizvodnji lijekova u formi tableta. Također, na sorbitolu se ne odvijaju Maillard-ove reakcije posmeđivanja, ima 60 % slatkoće saharoze te ima ugodan okus što mu omogućava primjenu u pekarskoj industriji (Zhang i sur., 2020).

Kemijskim putem se proizvodi iz glukoze katalitičkom hidrogenacijom pomoću vodika i katalizatora na bazi nikla ili se proizvodi u lužnatim uvjetima elektrokemijskom redukcijom dekstroze (Msomi i sur., 2021). Biotehnološkim putem se proizvodi najčešće iz fruktoze pomoću radnih mikroorganizama poput *Zymomonas mobilis* uz pomoć enzima glukoza-fruktoza

oksidoreduktaze, a može se proizvoditi i direktno iz laktoze koristeći genetski modificirane bakterije *Lactobacillus casei* (Zhang i sur., 2020).

1.1.4. Maltitol

Maltitol je higroskopni nereducirajući šećerni alkohol koji spada u drugu skupinu šećernih alkohola, odnosno, derivat je disaharida. U prirodi se pojavljuje u različitom voću i povrću te u malim koncentracijama u prženom sladu i listovima cikorije. Od svih poliola maltitol ima krivulju topljivosti najbližnju saharozi te posjeduje 75 – 90 % njene slatkoće. To ga čini prigodnom zamjenom za saharozu jer ostavlja veoma sličan priokus u ustima. Osim toga, s obzirom na visoku čistoću kristala maltitola i kemijsku kompoziciju, u svojoj prirodnoj formi je maltitol higroskopniji od saharoze. To svojstvo omogućava primjenu u prehrambenoj industriji jer higroskopnost maltitola produljuje vijek trajanja proizvoda te je potrebno više vremena da izgube teksturu nakon izlaganja atmosferskim, nepakiranim uvjetima. Komercijalno se proizvodi iz škroba žitarica (npr. kukuruz i pšenica) te krumpira; katalitičkom hidrogenacijom D-maltoze u svrhu proizvodnje hidrogeniranog disaharida koji se sastoji od molekule glukoze i molekule sorbitola (Saraiva i sur., 2020).

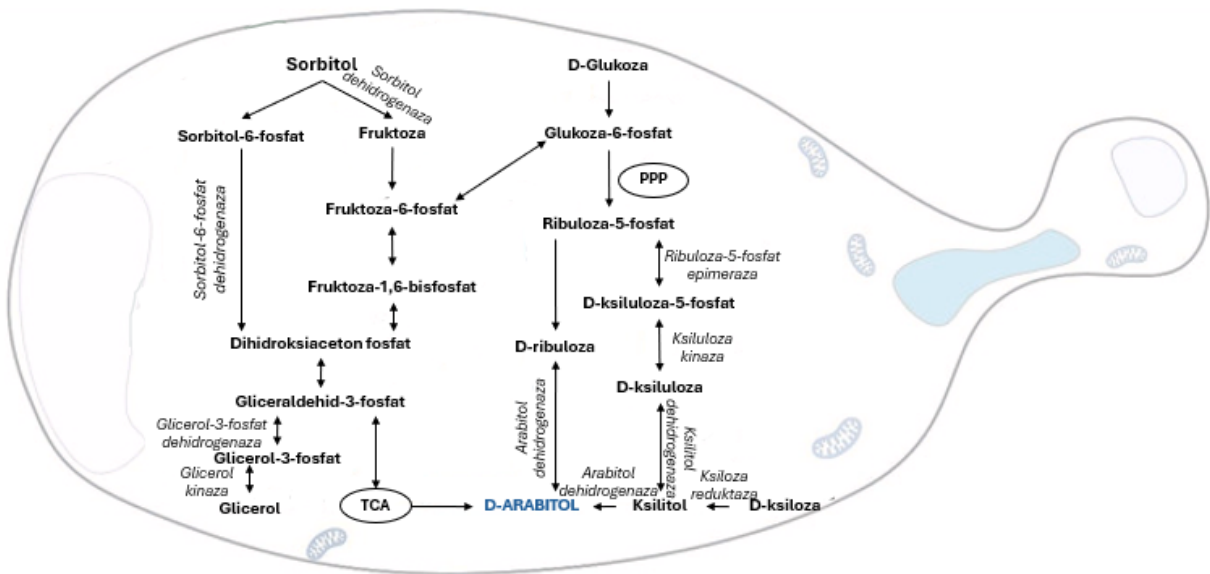
2.3. PROIZVODNJA ARABITOLA BIOTEHNOLOŠKIM PUTEM

Arabitol se može proizvoditi kemijskim i biotehnološkim putem, a u industrijskom mjerilu se danas proizvodi samo kemijski. Proces uključuje dvostupanjsku hidrogenaciju koristeći arabinsku kiselinu i laktone kao supstrate, zahtjeva visoku temperaturu (100 °C) i tlak te nastaju značajne količine nusproizvoda. Stoga, osim troškova samog procesa kemijske sinteze D-arabitola, njegovo pročišćavanje zahtjeva kompleksne metode i visoka ulaganja. Biotehnološkim putem se proizvodi iz stanica mikroorganizama, njihovih enzima ili industrijski proizvedenih enzima. Pri uzgoju na mikroorganizmima, najčešće osmotolerantim kvascima, kao izvor ugljika se prvotno koristila samo glukoza, ali nakon daljnjih istraživanja metaboličkih puteva otkrivena je mogućnost proizvodnje D-arabitola na glicerolu, saharozi, laktozi, fruktozi i ksilozi (Ravikumar i sur., 2022).

2.3.1. Metabolički putevi sinteze arabitola

Za razumijevanje biotehnološke sinteze arabitola pomoću kvasaca, potrebno je poznavati metaboličke puteve, međuprodukte i enzime koji sudjeluju u njegovoj sintezi i regulaciji. Metabolički putevi sinteze D-arabitola u kvasaca prikazani su na slici 3. Kao što je moguće vidjeti, sinteza D-arabitola provodi se preko puta pentoza fosfata (PPP) gdje ribuloza-5-fosfat predstavlja ključni prekursor za sintezu ksilitola, eritritola i D-arabitola. Međutim, sinteza D-arabitola u kvasaca konverzijom glukoze prolazi kroz kompliciraniji mehanizam. Identificirana su dva moguća puta sinteze D-arabitola iz glukoze. U prvom metaboličkom putu, glukoza se fosforilira do glukoza-6-

fosfata koji potom ulazi u PPP. Sintetizirana D-ribuloza-5-fosfat se potom defosforilira u D-ribulozu. Konverzija spomenute D-ribuloze u D-arabitol provodi se pomoću NADP-ovisne arabitol dehidrogenaze. Alternativni put ove sinteze događa se konverzijom glukoza-6-fosfata u D-ksilulozu-5-fosfat koja se potom pomoću ksiluloza kinaze defosforilira u D-ksilulozu. D-ksiluloza se prevodi u D-arabitol pomoću NAD-ovisne D-arabitol dehidrogenaze (Zhang i sur., 2014).



Slika 3. Metabolički putevi sinteze D-arabitola iz različitih supstrata (prema Ravikumar i sur., 2022)

Neki mikroorganizmi poput *Zygosaccharomyces rouxii* imaju sposobnost konverzije ksiloze i sorbitola. Konverzija ksiloze do D-arabitola može se provesti redukcijom ksiloze u ksilitol i potom u ksilulozu ili putem izravne konverzije ksiloze u ksilulozu pomoću enzima ksiluloza izomeraze. Formirana ksiluloza se potom reducira u D-arabitol putem enzima arabitol dehidrogenaze. Konverzija sorbitola u D-arabitol prati sličan metabolički put kao i glukoza. Sorbitol se konvertira putem sorbitol dehidrogenaze u fruktozu koja se potom fosforilira u fruktozu-6-fosfat nakon koje slijedi konverzija u glukoza-6-fosfat. Glicerol je također jedan od supstrata koje određeni kvasci kao što su: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Debaryomyces nepalensis* i *Debaryomyces hansenii*; mogu koristiti za sintezu arabitola. Glicerol se prvotno transportira unutar stanice gdje pomoću enzima glicerol kinaze dolazi do fosforilacije glicerola u glicerol-3-fosfat. Glicerol-3-fosfat se nadalje putem glicerol-3-fosfat dehidrogenaze konvertira u gliceraldehid-3-fosfat, odnosno dihidroksiaceton fosfat koji se zatim glukoneogenezom konvertiraju u glukoza-6-fosfat. Glukoza-6-fosfat će se konvertirati u D-arabitol pomoću PPP preko ribuloza-5-fosfata i ribuloze. Kvasci koji

ne posjeduju glicerol kinazu koriste NAD-ovisnu glicerol dehidrogenazu i dihidroksiaceton kinazu kako bi proveli konverziju glicerola u dihidroksiaceton fosfat (Ravikumar i sur., 2022).

2.3.2. Kvasac *Debaryomyces hansenii*

2.3.2.1. *Ne-Saccharomyces* kvasci

Iako su kvasci roda *Saccharomyces* našli široku biotehnološku primjenu u proizvodnji vina, piva, fermentirane hrane i sl., zbog nedostatka otpornosti na ekstremne uvjete i mogućnosti rasta u prisutnosti inhibitornih komponenti, pažnju su privukli *ne-Saccharomyces* kvasci. Ta skupina kvasaca može koristiti brojne supstrate kao izvor ugljika te može rasti i nakupljati metabolite u stresnim uvjetima kao što su visoke koncentracije soli, visoki osmotski tlak te u prisutnosti fenola i slabih kiselina koje se smatraju inhibitornim tvarima (Mukherjee i sur., 2017). Većinom su izolirani iz pokvarene hrane i pića, iz tog razloga se smatra da su razvili toleranciju na ekstremne uvjete te razvili metaboličke putove koji nisu karakteristični za *Saccharomyces* kvasce. Osim toga, imaju visoke brzine rasta u fermentacijskim procesima te imaju sposobnost proizvodnje vrijednih enzima i šećernih alkohola što povećava njihovu upotrebu u biotehnologiji (Kręgiel i sur., 2017). Neki od kvasaca koji spadaju u skupinu *ne-Sacchariomyces* kvasaca su kvasci rodova *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* i *Schizosaccharomyces* (Padilla i sur., 2016).

2.3.2.2. Karakteristike kvasca *Debaryomyces hansenii*

D. hansenii je osmo-, halo- i kserotolerantan kvasac. Poznati je kontaminant različitih prehrambenih proizvoda s niskom aktivnosti vode, kao i mikroorganizmi *Pichia guilliermondi*, *Yarrowia lipolytica* i *Candida parapsilosis*. *D. hansenii* pronađen je i u vodama s visokom razinom soli poput solana na Atlantskoj obali Namibije kao i u područjima niskih temperatura poput Antarktike i arktičkih ledenjaka. Ekstremofilne karakteristike postavile su ovaj mikroorganizam kao interesantan model za proučavanje tolerancije eukariotskih stanica na visoki tlak i visoke koncentracije soli. Ispostavilo se da kalij i natrij igraju ključnu ulogu za rast kvasca *D. hansenii* u uvjetima visoke koncentracije soli te je njegova halotolerantna priroda potvrđena činjenicom da prisutnost natrija u mediju štiti stanice kvasca od oksidativnog stresa i dodatnog abiotičkog stresa poput ekstremnog pH i temperature (Navarrete i sur., 2021).

Genom kvasca *D. hansenii* u potpunosti je sekvenciran 2004. (Dujon i sur., 2004). Iako je od tada zabilježeno više od 6500 gena, molekularna karakterizacija ovog kvasca je daleko od potpune. Većina zabilježenih gena povezana je s mehanizmima tolerancije na osmotski stres i

visoke koncentracije soli. *D. hansenii* posjeduje jedan od najvećih kodirajućih kapaciteta među kvascima (72,9 % genoma) sa 6906 detektiranih kodirajućih sekvenci (Prista i sur., 2016).

Osim mogućnosti rasta na podlogama s visokom koncentracijom natrijevog klorida i glukoze, *D. hansenii* ima sposobnost asimilacije širokog spektra različitih izvora ugljika kao što je i moguće vidjeti iz tablice 1. Za razliku od ostalih kvasaca korištenih u biotehnologiji poput kvasaca *Candida albicans*, *Pichia angusta* i *Pichia pastoris*, *D. hansenii* koristi n-alkane i asimilira melobiozu, rafinozu i topivi škrob. *Yarrowia lipolytica*, još jedan biotehnološki značajan kvasac, ima sposobnost asimilacije n-alkana, ali ne raste u uvjetima visoke koncentracije soli i glukoze. Iako *D. hansenii* ima visoku toleranciju na kemijski stres, što pruža mogućnost njegovog uzgoja na različitim supstratima, pokazuje slab rast u odsustvu kisika. Fermentacija glukoze, galaktoze, saharoze, maltoze i trehaloze je slaba, dok fermentacija laktoze nije zamijećena što je i u skladu sa slabim rastom *D. hansenii* u anaerobnim uvjetima. Optimalna temperatura za rast kvasca *D. hansenii* iznosi 20 – 25 °C, ali je zamijećen rast i pri temperaturama nižim od 0 °C. pH optimum ovog kvasca nalazi se u rasponu od pH 4.0 – 6.0, međutim ovaj kvasac ima sposobnost rasta u intervalu pH 3 – 10 (Breuer i Harms, 2006).

Tablica 2. Asimilacija i fermentacija različitih izvora ugljika za kvasac *Debaryomyces hansenii* (prema Breuer i Harms, 2006)

Asimilacija			
Glukoza	+	Trehaloza	+
Galaktoza	+	Laktoza	p
L-Sorboza	p	Metanol	-
Saharoza	+	Etanol	+/s
Maltoza	+	Glicerol	+
Celobioza	+	Sukcinat	+
Rafinoza	+	D-Manitol	+
Melobioza	v	Topivi škrob	p
Fermentacija			
Glukoza	s/-	Maltoza	s/-
Galaktoza	s/-	Laktoza	-
Saharoza	s/-	Trehaloza	s/-

+, pozitivno; p, promjenjivo; s, slabo; -, negativno

2.3.3. Biotehnoška primjena kvasca *Debaryomyces hansenii*

Kontradiktorni rezultati istraživanja koja su bila provedena u različitim uvjetima, nedostatak konsenzusa između provedenih istraživanja te neadekvatna oprema za proučavanje genoma kvasca *Debaryomyces hansenii* bili su glavni razlozi usporene implementacije ovog mikroorganizma u biotehnoške procese. U prethodnom desetljeću razvoj visoko opremljenih laboratorijskih bioreaktora i preciznijih mjernih instrumenata doveo je do ponovnog interesa za istraživanjem kvasca *Debaryomyces hansenii* te njegovu primjenu u biotehnoške svrhe. Stoga su u novije doba nađene neke nove primjene ovog kvasca u područjima biotehnologije i prehrambene tehnologije koje su povezane s njegovim specifičnim karakteristikama (Navarrete i sur., 2022).

U istraživanju koje su proveli Medina-Córdova i sur. (2018) pokazalo se da je kvasac *Debaryomyces hansenii* veoma efikasan u suzbijanju fungalne kontaminacije u prehrambenim proizvodima. Suzbijanje kontaminacije ispitano je pomoću nekoliko sojeva ovoga kvasca na raznim prehrambenim proizvodima poput: voća, mliječnih proizvoda, obrađenog mesa i žitarica. Naime, ispostavilo se da ovaj kvasac ima nekolicinu mehanizama koji dovode do suzbijanja kontaminacije poput sekrecije specifičnih enzima; sinteza antimikrobnih tvari, formacija biofilma, visoka adhezivna sposobnost za specifična mjesta vezanja. Proteaza, hitinaza i glukanaza proizvedena pomoću ovog kvasca sudjeluje u degradaciji stanične stijenke fitopatogenih plijesni *Penicilium italicum* te također istovremeno stimulira proizvodnju fitoaleksina, antimikrobnih molekula koje biljke sintetiziraju kako bi se zaštitile od kontaminacije.

Još jedna primjena ovog kvasca pokazala se u istraživanju koje su proveli Angulo i sur. (2020) u kojem je ispitivan probiotički i nutritivni utjecaj kvasca *Debaryomyces hansenii* na životinjama. Dodatak ovog kvasca u mikrobiotu ispitivanih životinja dokazao je postojanje niza probiotičkih svojstava koje *D. hansenii* pruža poput poboljšane proliferacije i diferencijacije stanica, izmjene mikrobiote i poboljšanih imunostimulatornih učinaka. Identificiran je niz komponenti stanične stijenke i poliamina koji se smatraju jednim od razloga navedenih probiotičkih svojstava.

Kvasac *Debaryomces hansenii* ima sposobnost konverzije glicerola u druge visoko vrijedne poliole poput arabitola i ksilitola koji imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji gdje služe kao umjetna sladila koja predstavljaju zdraviju alternativu tradicionalnim zaslađivačima, ali i u drugim granama kao primjerice u dentalnoj medicini za sprječavanje karijesa. Glicerol je nusprodukt nekolicine procesa kao što su proizvodnja biodizela i etanola te se smatra otpadom u oleokemijskoj industriji. Vrijednost glicerola na tržištu je niska, njegovo odlaganje u

prirodne vode bi bilo ekološki neprihvatljivo, a kemijska konverzija u visoko vrijedne proizvode skupa. Stoga, razmatraju se određeni mikroorganizmi koji bi mogli provoditi konverziju glicerola u visoko vrijedne spojeve među kojima se kao potencijalni kandidat za biotehnološku sintezu pojavio i kvasac *Debaryomyces hansenii*. Upotrebom mikroorganizama za konverziju glicerola provela bi se revalorizacija ovog spoja koja bi vodila prema ekonomski i ekološki prihvatljivijim uvjetima proizvodnje (Navarrete i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korišten je kvasac *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Radna kultura čuvana je pri 4 °C na kompleksnoj YPD podlozi (engl. *Yeast, Pepton, Dextrose*), u Petrijevim zdjelicama.

3.1.2. Kemikalije

Popis korištenih kemikalija te njihova čistoća i podrijetlo prikazane su u tablici 1.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Čistoća	Podrijetlo
Glicerol	≥99 %	Fisher Chemical, UK
Glukoza monohidrat	≥99 %	Sigma-Aldrich, SAD
Agar	Za upotrebu u biotehnologiji	Biolife, Italija
Kvašćev ekstrakt	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Sladni ekstrakt	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Tripton	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Natrijev klorid	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Sumporna kiselina	Min. 96 %, p.a.	Merck, Njemačka
Natrijev hidroksid	≥98 %	Merck, Njemačka
Cinkov sulfat heptahidrat	≥99 %	Merck, Njemačka
Antifoam 204	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Demineralizirana voda	p.a.	-

3.1.3. Hranjive podloge

Čista kultura kvasca *D. hansenii* JCM 1990 održavana je na čvrstoj YPD podlozi u Petrijevim zdjelicama, a uzgoj inokuluma proveden je na tekućoj YPD podlozi. Sastavi ovih hranjivih podloga prikazani su u tablici 4.

Sastav hranjivih podloga korištenih za ispitivanje sinteze arabitola iz glicerola prikazan je u tablici 5.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge za održavanje čiste kulture i uzgoj inokuluma kvasca *D. hansenii* JCM 1990

Komponenta podloge	Čvrsta YPD podloga	Tekuća YPD podloga
Glukoza (g/L)	20	20
Tripton (g/L)	20	20
Kvaščev ekstrakt (g/L)	10	10
Agar (g/L)	20	-

Tablica 5. Sastav hranjivih podloga korištenih za uzgoj kvasca *D. hansenii* JCM 1990

Podloga	pH	Koncentracija (g/L)				
		Glicerol	Natrijev klorid	Tripton	Sladni ekstrakt	Kvaščev ekstrakt
P ₁	3,5	25	0	5	3	5
P ₂	3,5	25	50	5	3	5
P ₃	3,5	25	100	5	3	5
P ₄	6	25	0	5	3	5
P ₅	6	25	50	5	3	5
P ₆	6	25	100	5	3	5
P ₇	3,5	50	0	5	3	5
P ₈	3,5	50	50	5	3	5
P ₉	3,5	50	100	5	3	5
P ₁₀	6	50	0	5	3	5
P ₁₁	6	50	50	5	3	5
P ₁₂	6	50	100	5	3	5
P ₁₃	3,5	100	0	5	3	5

Tablica 5. Sastav hranjivih podloga korištenih za uzgoj kvasca *D. hansenii* JCM 1990 – **nastavak**

P₁₄	3,5	100	50	5	3	5
P₁₅	3,5	100	100	5	3	5
P₁₆	6	100	0	5	3	5
P₁₇	6	100	50	5	3	5
P₁₈	6	100	100	5	3	5

3.2. APARATURA I PRIBOR

3.2.1. Bioreaktor s miješalom

Uzgoj je proveden u bioreaktoru s miješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) korisnog volumena 2 L koji je prikazan na slici 4. Sterilizacija bioreaktora provedena je u autoklavu pri 121 °C u vremenu od 20 min. Bioreaktor je opremljen kisikovom i pH elektrodom te pripadajućim sustavima za regulaciju aeracije i pH, temperaturnom sondom te sustavom za prepumpavanje podloge i otopina kiseline i lužine te sustavom za inokulaciju i izuzimanje uzorka. Grijanje i hlađenje podloge provedeno je cirkuliranjem vode kroz plašt.



Slika 4. Bioreaktor s mješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) (vlastita fotografija)

3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Za ispitivanje sastava uzoraka korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography* - UPLC) 1290 Infinity II, (Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A), automatskog injektora (G7167B), termostata (G7116B), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H⁺; Phenomenex, SAD) s pretkolumnom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline, a njen protok je iznosio 0,6 mL/min. Volumen uzorka za analizu je iznosio 10 µL.

3.2.3. Spektrofotometar

Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom uzgoja provedeno je na spektrofotometru Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, SAD). Optička gustoća određivana je pri valnoj duljini od $\lambda=600$ nm u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Njemačka).

3.2.4. Ostala aparatura i pribor

- analitička vaga (Acculab, SAD; Sartorius, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- centrifuga (ThermoFisher Scientific SL 8R, SAD; Witeg, Njemačka)
- hladnjak i zamrzivač (Gorenje, Slovenija)
- laboratorijska tresilica (RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka)
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska)
- sušionik (Instrumentaria ST-50, Hrvatska)
- tehnička vaga (Tehtnica, Slovenija)
- vortex mikser (LLG-Labware, Njemačka)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20 µm, 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)]

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema hranjive podloge

Čvrste hranjive podloge za održavanje čiste kulture i tekuće hranjive podloge za uzgoj inokuluma pripremljene su na način da se u određenom volumenu demineralizirane vode otope odvagane količine sastojaka hranjive podloge kako bi konačna koncentracija sastojaka podloge odgovarala onoj koja je prikazana u tablici 3 (poglavlje 3.1.3.). Podloge su potom sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min te su podloge namijenjene za održavanje čiste kulture izlivena u Petrijeve zdjelice u aseptičnim uvjetima.

Podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama pripremljene su otapanjem odvagane količine sastojaka u određenom volumenu demineralizirane vode. Sastav ovih podloga prikazan je u tablici 2 (poglavlje 3.1.3.). Krajnji volumen podloge u svakoj tikvici iznosio je 200 mL. Prije sterilizacije pH u tikvicama je podešen na vrijednosti prikazane u tablici 2 (poglavlje 3.1.3.) pomoću 2 M otopine sumporne kiseline, odnosno 2M otopine natrijevog hidroksida.

Podloge za uzgoj u bioreaktoru s miješalom pripremljene su otapanjem 100 g/L glicerola, 5 g/L triptona, 5 g/L kvašćevog ekstrakta i 3 g/L sladnog ekstrakta u određenom volumenu demineralizirane vode u staklenoj boci. Krajnji volumen podloge za bioreaktor iznosio je 1 L. Bioreaktor s podlogom je steriliziran u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min.

3.3.2. Uzgoj kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990

3.3.2.1. Uzgoj inokuluma

Radna kultura kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 čuvana je na čvrstoj YPD podlozi u Petrijevim zdjelicama te je redovno precijepljena na svježju čvrstu podlogu u aseptičnim uvjetima upotrebom jednokratne plastične mikrobiološke ušice. Nacijepljene ploče termostatirane su na 28 °C i čuvane u hladnjaku na 4 °C.

Za pripremu inokuluma za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama te za uzgoj u bioreaktoru, radna kultura kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 precijepljena je s čvrste podloge u Petrijevoj zdjelici na prethodno steriliziranu tekuću YPD podlogu u epruveti s vatenim čepom (V=10 mL) pomoću jednokratne plastične mikrobiološke ušice u aseptičnim uvjetima. Sadržaj epruvete je potom vorteksiran i termostatiran na 28 °C tijekom 24 sata nakon čega je sadržaj epruvete vorteksiran i u aseptičnim uvjetima prenesen u Erlenmeyerovu tikvicu s 150 mL tekuće YPD hranjive podloge. Pripremljeni inokulum je stavljen na tresilicu pri temperaturi od 28 °C tijekom 24 sata.

3.3.2.2. Uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama

U Erlenmeyerove tikvice (V=500 mL) dodano je 200 mL hranjive podloge pripravljene kako je navedeno u tablici 2 (poglavlje 3.1.3.). Tikvice s hranjivom podlogom su potom sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min. Nakon sterilizacije, tikvice su inokulirane s 10 % (vol/vol) inokuluma (poglavlje 3.3.2.1.) te stavljene na tresilicu pri temperaturi od 28 °C. Uzgoj se provodio kroz 96 sati s izuzimanjem uzoraka u unaprijed određenim vremenskim razmacima. Uzorkovanje je provedeno pomoću mehaničke pipete, izuzimanjem 10 mL uzorka u plastične kivete. U izuzetim uzorcima određivana je: koncentracija biomase kvasca gravimetrijskom metodom (poglavlje 3.4.1.), optička gustoća pri 600 nm (poglavlje 3.4.2.) te sastav supstrata i produkata UPLC analizom (poglavlje 3.4.3.).

3.3.2.3. Uzgoj u bioreaktoru s miješalom

U prethodno sterilizirani bioreaktor s miješalom dodano je 1 L podloge čija je priprema opisana u poglavlju 3.3.1. Podloga je zatim inokulirana s 10 % (vol/vol) inokuluma uzgojenog kako je opisano u poglavlju 3.3.2.1. Uzgoj se provodio u aerobnim uvjetima s protokom zraka od 1 L/h uz brzinu okretaja miješala od 400 okretaja/min. Uzgoj je proveden pri pH 6, odnosno pri pH 3,5 nakon prvih 24 sata uzgoja. Podešavanje pH provedeno je s 2 M otopinom sumporne kiseline i 2 M otopinom natrijevog hidroksida. Temperatura bioreaktora održavana je na 28 °C. Uzorci za analizu izuzimani su u predodređenim vremenskim intervalima tokom uzgoja. U izuzetim uzorcima određivana je: optička gustoća pri 600 nm (poglavlje 3.4.2.) te sastav supstrata i produkata UPLC analizom (poglavlje 3.4.3.).

3.4. METODE ANALIZE

3.4.1. Određivanje koncentracije biomase kvasca

Izuzeti uzorak prenesen je u plastičnu kivetu te zatim centrifugiran pri 5000 okretaja/min 10 minuta (centrifuga ThermoFisher Scientific SL 8R, SAD). Dobiveni supernatant je izdvojen, a talog je stavljen na sušenje pri 50 °C do konstantne mase. Nakon toga kivete su ohlađene te im je izvagana masa. Koncentracije biomase kvasca, γ_x (g/L) određena je prema ovisnosti:

$$\gamma_x = \frac{m_1 - m_0}{V_{uz}} [g/L] \quad [1]$$

pri čemu je:

m_1 – masa kivete s biomasom [g]

m_0 – masa prazne kivete [g]

V_{uz} – volumen izuzetog uzorka [L]

3.4.2. Određivanje optičke gustoće

Optička gustoća uzoraka određivana je pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}) u kivetama od optičkog stakla debljine 10 mm.

3.4.3. Priprema i analiza uzoraka pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (poglavlje 3.4.1.) korišten je u pripremi uzoraka za UPLC analizu. U 750 μ L supernatanta uzorka dodano je 750 μ L otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g/L. Otopina je potom vorteksirana te ostavljena na sobnoj temperaturi 10 minuta. Otopine su potom centrifugirane 10 minuta pri 10 000 okretaja/min. Centrifugiranjem je došlo do taloženja proteina i nečistoća. Uzorci su potom filtrirani kroz mikrobiološki filter veličine pora 0,20 μ m. Uzorci pripremljeni na ovaj način korišteni su za UPLC analizu.

UPLC analizom u uzorcima su određivane koncentracije supstrata (glukoza, glicerol) te koncentracija produkta (arabitol). Kromatogrami dobiveni analizom obrađeni su pomoću računalnog programa openLAB CDS, a koncentracije detektiranih spojeva određene su prema jednadžbama baždarnih dijagrama prikazanih u prilogu 1.

3.5. PARAMETRI USPJEŠNOSTI

Za izračunavanje parametara uspješnosti biotehnološkog procesa proizvodnje arabitola pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 korištene su sljedeće jednadžbe:

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

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{x-x_0}{s_0-s} = \frac{Y_x}{\Delta S} [g/g] \quad [2]$$

pri čemu je:

X_0, S_0 – početna koncentracija biomase i supstrata [g/L]

X, S – konačna koncentracija biomase i supstrata [g/L]

Y_x – prinos biomase [g/L]

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

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

pri čemu je:

P_0, S_0 – početna koncentracija produkta i supstrata [g/L]

P, S – konačna koncentracija produkta i supstrata [g/L]

Y_P – prinos produkta [g/L]

- **koeficijent konverzije biomase u produkt**

$$Y_{\frac{P}{X}} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{P-P_0}{X-X_0} = \frac{Y_P}{Y_X} \quad [g/g] \quad [4]$$

pri čemu je:

μ – specifična brzina rasta biomase [1/h]

$Y_{P/X}$ – koeficijent konverzije biomase u produkt [g/g]

- **produktivnost procesa (Pr)**

$$Pr = \frac{Y_x}{t_U} = \frac{Y_P}{t_U} \quad [g/Lh] \quad [5]$$

pri čemu je:

Y_X – prinos biomase [g/L]

Y_P – prinos produkta [g/L]

t_U – ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj različitih pH vrijednosti kao i različitih koncentracija natrijevog klorida u podlozi na rast te proizvodnju arabitola kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama te u bioreктору s miješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka).

Vrijeme uzgoja iznosilo je 120 sati za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama, a 96 sati za uzgoj u bioreктору s miješalom. Odabrana vremena temelje se na podacima istraživanja kojeg su proveli Mardawati i sur. (2019) u kojem tvrde da eksponencijalna faza rasta kvasca *Debaryomyces hansenii* traje približno 72 sata nakon kojih kvasac ulazi u stacionarnu fazu rasta koja traje približno 122 sata. Prema Koganti i sur. (2011) optimalna temperatura za proizvodnju arabitola pomoću ovog mikroorganizma iznosila je 28 °C te su stoga svi uzgoji provedeni na toj temperaturi.

Kao supstrat korišten je glicerol u koncentracijama od 25, 50, 100 g/L. Navedene koncentracije glicerola odabrane su na temelju istraživanja koje su proveli Koganti i Ju (2013). Podloge su pripremljene na način kako je opisano u poglavlju 3.1.3. Tijekom uzgoja praćena je koncentracija porasle biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 mjerenjem optičke gustoće na valnoj duljini $\lambda=600$ nm pomoću spektrofotometra (Cary 100, UV-VIS, Agilent Technologies, SAD) i odvagom mase suhe tvari. Koncentracije supstrata i produkta tijekom uzgoja praćene su UPLC metodom. Provedenim istraživanjem određeni su najpogodniji omjeri koncentracije glicerola, natrijevog klorida i pH vrijednosti za proizvodnju arabitola pomoću ovog kvasca.

Rezultati istraživanja proizvodnje arabitola iz glicerola pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 prikazani su u poglavljima:

1. Utjecaj dodanog NaCl na rast i proizvodnju arabitola tijekom uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u podlogama s 25 g/L glicerola i različitim pH vrijednostima (poglavlje 4.1.)
2. Utjecaj dodanog NaCl na rast i proizvodnju arabitola tijekom uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u podlogama s 50 g/L glicerola i različitim pH vrijednostima (poglavlje 4.2.)
3. Utjecaj dodanog NaCl na rast i proizvodnju arabitola tijekom uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u podlogama s 100 g/L glicerola i različitim pH vrijednostima (poglavlje 4.3.)
4. Uzgoj kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u bioreктору s miješalom (poglavlje 4.4.)

4.1. UTJECAJ DODANOG NaCl NA RAST I PROIZVODNJU ARABITOLA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 U PODLOGAMA S 25 g/L GLICEROLA I RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u Erlenmeyerovim tikvicama s 25 g/L glicerola pri različitim uvjetima pH i koncentracije natrijevog klorida. Uzgoj se provodio na 28 °C na tresilici pri 120 okretaja/min tijekom 120 h. Ovisnost koncentracije supstrata, produkata i biomase o vremenu uzgoja prikazani su na slikama 5 i 6, a rezultati analize parametara uspješnosti prikazani su u tablici 6.

Usporedbom rezultata prikazanih na slici 5 moguće je vidjeti da je najveći prinos biomase pri pH 3,5 imao uzgoj proveden bez dodatka natrijevog klorida koji je prikazan na slici 5A te je iznosio 4,659 g/L. Povećanjem koncentracije natrijevog klorida u podlozi dolazi do smanjenja prinosa biomase (slika 5B i 5C) te je shodno s time najniži prinos biomase zabilježen u podlozi sa 100 g/L NaCl koji je iznosio 3,982 g/L. Rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Koganti i sur. (2011) gdje se pokazalo da povišene koncentracije natrijevog klorida (50 i 100 g/L) imaju negativan utjecaj na rast biomase, ali tek na koncentraciji od 150 g/L NaCl dolazi do značajne inhibicije rasta biomase ovog kvasca. Prema istom istraživanju, primijećeno je da prisutnost čak 50 g/L NaCl značajno smanjuje prinose arabitola. Isto se može primijetiti na slici 5, gdje je najveći prinos arabitola postignut u uvjetima bez dodanog natrijevog klorida (slika 5A) koji je iznosio 1,526 g/L. U podlogama s 50 i 100 g/L NaCl prinos arabitola iznosio je 1,081 i 0,94 g/L, što je otprilike 2/3 vrijednosti za podlogu bez njegovog dodatka.

Slično tome, rezultati uzgoja pri pH 6 prikazani na slici 6, najveći prinos biomase i arabitola postignut je u podlozi bez dodatka NaCl, a vrijednosti se smanjuju povećanjem njegove koncentracije. Najviši prinos biomase iznosio je 4,577 g/L, odnosno prinos arabitola 4,091 g/L. Usporedbom slika 5 i 6, moguće je primijetiti da su, iako slični, prinosi biomasa nešto veći za podloge u kojima je pH 3,5 od onih u kojima je pH 6. Ovi rezultati nisu bili u skladu s istraživanjem koje su proveli Koganti i Ju (2013) gdje su koncentracije biomase nakon provedenog uzgoja bile znatno više za uzgoje pri pH 6 nego pri nižim pH vrijednostima. Ovakvi rezultati bili bi u skladu s time pošto se pH 4,0 – 6,0 smatra optimalnim pH za uzgoj ovog mikroorganizma. Međutim, u spomenutom istraživanju uzgoj je proveden u bioreaktoru s miješalom s automatskim sustavom za doziranje pH te je stoga održavanje pH na jednakoj razini bilo moguće. Za razliku od toga, tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama je moglo doći do zaluženja podloge zbog aktivnosti kvasca *Debaryomyces hansenii* koje bi podlogu s pH vrijednosti 6 stavilo izvan spomenutog optimuma. Ova tvrdnja je potkrijepljena time da uzgoji provedeni na pH 6 pokazuju znatno veći

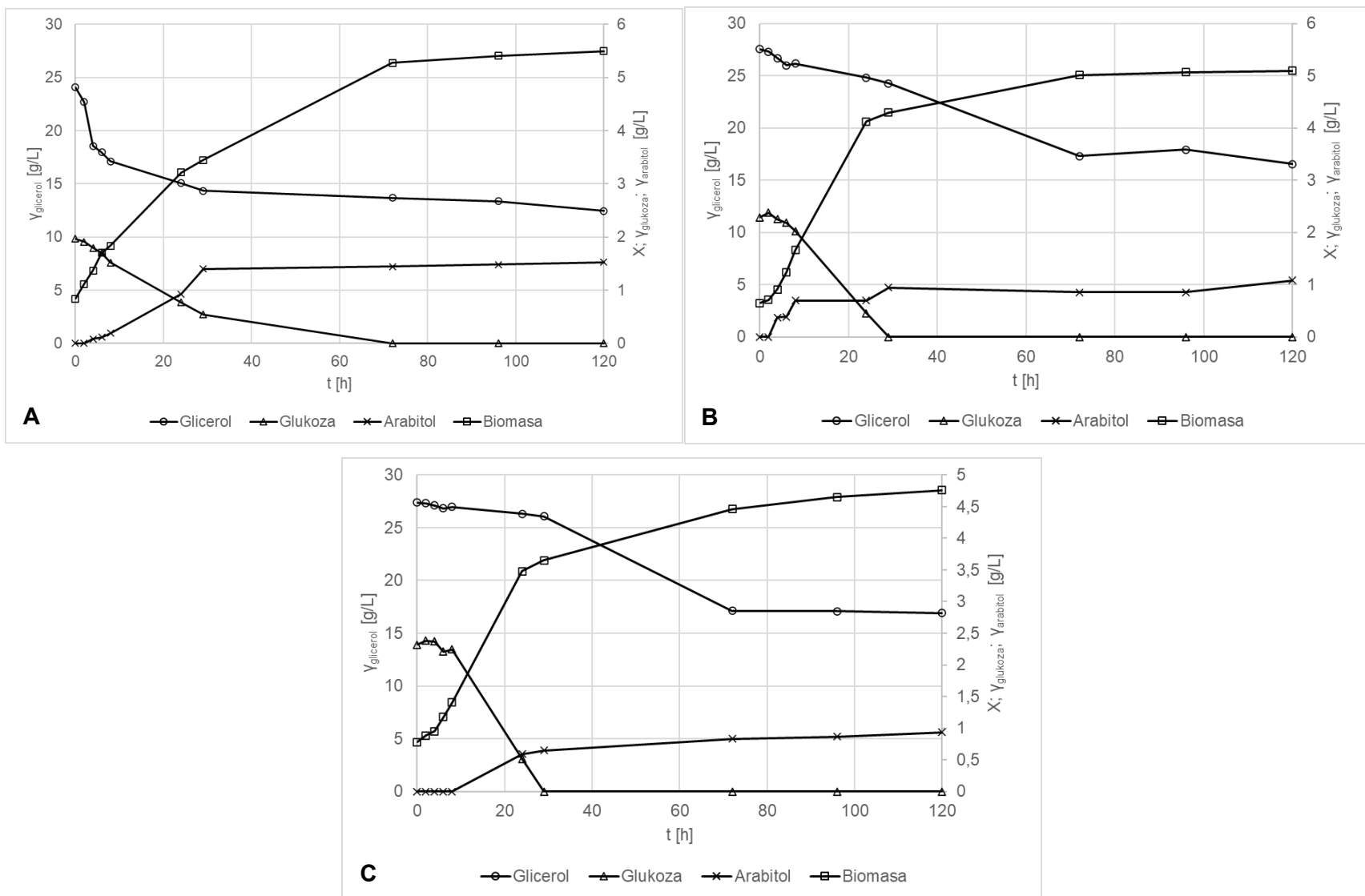
prirast biomase u prvih 8 sati uzgoja nego uzorci s pH vrijednosti 3,5 jer se pH podloga još uvijek nije stigao znatno izmijeniti. Tvrdnju je moguće dodatno potkrijepiti usporedbom s rezultatima dobivenim u istraživanju koje su proveli Al-Qaysi i sur. (2017) gdje je uzgoj ovog kvasca proveden u Erlenmeyerovim tikvicama te rezultati pokazuju jednake trendove rasta pri različitim pH i veće krajnje vrijednosti koncentracije biomase za niže pH nego za više vrijednosti.

Kao što je zaluženje podloge moglo imati utjecaj na prinose biomase, jednako tako je moglo imati utjecaj i na proizvodnju arabitola. Kvasac *Debaryomyces hansenii* arabitol proizvodi u stresnim uvjetima, a zaluženjem podloge koja je inicijalno imala pH 6, kvasce bi se dovelo u takve uvjete. Suprotno tome, zaluženjem podloge koja inicijalno ima pH vrijednost 3,5, ona će biti bliža optimalnim uvjetima za uzgoj biomase ovog mikroorganizma, odnosno stanice više neće biti u stresnim uvjetima. Time je moguće objasniti značajno veće prinose arabitola u uzgojima pri pH 6 nego u onima pri pH 3,5. Niske koncentracije glukoze detektirane UPLC analizom vidljive na slikama 5 i 6 potekle su iz dodanog inokuluma i potrošene za vrijeme prilagodbe kvasca na novu podlogu.

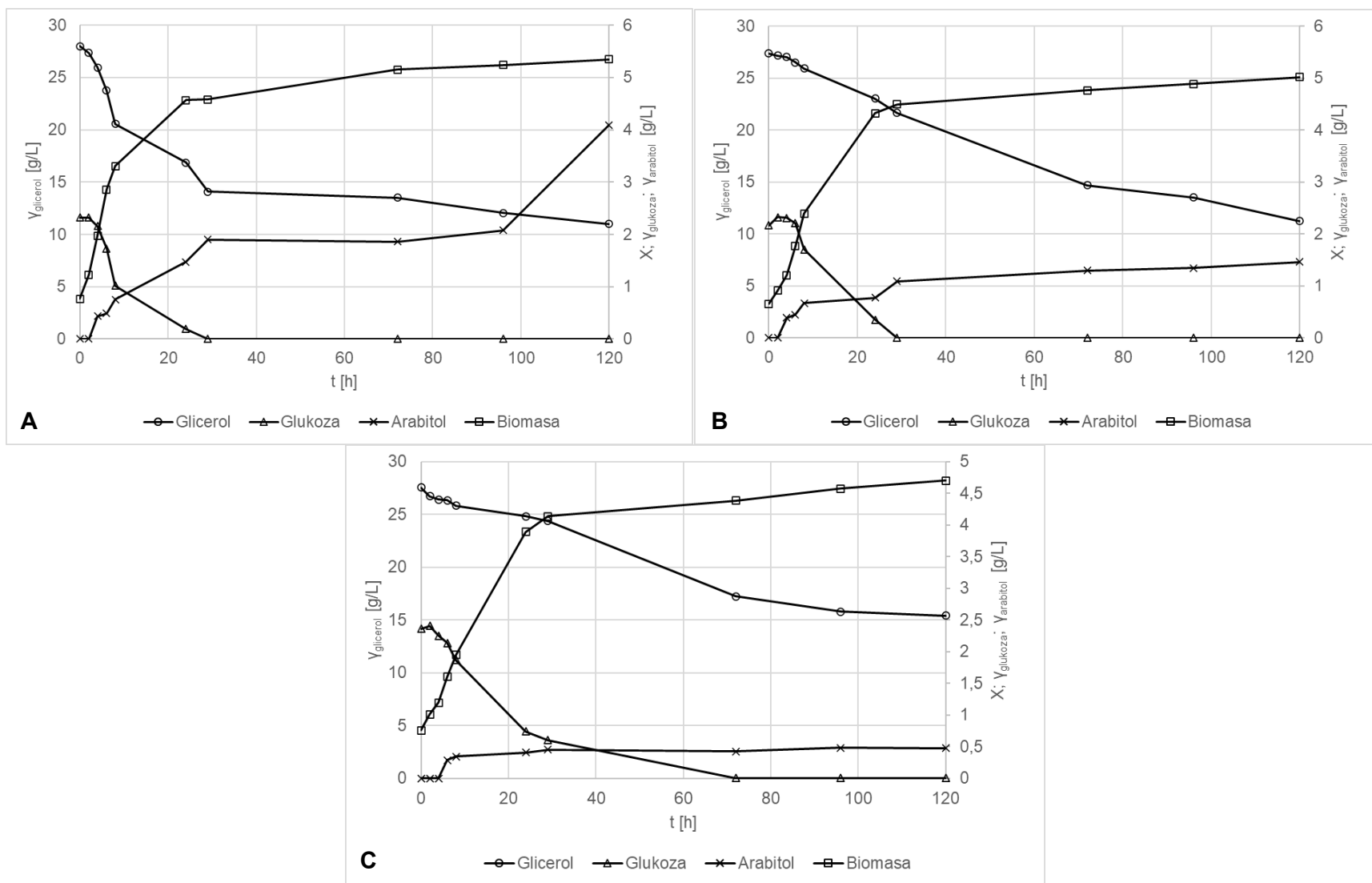
Analizom parametara uspješnosti prikazanih u tablici 6 može se primijetiti da su koeficijenti konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) viši za uzgoje pri pH 3,5 što je sukladno s rezultatima većih prinosa biomase za spomenuti pH. Najveću vrijednost koeficijenta konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) imao je uzgoj pri pH 6 bez dodatka natrijevog klorida te je iznosio 0,241 g/g. Ovaj rezultat značajno odstupa od ostatka uzgoja pri koncentraciji glicerola 25 g/L po količini proizvedenog arabitola te stoga ima i najveću produktivnost koja je iznosila 0,034 g/Lh.

Tablica 6. Parametri uspješnosti uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 s 25 g/L glicerola pri različitim koncentracijama dodanog natrijevog klorida i pH vrijednostima

pH	Y_{NaCl} [g/L]	Y_X [g/L]	ΔS [g/L]	Y_P [g/L]	$Y_{X/S}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
3,5	0	4,659	11,625	1,526	0,401	0,131	0,328	0,013
3,5	50	4,442	11,007	1,081	0,404	0,098	0,243	0,009
3,5	100	3,982	10,463	0,94	0,381	0,089	0,235	0,008
6	0	4,577	17,009	4,091	0,269	0,241	0,894	0,034
6	50	4,365	16,141	1,464	0,270	0,091	0,335	0,012
6	100	3,943	12,143	0,477	0,325	0,039	0,121	0,004



Slika 5. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja pri 25 g/L glicerola; pH vrijednosti **3,5** te **A)** 0 g/L **B)** 50 g/L **C)** 100 g/L natrijevog klorida



Slika 6. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja pri 25 g/L glicerola; pH vrijednosti **6** te **A)** 0 g/L **B)** 50 g/L **C)** 100 g/L natrijevog klorida

4.2. UTJECAJ DODANOG NaCl NA RAST I PROIZVODNJU ARABITOLA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 U PODLOGAMA SA 50 g/L GLICEROLA I RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u Erlenmeyerovim tikvicama s 50 g/L glicerola pri različitim uvjetima pH i koncentracije natrijevog klorida. Uzgoj se provodio na 28 °C na tresilici pri 120 okretaja/min tijekom 120 h. Ovisnost koncentracije supstrata, produkata i biomase o vremenu uzgoja prikazani su na slikama 7 i 8, a rezultati analize parametara uspješnosti procesa prikazani su u tablici 7.

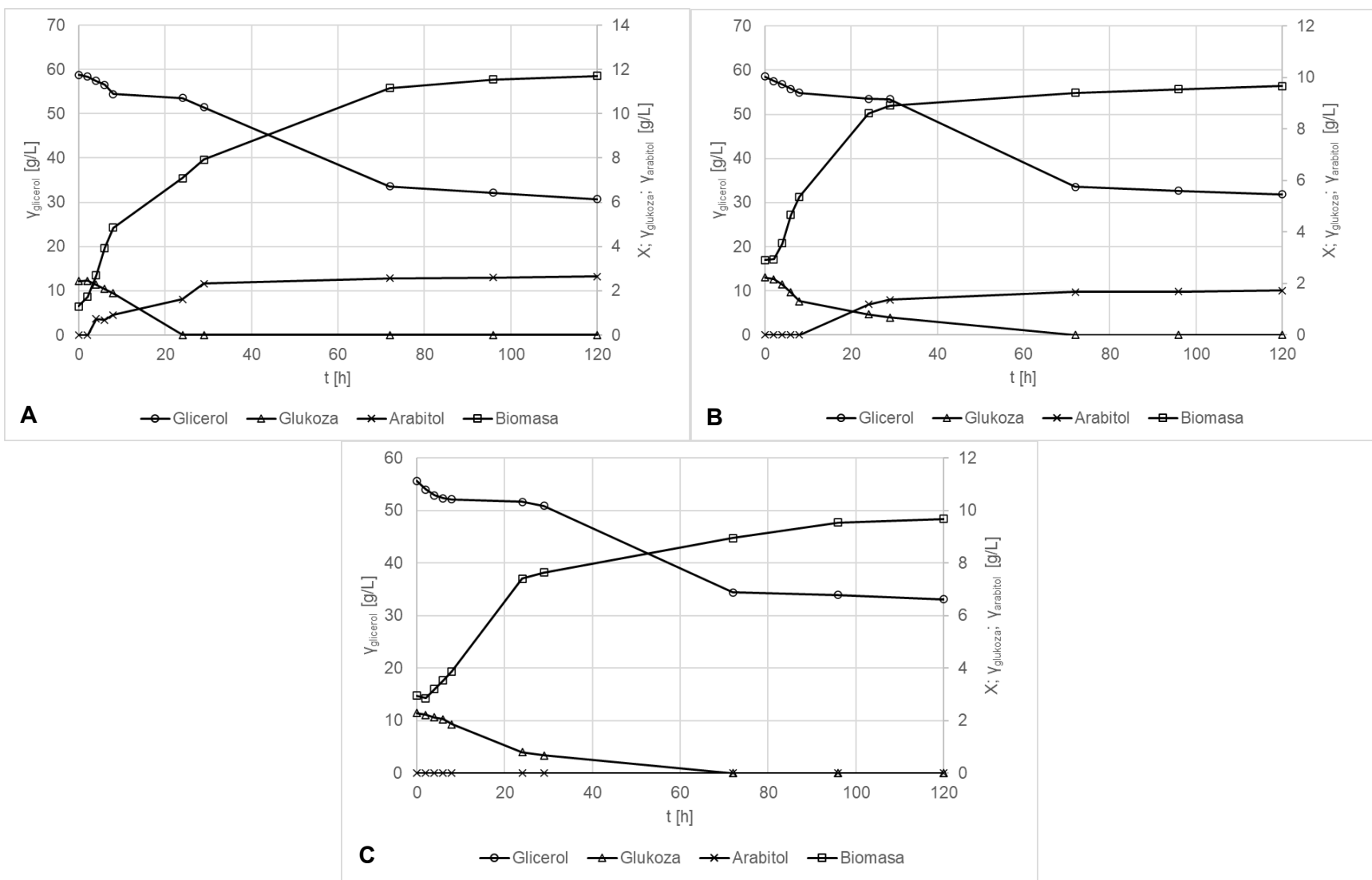
Prema rezultatima prikazanih na slikama 7 i 8 vidljivo je kako prinosi biomase i prinosi proizvedenog arabitola prate trend koji je opisan u prethodnom poglavlju, odnosno s povećanjem koncentracije natrijevog klorida njihove vrijednosti opadaju. Najveći prinosi biomase iznosili su 10,395 g/L pri pH 3,5 bez dodanog natrijevog klorida (slika 7A) ; odnosno 9,729 g/L pri uzgoju na pH 6 također bez dodatka natrijevog klorida (slika 8A). Prema istraživanju koje su proveli Koganti i sur. (2011) pri jednakoj koncentraciji glicerola i pH 6,6 prinos biomase iznosio je približno 14 g/L. Viši prinosi biomase u spomenutom istraživanju u odnosu na dobivene rezultate mogu biti posljedica različite pH vrijednosti, kao i razlike u supstratu, obzirom da su za uzgoj koristili sirovi glicerol (88 % glicerola), dok je u svrhu ovog rada korišten čisti (99 %) glicerol. Niske koncentracije glukoze detektirane UPLC analizom vidljive na slikama 7 i 8 potekle su iz dodanog inokuluma i potrošene za vrijeme prilagodbe kvasca na novu podlogu.

Najveći prinosi arabitola postignuti su u podlogama bez dodanog natrijevog klorida i iznosili su 2,642 g/L pri pH 3,5 (slika 7A) te 4,235 pri pH 6 (slika 8A). Rezultati su u skladu s istraživanjem Koganti i sur. (2011) gdje je postignuti prinos arabitola u podlozi s 50 g/L glicerola i pH 6,6 iznosio 4,5 g/L. Također, na slici 7C, gdje su prikazani rezultati uzgoja pri pH 3,5 i koncentraciji natrijevog klorida 100 g/L, količina proizvedenog arabitola bila je zanemariva.

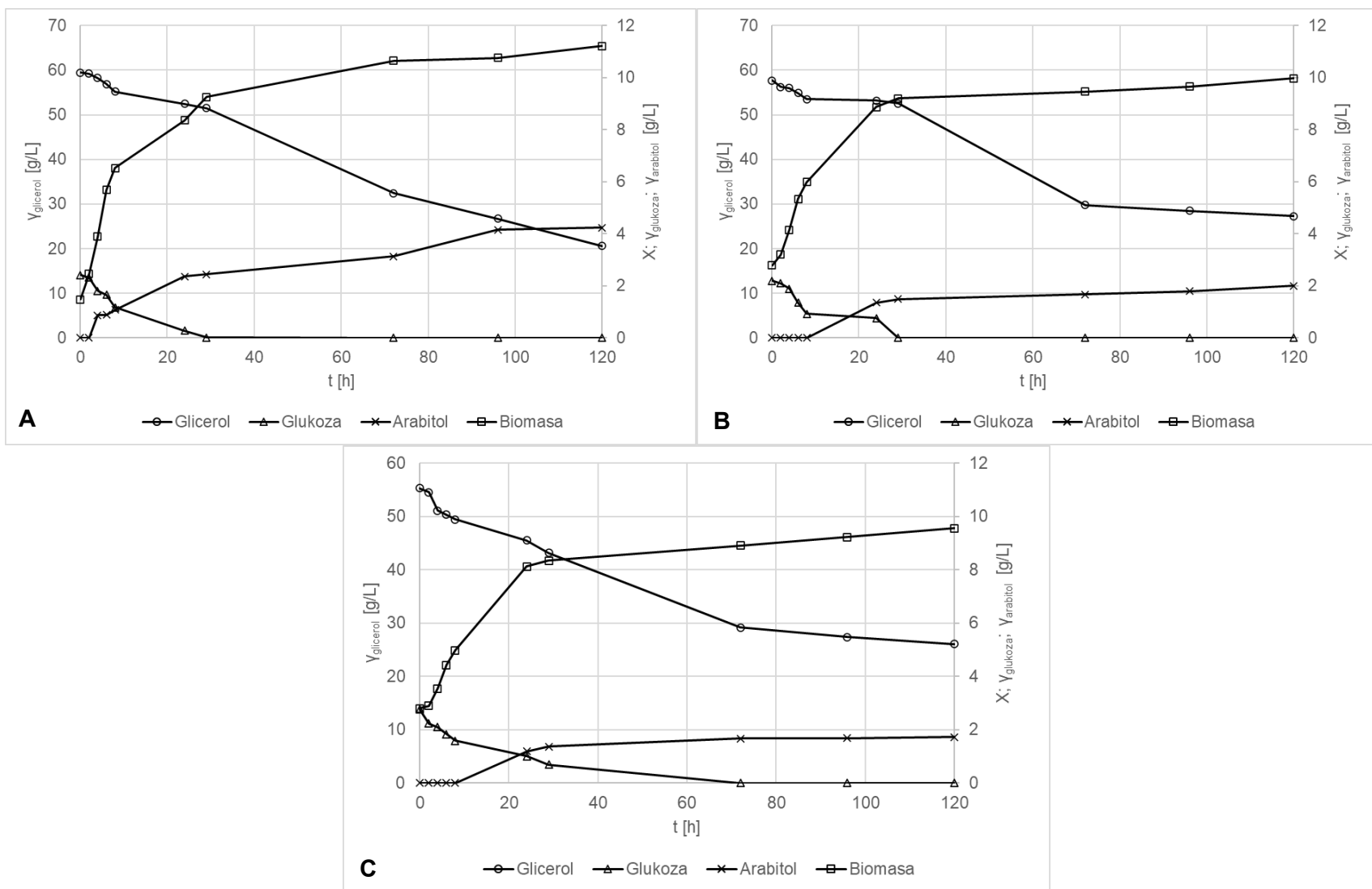
Tablica 7. Parametri uspješnosti uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 s 50 g/L glicerola pri različitim koncentracijama dodanog natrijevog klorida i pH vrijednostima

pH	Y_{NaCl} [g/L]	Y_x [g/L]	ΔS [g/L]	Y_P [g/L]	$Y_{X/S}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
3,5	0	10,395	28,044	2,642	0,371	0,094	0,254	0,022
3,5	50	6,766	26,646	1,721	0,254	0,065	0,254	0,014
3,5	100	6,731	22,567	-	0,298	-	-	-
6	0	9,729	38,865	4,235	0,251	0,109	0,435	0,035
6	50	7,195	30,376	2,006	0,237	0,066	0,279	0,017
6	100	6,757	29,248	1,721	0,231	0,059	0,255	0,014

Prema parametrima uspješnosti uzgoja prikazanih u tablici 7 vidljivo je da su koeficijenti konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) približno jednaki izuzev vrijednosti izračunate za uzorak pri pH 3,5 bez dodatka natrijevog klorida koja iznosi 0,371 g/g. Najveći koeficijent konverzije supstrata u produkt iznosio je 0,109 g/g te je postignut tijekom uzgoja na pH 6 bez dodanog natrijevog klorida. Stoga spomenuti uzorak ima i najveću produktivnost koja iznosi 0,035 g/Lh.



Slika 7. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja pri 50 g/L glicerola; pH vrijednosti **3,5** te **A)** 0 g/L **B)** 50 g/L **C)** 100 g/L natrijevog klorida



Slika 8. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja pri 50 g/L glicerola; pH vrijednosti **6** te **A)** 0 g/L **B)** 50 g/L **C)** 100 g/L natrijevog klorida

4.3. UTJECAJ DODANOG NaCl NA RAST I PROIZVODNJU ARABITOLA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 U PODLOGAMA SA 100 g/L GLICEROLA I RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u Erlenmeyerovim tikvicama sa 100 g/L glicerola pri različitim uvjetima pH i koncentracije natrijevog klorida. Uzgoj se provodio na 28 °C na tresilici pri 120 okretaja/min tijekom 120 h. Ovisnost koncentracije supstrata, produkata i biomase o vremenu uzgoja prikazani su na slikama 9 i 10, a rezultati analize parametara uspješnosti procesa prikazani u tablici 8.

Prema rezultatima prikazanim na slikama 9 i 10 moguće je primijetiti kako prirast biomase pri koncentraciji glicerola 100 g/L slijedi jednaki trend kao i pri ostalim koncentracijama glicerola opisanim u prijašnjim poglavljima, odnosno opada s porastom koncentracije natrijevog klorida te ima veće vrijednosti pri pH 3,5 nego pri pH 6 za jednake koncentracije dodanog NaCl. Najveći prinosi biomase iznosili su 24,654 g/L za pH 3,5 (slika 9A) te 22,734 g/L za pH 6 (slika 10A). Rezultati su u skladu s literaturom; prema istraživanju koje su proveli Loman i Ju (2015), prinos biomase pri uzgoju na 100 g/L glicerola i pH 3,5 iznosio je 22 g/L. Također, prema istraživanju Filippousi i sur. (2022) pri uzgoju na 85 g/L glicerola i pH 6 prinos biomase iznosio je 17,5 g/L. Koganti i sur. (2011) ispitivali su utjecaj različitih koncentracija NaCl na uzgoj kvasca *Debaryomyces hansenii* pri 100 g/L glicerola te su vrijednosti prinosa biomase približno jednake i pri 50 i pri 100 g/L NaCl, a iznosile su približno 17 g/L.

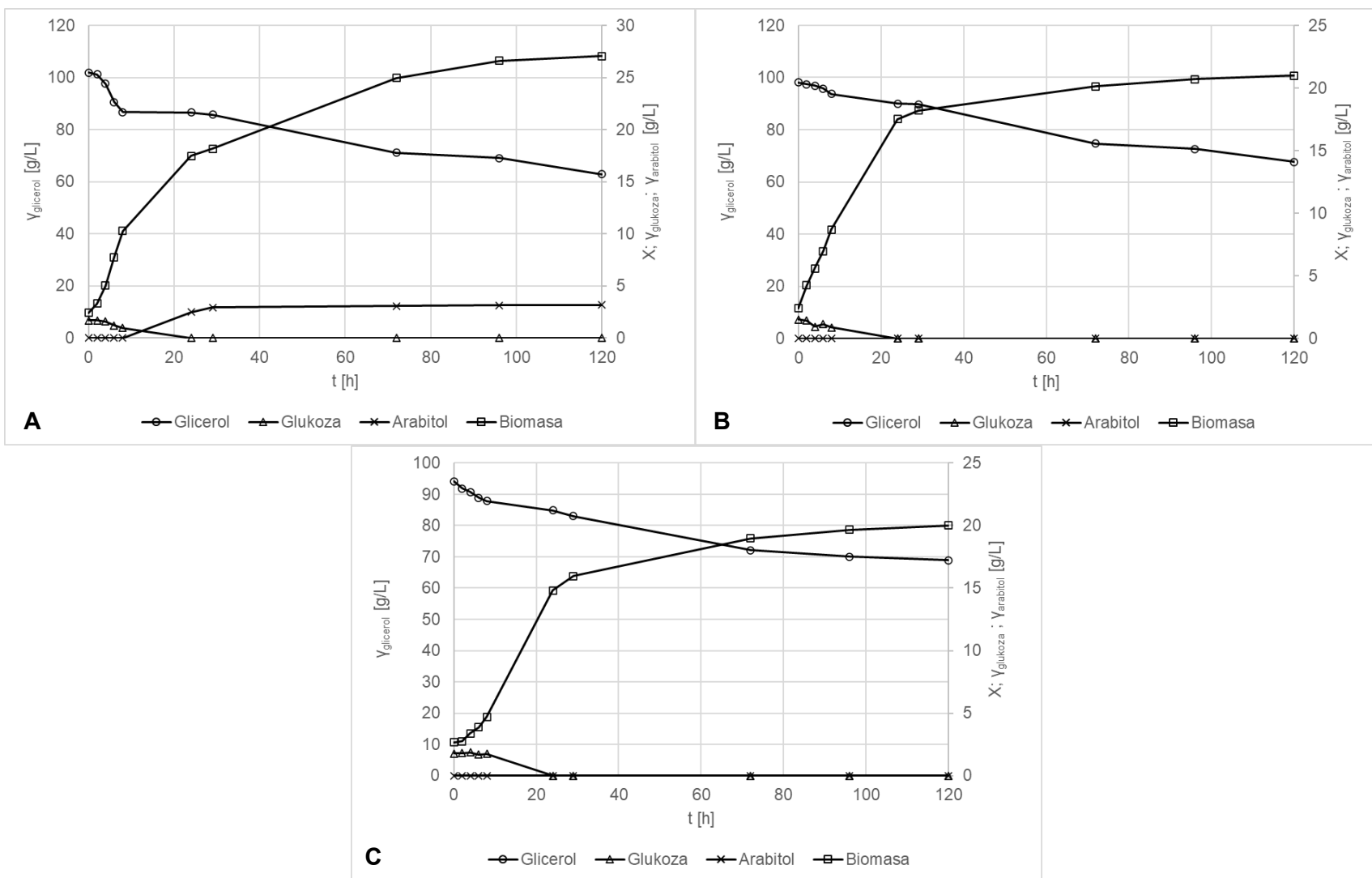
Tijekom uzgoja pri koncentraciji glicerola 100 g/L, arabitol je sintetiziran samo u uzorcima u kojima nije bilo dodatka natrijevog klorida. Vrijednosti prinosa arabitola iznosile su 3,172 g/L za pH 3,5 te 3,591 g/L za pH 6. Dobivene vrijednosti nisu u skladu s literaturom, gdje je prinos arabitola iznosio 48 g/L pri pH 3,5 (Loman i Ju, 2015); 31 g/L pri pH 6 i 85 g/L glicerola (Filippousi i sur., 2022). Zanimljivo je da količine sintetiziranog arabitola u uzgojima s dodatkom natrijevog klorida u skladu su s rezultatima koje su dobili Koganti i sur. (2011), gdje je dodatkom natrijevog klorida prinos arabitola bio manji od 2 g/L u odnosu na prinos arabitola od 12 g/L bez dodatka NaCl. Do ovolikog odstupanja prinosa arabitola u odnosu na ostala istraživanja pri koncentraciji glicerola 100 g/L moglo je doći zbog upotrebe čistog glicerola umjesto sirovog glicerola ili zbog upotrebe drugačijeg soja kvasca *Debaryomyces hansenii* koji je osjetljiviji na povišene koncentracije glicerola i natrijevog klorida. Niske koncentracije glukoze detektirane UPLC analizom vidljive na

slikama 9 i 10 potekle su iz dodanog inokuluma i potrošene za vrijeme prilagodbe kvasca na novu podlogu.

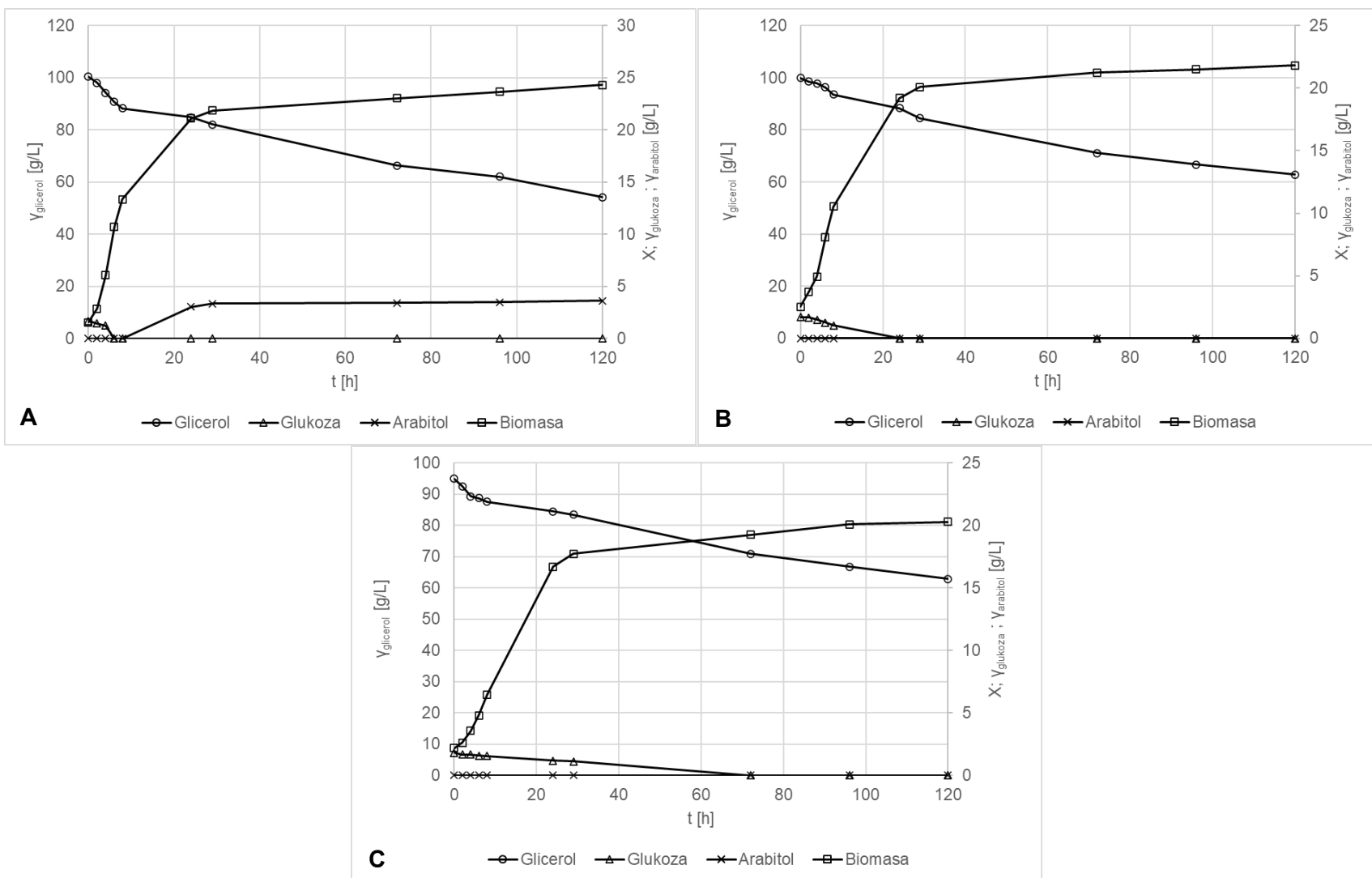
Tablica 8. Parametri uspješnosti uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 sa 100 g/L glicerola pri različitim koncentracijama dodanog natrijevog klorida i pH vrijednostima

pH	Y_{NaCl} [g/L]	Y_x [g/L]	ΔS [g/L]	Y_P [g/L]	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{P/s}$ [g/g]	$Y_{P/x}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
3,5	0	24,654	39,083	3,172	0,631	0,081	0,129	0,026
3,5	50	18,608	30,455	-	0,611	-	-	-
3,5	100	17,36	25,361	-	0,685	-	-	-
6	0	22,734	46,244	3,591	0,492	0,078	0,158	0,03
6	50	19,327	37,096	-	0,521	-	-	-
6	100	18,107	32,116	-	0,564	-	-	-

U tablici 8 prikazani su parametri uspješnosti uzgoja prema kojima je moguće vidjeti da su koeficijenti konverzije supstrata u biomasu za sve uzgoje pri istim pH vrijednostima bili približno slični s najvećom vrijednosti za uzgoj pri pH 6 i koncentraciju natrijevog klorida 100 g/L koja je iznosila 0,685 g/g. Koeficijenti konverzije supstrata u produkt su za vrijednosti gdje količina detektiranog arabitola nije zanemariva bile približno jednake.



Slika 9. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja pri 100 g/L glicerola; pH vrijednosti **3,5** te **A)** 0 g/L **B)** 50 g/L **C)** 100 g/L natrijevog klorida



Slika 10. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja pri 100 g/L glicerola; pH vrijednosti **6** te **A)** 0 g/L **B)** 50 g/L **C)** 100 g/L natrijevog klorida

4.4. UZGOJ KVASCA *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u bioreaktoru s miješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka). Uzgoj je proveden tijekom 96 sati pri temperaturi od 28 °C i broju okretaja miješala koji je iznosio 400 okretaja/min. Uzgoj je proveden u aerobnim uvjetima s protokom zraka od 1 L/h. Podloge su sadržavale 100 g/L glicerola, a natrijev klorid nije bio dodan u podlogu. Ispitivana koncentracija glicerola odabrana je na temelju istraživanja koje su proveli Loman i Ju (2015) te Filippousi i sur. (2022) u kojima je najveći prinos arabitola prilikom uzgoja bio na podlogama sa 100 g/L glicerola. Provedena su dva uzgoja s početnom vrijednosti pH 6. Tijekom prvog uzgoja, pH vrijednost je ostala nepromijenjena (slika 11A); dok je u drugom uzgoju nakon 24 sata uzgoja na pH 6, pH vrijednost promijenjena je na 3,5 (slika 11B). Ovisnost koncentracije supstrata, produkata i biomase o vremenu uzgoja prikazani su na slici 11, a rezultati analize parametara uspješnosti procesa prikazani u tablici 9.

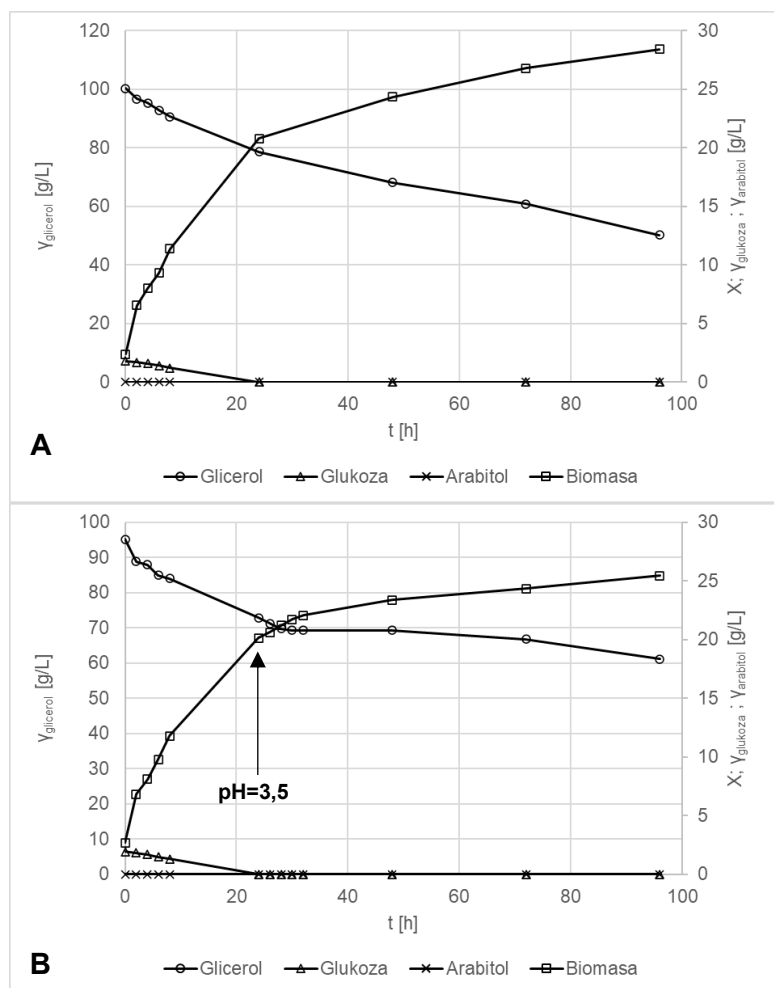
Usporedbom porasta biomasa uzgoja prikazanih na slici 11 vidljivo je da uzgoj koji je kroz cijelo svoje trajanje imao vrijednost pH 6 (slika 11A) ima veće prinose biomase kvasca od uzgoja kod kojeg je pH vrijednost podešena na 3,5 nakon 24 sata uzgoja. Ove vrijednosti prinosa biomase u skladu su s podacima uzgoja kojeg su proveli Koganti i Ju (2013) u bioreaktoru s miješalom pri 110 g/L glicerola i pH 3,5; a prinos biomase je iznosio 22 g/L u usporedbi s prinosom biomase 22,745 dobivenim u ovom radu. Također, dobivenim rezultatima moguće je dodatno potkrijepiti spomenutu tvrdnju o zaluženju podloge zbog aktivnosti ovog kvasca koja je objašnjena u poglavlju 4.1. U slučaju kada je pH vrijednost moguće održavati na konstantnoj vrijednosti zbog automatskog doziranja kiseline ili lužine u podlogu, prinosi biomase veći su u uvjetima gdje je pH 6, nego pri nižim vrijednostima. Na slici 11B moguće je vidjeti da nakon podešavanja pH vrijednosti na 3,5 porast biomase se smanjuje u odnosu na uzgoj proveden pri konstantnoj vrijednosti pH 6 (slika 11A). Niske koncentracije glukoze detektirane UPLC analizom vidljive na slici 11 potekle su iz dodanog inokuluma i potrošene za vrijeme prilagodbe kvasca na novu podlogu.

Iako su očekivane vrijednosti prinosa arabitola u usporedbi s istraživanjem koje su proveli Koganti i Ju (2013) iznosile 35 – 40 g/L, prilikom uzgoja u bioreaktoru s miješalom pri koncentraciji glicerola 100 g/L nije došlo do sinteze arabitola. Razlozi tolikog odstupanja od navedene literature mogli bi biti razlika u sadržaju podloge, razlika u uvjetima aeracije i miješanja te s obzirom da je uzgajan različit soj kvasca *Debaryomyces hansenii*, moguće je da su bili potrebni drugačiji uvjeti uzgoja u svrhu proizvodnje arabitola.

Prema tablici 9, moguće je vidjeti da iako uzgoj pri pH 3,5 ima manji prinos biomase nego uzgoj pri pH 6, ima veći koeficijent konverzije supstrata u biomasu. Mogući razlog ovome je to da su stanice kvasca uzgajane na pH 6 bile u povoljnijim uvjetima nego stanice uzgajane na pH 3,5, što je rezultiralo u većem broju zdravijih stanica koje su koristile više supstrata za održavanje svojih životnih funkcija što se može vidjeti i iz prikazanih vrijednosti potrošnje supstrata (ΔS).

Tablica 9. Parametri uspješnosti uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 u bioreaktoru s miješalom pri **A)** pH 6 0-96 h uzgoja i **B)** pH 6 0 – 24 h uzgoja; pH 3,5 24 – 96 h uzgoja

Uzgoj	Y_X [g/L]	ΔS [g/L]	Y_P [g/L]	$Y_{X/S}$ [g/g]	$Y_{P/S}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
A	26,036	50,15	-	0,519	-	-	-
B	22,745	34,091	-	0,667	-	-	-



Slika 11. Koncentracije supstrata, produkta i biomase kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 tijekom uzgoja u bioreaktoru s miješalom pri **A)** pH 6 0-96 h uzgoja i **B)** pH 6 0-24 h uzgoja; pH 3,5 24-96 h uzgoja

5. ZAKLJUČCI

1. Uzgojem kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 pri različitim koncentracijama glicerola, natrijevog klorida i različitim pH vrijednostima te provedenim analizama utvrđeno je kako ovaj kvasac ima sposobnost sinteze arabitola iz glicerola kao supstrata.
2. U podlogama s 25 g/L glicerola najveći postignuti prinos biomase iznosio je 4,659 g/L, a postignut je u podlozi s pH vrijednosti 3,5 i bez dodanog natrijevog klorida. Najveći prinos arabitola postignut je u podlozi s pH vrijednosti 6 bez dodanog natrijevog klorida te je iznosio 4,091 g/L.
3. U podlogama s 50 g/L glicerola najveći prinos biomase zabilježen je pri pH 3,5 bez dodatka natrijevog klorida u podlogu te je iznosio 10,395 g/L. Najveći prinos arabitola iznosio je 4,235 g/L te je zabilježen pri pH 6 bez dodatka natrijevog klorida. U uzgoju sa 100 g/L natrijevog klorida nije došlo do proizvodnje arabitola.
4. U podlogama s 100 g/L glicerola najveći postignuti prinos biomase iznosio je 24,654 g/L u podlozi s pH 3,5 bez dodanog glicerola, a najveći prinos arabitola iznosio je 3,591 g/L u podlozi s pH vrijednošću 6 bez dodatka natrijevog klorida. U uzgojima s 50 i 100 g/L natrijevog klorida pri obje pH vrijednosti nije došlo do sinteze arabitola.
5. Prilikom oba dva uzgoja u bioreaktoru s miješalom pri drugačijim uvjetima pH nije došlo do sinteze arabitola, razlog ovome su moguće razlike između sojeva kvasca *Debaryomyces hansenii* kao i neadekvatni uvjeti procesa za proizvodnju arabitola pomoću ovoga kvasca
6. Usporedbom rezultata uzgoja kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990 pri različitim uvjetima, moguće je primijetiti kako povećanje koncentracije glicerola i natrijevog klorida ima negativan utjecaj na proizvodnju arabitola. Pri svim koncentracijama glicerola, proizvodnja arabitola je bila veća u uzgojima pri pH 6 nego pri pH 3,5, mogući razlog za ovo je zaluženje podloge zbog aktivnosti kvasca *Debaryomyces hansenii* JCM 1990.
7. Na temelju provedene UPLC analize te usporedbe parametara uspješnosti procesa za sve provedene uzgoje, moguće je vidjeti da je najveći prinos arabitola imala podloga s koncentracijom glicerola 50 g/L, koncentracijom natrijevog klorida 0 g/L te pH vrijednosti 6. Prinos arabitola za ove uvjete iznosio je 4,235 g/L te je shodno s time produktivnost ovog procesa iznosila 0,035 g/Lh.

6. LITERATURA

Al-Qaysi SAS, Al-Haideri H, Thabit ZA, Al-Kubaisy WHAAR, Ibrahim JAAR (2017) Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *Int J Microbiol*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/2605382>

Angulo M, Reyes-Becerril M, Medina-Córdova N, Tovar-Ramírez D, Angulo C (2020) Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Appl Microbiol Biot*, **104**, 7689–7699. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10780-z>

Attarbach T, Kingsley MD, Spallina V (2023) New trends on crude glycerol purification: A review. *Fuel*, **340**, 127485. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127485>

Awuchi CG (2017) Sugar alcohols: chemistry, production, health concerns and nutritional importance of mannitol, sorbitol, xylitol and erythritol. *Int J Adv Acad Res*, **3**, 2488-9849.

Ben ZY, Samsudin H, Yhaya MF (2022) Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch-based films. *Eur Polym J*, **175**, 111377. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111377>

Breuer U, Harms H (2006) *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, **23**, 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>

Chilakamarry CR, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW, Pandey A, Vo DVN (2021) Technological perspectives for utilisation of waste glycerol for the production of biofuels: A review. *Environ Technol Innov*, **24**, 101902. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101902>

Duarah P, Haldar D, Patel AK, Dong CD, Singhania RR, Purkait MK (2022) A review on global perspectives of sustainable development in bioenergy generation. *Bioresource Technol*, **348**, 126791. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126791>

Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I i sur. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature*, **430**, 35–44. <https://doi.org/10.1038/nature02579>

Erian AM, Sauer M (2022) Utilizing yeasts for the conversion of renewable feedstocks to sugar alcohols - a review. *Bioresource Technol*, **346**, 126296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126296>

Filippousi R, Tsouko E, Mordini K, Ladakis D, Koutinas AA, Aggelis G i sur. (2022) Sustainable arabitol production by a newly isolated *Debaryomyces prosopidis* strain cultivated on biodiesel-derived glycerol. *CRC*, **5**, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2022.02.002>

Gasmi Benahmed A, Gasmi A, Arshad M, Shanaida M, Lysiuk R, Peana M i sur. (2020) Health benefits of xylitol. *Appl Microbiol Biot*, **104**, 7225–7237. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10708-7>

Gautam P, Neha, Upadhyay SN, Dubey SK (2020) Bio-methanol as a renewable fuel from waste biomass: Current trends and future perspective. *Fuel*, **273**, 117783. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117783>

Grembecka M (2015) Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur Food Res Technol*, **241**, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2437-7>

Ibrahim OO (2016) Sugar alcohols: Chemical structures, manufacturing, properties and applications. *J Nutr Food Sci*, **6**. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.C1.026>

Kaur J, Sarma AK, Jha MK, Gera P (2020) Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol Reports*, **27**, e.00487. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00487>

Koganti S, Ju LK (2013) *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochem Eng J*, **79**, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.014>

Koganti S, Kuo TM, Kurtzman CP, Smith N, Ju LK (2011) Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biot*, **90**, 257–267. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3015-3>

Kręgiel D, Pawlikowska E, Antolak H (2017) Non-Conventional Yeasts in Fermentation Processes: Potentialities and Limitations. *Old Yeasts - New Questions*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70404>

Lima PJM, Silva RM, Neto CACG, Gomes e Silva NC, Souza JE da S, Nunes YL i sur. (2022) An overview on the conversion of glycerol to value-added industrial products via chemical and biochemical routes. *Biotechnol Appl Biochem*, **69**, 2794–2818. <https://doi.org/10.1002/bab.2098>

Loman A, Ju LK (2014) *Soy-Based Chemicals and Materials*, ACS Publications, SAD, str. 109–126. <https://doi.org/10.1021/bk-2014-1178.ch005>

- Mardawati E, Andoyo R, Muhaemin M, Nurjanah S, Natawigena D, Herwanto T i sur. (2019) Fermentation Process of Glycerol to Arabitol from Byproducts of Reutalis trisperma Biodiesel Using Yeast of *Debaryomyces Hansenii*. *IOP C Ser Earth Env*, **347**, 12132. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/347/1/012132>
- Medina-Córdova N, Rosales-Mendoza S, Hernández-Montiel LG, Angulo C (2018) The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biol Control*, **121**, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.002>
- Mondal A, Giri BK, Roy SK (2023) An integrated sustainable bio-fuel and bio-energy supply chain: A novel approach based on DEMATEL and fuzzy-random robust flexible programming with measure. *Appl Energ*, **343**, 121225. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.121225>
- Monteiro MR, Kugelmeier CL, Pinheiro RS, Batalha MO, da Silva César A (2018) Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renew Sust Energ Rev*, **88**, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>
- Msomi NZ, Erukainure OL, Islam MS (2021) Suitability of Sugar Alcohols as Antidiabetic Supplements: A Review. *J Food Drug Anal*, **29**, 1–14. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3107>
- Mukherjee V, Radecka D, Aerts G, Verstrepen KJ, Lievens B, Thevelein JM (2017) Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels*, **10**, 216. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0899-5>
- Navarrete C, Estrada M, Martínez JL (2022) *Debaryomyces hansenii*: an old acquaintance for a fresh start in the era of green biotechnology. *World J Microb Biot*, **38**, 99. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03280-x>
- Navarrete C, Frost AT, Ramos-Moreno L, Krum MR, Martínez JL (2021) A physiological characterization in controlled bioreactors reveals a novel survival strategy for *Debaryomyces hansenii* at high salinity. *Yeast*, **38**, 302–315. <https://doi.org/10.1002/yea.3544>
- Padilla B, Gil JV, Manzanares P (2016) Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front Microbiol*, **7**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Prista C, Michán C, Miranda IM, Ramos J (2016) The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, **33**, 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>

- Ravikumar Y, Razack SA, Ponpandian LN, Zhang G, Yun J, Huang J i sur. (2022) Microbial hosts for production of D-arabitol: Current state-of-art and future prospects. *Trends Food Sci Tech*, **120**, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.029>
- Saraiva A, Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Raposo A (2020) Maltitol: Analytical Determination Methods, Applications in the Food Industry, Metabolism and Health Impacts. *Int J Environ Res Pub He*, **17**, 5227. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145227>
- Schwengber CA, Alves HJ, Schaffner RA, da Silva FA, Sequinel R, Bach VR i sur. (2016) Overview of glycerol reforming for hydrogen production. *Renew Sust Energ Rev*, **58**, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.279>
- Spandagos C (2024) *Advances in Biofuels Production, Optimization and Applications*, Elsevier, Nizozemska, str. 269–283. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95076-3.00003-X>
- Takamura K, Fischer H, Morrow NR (2012) Physical properties of aqueous glycerol solutions. *J Petrol Sci Eng*, **98**, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2012.09.003>
- Zhang G, Lin Y, He P, Li L, Wang Q, Ma Y (2014) Characterization of the sugar alcohol-producing yeast *Pichia anomala*. *J Ind Microbiol and Biot*, **41**, 41–48. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1364-5>
- Zhang J, Zhang X (2019) *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy*, Elsevier, Nizozemska, str. 327–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00015-1>
- Zhang W, Chen J, Chen Q, Wu H, Mu, W (2020) Sugar alcohols derived from lactose: lactitol, galactitol, and sorbitol. *Appl Microbiol Biot*, **104**, 9487–9495. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10929-w>
- Zheng S, Jiang B, Zhang T, Chen J (2020) Combined mutagenesis and metabolic regulation to enhance arabitol production from *Candida parapsilosis*. *J Ind Microbiol Biot*, **47**, 425–435. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02278-4>

7. PRILOZI

7.1. Jednadžbe baždarnih pravaca spojeva detektiranih pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tablica 10. Retencijska vremena i baždarni pravci (UPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme t_r (min)	Jednadžba	R^2
Arabitol	6,7	$A=148049y_{arabitol}-6460,5$	0,9965
Glicerol	9,5	$A=167859y_{glicerol}-15137$	0,9991
Glukoza	4,815	$A=140472y_{glukoza}-604,84$	0,9999

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Toni Vlahović

Vlastoručni potpis