

# Utjecaj inhibitora na rast nekih ne-Saccharomyces kvasaca

---

**Kašnar, Klara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:159:506111>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Klara Kašnar**

7688/BT

**Utjecaj inhibitora na rast nekih ne-*Saccharomyces*  
kvasaca**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biokemijsko inženjerstvo

**Mentor:** Doc. dr. sc. Mladen Pavlečić

**Zagreb, 2020**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Sveučilište u Zagrebu**

**Diplomski rad**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

### **UTJECAJ INHIBITORA NA RAST NEKIH ne-*Saccharomyces* KVASACA**

Klara Kašnar, 58213714

**Sažetak:** Kako bi se povećao prinos i efikasnost u postupcima proizvodnje bioetanola, sve se više istražuju potencijali i mogućnosti primjene ne-*Saccharomyces* kvasaca koji, za razliku od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, osim heksoza, mogu fermentirati i pentoze. Pentoze čine značajan udio u hemicelulozi koja se uz celulozu i lignin oslobađa korištenjem različitih metoda predobradbe lignoceluloznih sirovina. Također, u postupcima predobradbe nastaju i spojevi koji mogu negativno utjecati na proizvodni mikroorganizam ali i cijeli bioproc. U ovom radu navedena su istraživanja utjecaja takvih inhibitornih spojeva na neke ne-*Saccharomyces* kvasce kao što su *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia (Sheffersomyces) stipitis*, *Pachysolen tannophilus* i *Candida (Sheffersomyces) shehatae* koji predstavljaju alternativu u proizvodnji bioetanola tradicionalno korištenom kvascu *S. cerevisiae*.

**Ključne riječi:** bioetanol, inhibitori, lignocelulozne sirovine, ne-*Saccharomyces* kvasci

**Rad sadrži:** 21 stranicu, 1 sliku, 46 literaturnih referenci

**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:** doc. dr.sc Mladen Pavlečić

**Datum obrane:** 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Bachelor thesis

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and  
Brewing Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **Inhibitor effect on the growth of some non-*Saccharomyces* yeast**

Klara Kašnar, 58213714

**Abstract:** In order to increase the yield and efficiency in bioethanol production processes, the potentials and possibilities of application of non-*Saccharomyces* yeast are being investigated, which, unlike the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, can ferment pentoses in addition to hexoses. Pentoses make up a significant share of hemicellulose which, along with cellulose and lignin is released when different pretreatment methods are being used. Also, during the pretreatment processes compounds that can negatively affect the working microorganism and the whole bioprocess are being formed. This paper summarizes investigations of such inhibitory compounds and their influence on some non-*Saccharomyces* yeasts such as *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia (Sheffersomyces) stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Candida (Sheffersomyces) shehatae* which represent an alternative in the traditional production of bioethanol where yeast *S. cerevisiae* is used.

**Keywords:** bioethanol, inhibitors, lignocellulosic feedstock, non-*Saccharomyces* yeasts

**Thesis contains:** 21 pages, 1 figure, 46 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** asst.prof. Mladen Pavlečić

**Defence date:** 2020

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Lignocelulozne sirovine .....	2
2.1.1. Celuloza.....	3
2.1.2. Hemiceluloza .....	3
2.1.3. Lignin .....	4
2.2. Predtretmani lignoceluloznih sirovina .....	4
2.2.1. Fizikalni predtretmani .....	5
2.2.2. Fizikalno-kemijski predtretmani .....	5
2.2.3. Kemijski predtretmani.....	6
2.2.4. Biološki predtretmani.....	8
2.3. Inhibitori.....	9
2.3.1. Derivati slabih kiselina .....	9
2.3.2. Furani .....	10
2.3.3. Fenoli.....	11
2.3.4. Sinergijsko djelovanje inhibitora .....	11
2.4. Kvasci koji se koriste u biotehnološkim postupcima proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina.....	12
2.4.1. Kvasci roda <i>Kluyveromyces</i> .....	13
2.4.2. <i>Pichia stipitis</i> .....	13
2.4.3. <i>Candida shehatae</i> .....	13
2.4.4. <i>Pachysolen tannophilus</i> .....	13
2.5. Utjecaj inhibitora na ne- <i>Saccharomyces</i> kvasce.....	14
3. ZAKLJUČCI .....	20

# 1. UVOD

Zbog brojnih nedostataka fosilnih goriva, prvenstveno zbog utjecaja na okoliš i njihove ograničene dostupnosti, nastoji im se pronaći alternativa sa naglaskom na održivu proizvodnju. Ta nova, ekološki prihvatljiva goriva nazivamo biogorivima a najpoznatija su etanol, butanol te biodizel. Od svih navedenih, trenutno najveću proizvodnju bilježi bioetanol. Razlika između fosilnih i biogoriva jest i ta da se u njihovoj proizvodnji koriste mikroorganizmi, različitih svojstava i karakteristika, a sve u svrhu postizanja većih iskorištenja i efikasnosti bioprocasa. Sirovinska osnova u biotehnološkom postupku proizvodnje etanola je raznolika. Problem je da su neke sirovine, kao recimo kukuruz ili šećerna trska, značajne kulture i u proizvodnji ovog alkohola, ali su i bitne poljoprivredne kulture koje se koriste u ljudskoj prehrani. Zbog te činjenice i zbog činjenice da su cijene energenata često nestabilne na svjetskim tržištima zbog naglih promjena u ponudi i potražnji, biogoriva postaju sve zanimljivija zbog činjenice da je u njihovoj proizvodnji moguće koristiti lignocelulozne sirovine. Lignoceluloza predstavlja veliki potencijal u razvoju održivih i ekološki prihvatljivih postupaka proizvodnje, međutim, bitno je napomenuti da ona nije optimalna sirovina s obzirom da je potrebno provesti postupak predtretmana da ju radni mikroorganizam uopće može koristiti kao izvor ugljika. Cilj takvih postupaka jest dobiti što veći udio fermentabilnih šećera a što manji udio neželjenih nusprodukata što često nije slučaj. Nažalost, prilikom predobradbe, uz fermentabilne šećere nastaju i inhibitori koji negativno utječu na enzimsku hidrolizu i proces fermentacije. Da bi se povećao prinos i efikasnost u ovakvim postupcima, sve se više istražuju mogućnosti primjene ne-*Saccharomyces* kvasaca koji uz heksoze mogu fermentirati i pentoze koji čine značajan udio fermentabilnih šećera. U ovom radu navedena su istraživanja utjecaja različitih inhibitora, koji nastaju kao nusprodukti u procesima predtretmana lignoceluloznih sirovina, na neke ne-*Saccharomyces* kvasce kao što su *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia (Sheffersomyces) stipitis*, *Pachysolen tannophilus* i *Candida (Sheffersomyces) shehatae* koji su pokazali potencijal u proizvodnji bioetanola.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine su obnovljive sirovine i moguće ih je koristiti za proizvodnju biogoriva, biokemikalija i biopolimera. Biogoriva nastala iz ovakvih sirovina predstavljaju alternativu fosilnim gorivima te mogu pridonijeti razvoju održivih rješenja uz manji stupanj onečišćenja okoliša (Jönsson i sur., 2013).

Lignocelulozne sirovine u su otpadni i neiskorišteni ostaci iz poljoprivredne industrije, drvne industrije i industrije proizvodnje papira. Ove sirovine mogu znatno pridonijeti svjetskoj energetskoj opskrbi bez rizika onečišćenja okoliša (Sarkar i sur., 2011).

Glavni izvor fermentabilnih šećera iz lignoceluloznih sirovina je stanična stjenka koja se sastoji od tri glavne komponente: celuloza, hemiceluloza i lignin. Njihova zastupljenost u različitim sirovinama može varirati (celuloza 36-61 %, hemiceluloza 13-39 % i lignin 6-29 % u s. tv.) (Guierro i sur., 2015).

S biotehnološkog stajališta, celuloza i hemiceluloza predstavljaju najvrjedniji dio s obzirom da sadrže fermentabilne šećere (heksoze i pentoze) koji u mikrobnj fermentaciji služe ako izvor ugljika. Celuloza je građena isključivo od glukoza jedinica, a može biti u kristaličnom ili amorfnom obliku. Hemiceluloza je građena i od heksoza i pentoza i razgranatnije je strukture pa ju je lakše hidrolizirati. U usporedbi sa drugim sirovinama, lignocelulozne je općenito teže hidrolizirati i predobradba je kompleksnija; drvenu biomasu je najteže hidrolizirati, a sirovine kao što je zimzeleno drveće teže je hidrolizirati nego listopadno drveće ili poljoprivredne ostatke (Viikari i sur., 2012).

Metode koje se koriste u postupku predobradbe mogu se podijeliti na kemijske, fizikalne i biološke, a provode se u cilju povećanja dostupnosti celuloze i hemiceluloze za enzimsku hidrolizu. Ovim metodama, osim povećanja dostupnosti, može doći i do djelomične razgradnje hemiceluloze na sastavne jedinice. Ono što predstavlja problem kod takvih postupaka jest nastanak inhibitora kao što su alifatske kiseline (octena, mravlja i levulinska) te furan-aldehida (furfural i 5-HMF). Na kraju predobradbe zaostaje lignin kao čvrsti ostatak, iako se mali dio može razgraditi u fenolne i aromatične spojeve (Sarkar i sur., 2012).

### 2.1.1. Celuloza

Celuloza predstavlja linearni polisaharid glukoze u kojem su jedinice glukoze povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama pri čemu glukozne jedinice formiraju dugačke makromolekule, mikrofibrile. Linearnost bez bočnih lanaca omogućava lancima celuloze da se usko pakiraju pomoću Van der Waalsovih sila i vodikovih veza što čini njezinu strukturu kristaličnom ili na nekim dijelovima amorfnom što značajno utječe na njenu hidrolizu (Perez i sur., 2002)

Da bi se iz celuloze dobili fermentabilni šećeri, molekule glukoze, celulozu je potrebno povrgnuti djelovanju celulolitičkih enzima. Enzimi koji se koriste u tom slučaju nazivaju se celulaze, a prema vezi koju cijepaju dijele se na endo-1,4-betaglukanaze, egzo-1,4-betaglukanaze,  $\beta$ -glukozidaze i celobiohidrolaze. Egzo-1,4-betaglukanaze hidroliziraju reducirajuće i nereducirajuće krajeve lanaca celuloze, a endo-1,4-betaglukanaze hidroliziraju na glikozidnim vezama unutar lanca. Veći udio amornog oblika celuloze povećava dostupnost vezanih glukoznih jedinica i efikasnost enzima (Saha, 2004).

### 2.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je također kompleksan ugljikohidratni polimer građen od pentoznih i heksoznih jedinica, međutim manje molekulske mase nego celuloza. Sastoji se od D-ksiloze, D-manoze, D-galaktoze, L-arabinoze te 4-o-glukoronične kiseline, D-glukoronske kiseline i D-galaktonske kiseline. Šećeri su u molekuli hemiceluloze povezani  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama, a rjeđe  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama. Glavna razlika između celuloze i hemiceluloze jest činjenica da hemiceluloza ima razgranatu strukturu za razliku od celuloze koja ima linearnu te je zbog toga hemicelulozu lakše hidrolizirati.

Pošto hidrolizat hemiceluloze sadrži značajan udio ksiloze (pentoza), koju neki mikroorganizmi koji se tradicionalno koriste u proizvodnji etanola ne mogu koristiti, istraživanja idu u smjeru pronalaska drugih potencijalnih mikroorganizama koji bi ih mogli zamijeniti. Problem s hidrolizom hemiceluloze jest i taj da tijekom ovog postupka mogu nastati slabe kiseline i furanski spojevi koji onda mogu negativno utjecati na rasta stanica i postupak fermentacije (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996).

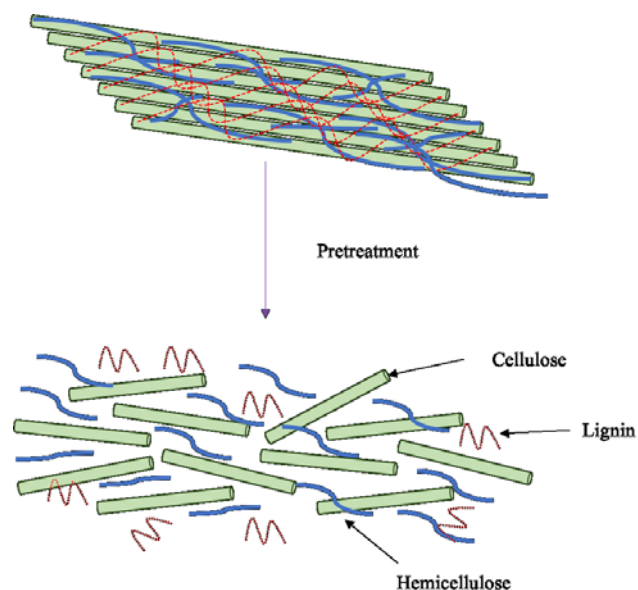


### 2.1.3. Lignin

Lignin je, uz celulozu, jedan od najčvršćih polimera u prirodi, a omogućava strukturnu potporu, nepropusnost i otpornost lignoceluloznih sirovina. Po strukturi je amorfni heteropolimer, nije topiv u vodi i ne pokazuje optičku aktivnost. Građen je od fenilpropanskih jedinica. Struktura lignina vrlo je kompleksna jer su fenilpropanski alkoholi povezani višestrukim vezama u trodimenzionalne strukture koje čine jedinice lignina. Najčešći fenilpropanski alkoholi su guaicil propanol, p-hidroksifenil propanol i siringil propanol. Ovi fenilpropanski alkoholi spadaju u aromatske alkohole, monolignole te se mogu pronaći u raznim vrstama lignoceluloznih sirovina u različitim omjerima. Polimerizacija ovih monolignola počinje oksidacijom hidroksilnih grupa, a nastavlja se dimerizacijom putem enzimske dehidrogenacije gdje se jedinice formiraju u slobodne radikale i spajaju u dimere. Iz ovoga može nastati ili linearan ili razgranat obliku, ovisno o prisutnosti molekule vode koja nukleofilnim napadom mijenja smjer polimerizacije. Ovisno o koncentraciji vode i količini pojedinih monolignola, koji se nalaze u različitim omjerima u raznim vrstama lignoceluloznih sirovina, struktura i količina lignina varira među vrstama (Perez i sur., 2002). Da bi se takva struktura mogla razgraditi, potrebno je koristiti različite enzime kao recimo hidrolaze i oksidaze. Moguća je biološka razgradnja lignina jer neke gljive posjeduju ove enzime (*Phanerochaete chrysosporium*) što im omogućuje korištenje lignoceluloze kao supstrata. Predtretmanom lignoceluloze iz lignina mogu nastati spojevi kao kresoli, kateholi, kvinoni i vanilin koji također imaju inhibitorno djelovanje na mikroorganizme koji se koriste za fermentacije (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996).

### 2.2. Predtretmani lignoceluloznih sirovina

Metode koje se koriste u postupku predobradbe lignoceluloznih sirovina mogu se podijeliti u 3 skupine; kemijske, fizikalne i biološke, a provode se u cilju povećanja dostupnosti celuloze i hemiceluloze za enzimsku hidrolizu. Bitno je napomenuti da se gotovo nikada ne koristi samo jedan postupak odnosno metoda predtretmana već kombinacija nekoliko metoda što znatno ovisi o samoj sirovini. Također, teži se ka odabiru postupaka koji u konačnici daju što manju količinu inhibitora i koji su najekonomičniji.



**Slika 1:** Prikaz utjecaja predtretmana na lignocelulozne sirovine (Latif i sur., 2018)

### 2.2.1. Fizikalni predtretmani

U fizikalne predtretmane spadaju: mljevenje, piroliza, zračenje ( $\gamma$ -zrake i mikrovalovi) i ultrazvuk. Ove metode omogućuju povećanje površine i poroznost lignocelulozne sirovine, te smanjenje kristaličnosti celuloze. Glavni nedostaci fizikalnih metoda su slabo odvajanje lignina te veliki utrošak energije (Brodeur i sur., 2011).

### 2.2.2. Fizikalno-kemijski predtretmani

Ovi postupci uključuju eksploziju vodenom parom (autohidroliza), eksploziju u atmosferi  $\text{SO}_2$  ili  $\text{CO}_2$ , eksplozija u tekućem amonijaku (AFEX) i predobradbu vrućom vodom (LHW).

Za primjer, eksplozija vlakana vodenom parom je proces izlaganja sirovine pari. U ovoj metodi samljevena sirovina je izložena vlažnoj pari pri visokom tlaku, a potom se tlak snižava što uzrokuje eksplozivnu dekompresiju materijala. Početna temperatura je od 160 do 260°C, početni tlak je 0,7 do 4,8 MPa. Sirovina može biti izložena ovim uvjetima od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, ovisno o ekstremnosti postavljenih uvjeta. Nakon određenog vremena, tlak se snižava na atmosferski (Brodeur i sur., 2011).

Metoda eksplozije u  $\text{CO}_2$  provodi se izlaganjem sirovine visokom tlaku i temperaturi te naglom snižavanju tlaka što uzrokuje eksplozivnu dekompresiju. Temelji se na metodi autohidrolize, a dodavanje  $\text{CO}_2$  omogućuje stvaranje karboksilnih kiselina koje ubrzavaju proces. Ova metoda

za razliku od autohidrolize ne proizvodi inhibitore, ali može uzrokovati koroziju postrojenja zbog nastalih kiselina (Bensah i Mensah, 2013).

Metoda eksplozije u SO<sub>2</sub> također se provodi izlaganjem sirovine visokom tlaku i temperaturi te naglom snižavanju tlaka. Prisutnost SO<sub>2</sub> omogućuje stvaranje kisele okoline što olakšava postupak hidrolize. Ovom metodom ubrzava se hidroliza lignoceluloze pri čemu nastaje značajno manji udio inhibitornih spojeva (Carrasco i sur., 2009).

AFEX (eksplozija vlakana amonijakom) predstavlja fizikalno-kemijski predtretman u kojem su lignocelulozne sirovine izložene tekućem amonijaku pri visokoj temperaturi i tlaku te nakon određenog vremena i naglom padu tlaka. U AFEX procesu doza tekućeg amonijaka je 1-2 kg po masi suhe tvari, temperatura postupka je 90°C, a vrijeme izloženosti ekstremnim uvjetima 30 minuta. AFEX predtretman, za razliku od autohidrolize, može značajno povećati razinu saharifikacije, ali ne otapa hemicelulozne šećere. Ovaj proces nije efektivan kod sirovina koje imaju visoki udio lignina u suhoj tvari (Taherzadeh i Karimi, 2008).

LHW (liquid hot water) ili hidrotermalno procesiranje je metoda predtretmana gdje se voda u tekućem ili plinovitom stanju koristi za predtretman lignocelulozne biomase. Ova metoda je relativno blaga i ne zahtijeva katalizatore niti uzrokuje probleme s korozijom (Agbor i sur., 2011).

### **2.2.3. Kemijski predtretmani**

Neke od metoda koje spadaju u ovu skupinu su predtretman kiselinom ili lužinom, zatim predtretman ionskim tekućinama, ozonoliza, organosolv proces, vlažna oksidacija, NMMO predtretman i predtretman alkalnim peroksidom. Ovakvom vrstom predtretmana postiže se povećanje površine i poroznost lignoceluloznih sirovina uz smanjenje stupnja polimerizacije te djelomičnu ili potpunu hidrolizu hemiceluloze i djelomično odvajanje lignina. Glavna prednost ovih metoda su njihova efikasnost i učinkovitost. S druge strane, njihovo korištenje često uključuje upotrebu agresivnih kemikalija što može negativno utjecati na procesnu opremu (Brodeur i sur., 2011).

Kada se koriste kiseline najčešće se koriste klorovodična i sumporna. One omogućavaju visok stupanj hidrolize celuloze, ali osim što su toksične i korozivne, uzrokuju nastajanje inhibitora i zahtijevaju korištenje posebne opreme. Zbog smanjenja negativnog utjecaja korozivnog djelovanja kiselina, preferira se izvođenje procesa hidrolize s razrijeđenim kiselinama, ali u kombinaciji sa višim temperaturama (Sun i Cheng, 2002).

Mehanizam alkalne hidrolize uključuje saponifikaciju poprečnih unutarmolekulskih esterskih veza koje povezuju ksilan sa drugim komponentama sirovine kao što je lignin. Najčešće korištene lužine su natrijev, kalijev, kalcijev hidroksid i amonijak. U slučaju korištenja amonijaka dolazi i do delignifikacije (Jönsson i Martín, 2016).

Za razliku od prethodno navedenih kemijskih predtretmana, za organosolv proces se koriste organska otapala. Smjesom organskih otapala i anorganskih kiselinskih katalizatora (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dolazi do pucanja unutarmolekulskih veza između hemiceluloze i lignina što dovodi do njihovog razdvajanja. Najčešće korištena otapala su metanol, etanol, aceton, etilen-glikol, trietilen-glikol te tetrahidrofurfuril alkohol, a od organskih kiselina oksalna, acetilsalicilna i salicilna. I u ovom slučaju može doći do nastanka inhibitora koji negativno utječu na proces enzimske hidrolize i na fermentaciju (Sun i Cheng, 2002).

Vlažna oksidacija sirovina uključuje tretiranje sirovine vodom uz prisutnost zraka ili kisika pri temperaturama većim od 120°C pri čemu se hemiceluloza djelomično otopi, a u konačnici nastaju šećerni oligomeri (N. Sarkar i sur., 2012). Ovim postupkom omogućeno je fragmentiranje lignina i njegova oksidacija do alifatskih karboksilnih kiselina i fenolnih spojeva (Jönsson i Martín, 2015).

Nadalje, postupak ozonolize uključuje korištenje ozona u svrhu razgradnje lignina i odvajanja hemiceluloze. U ovom slučaju lignin se u potpunosti razgrađuje pri čemu ne dolazi do negativnog utjecaja na celulozu. S obzirom da je postupak moguće voditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku formacija inhibitora je vrlo mala u usporedbi s nekim drugim postupcima. U nekim eksperimentima rađene su i kombinacije dvaju različitih postupaka (Bensah i Mensah, 2013) te su dobivena bolja iskorištenja od pojedinačnih. Glavni nedostatak ozonolize su količina ozona koji se treba koristiti te njegova cijena (Sun i Cheng, 2002).

Korištenje ionskih tekućina u svrhu predtretmana pokazuje dobre rezultate. Naime, ionske tekućine ometaju nekovalentne veze, najčešće vodikove veze, između komponenata lignoceluloze. Celuloza koja nastane u takvom predtretmanu dostupnija je za enzimsku hidrolizu. Otopinu ionskih tekućina čine soli koje se sastoje od malih anorganskih aniona i velikih organskih kationa, a pri sobnoj temperaturi su u tekućem stanju. Neke od prednosti korištenja su kemijska stabilnost, nezapaljivost te mogućnost korištenja u radu sa različitim sirovinama (Bensah i Mensah, 2013).

NMMO predtretman ili predtretman organskim otapalom N-metilmorfolin-M-oksidom omogućuje dekrystalizaciju celuloze i otapanje hemiceluloze. Ovo otapalo je ekološki održivo te se može skoro potpuno reciklirati i nije toksično (Teghammar i sur., 2011).

#### 2.2.4. Biološki predtretmani

Biološka predobradba uključuje hidrolizu pomoću komercijalnih enzima ili korištenjem saprofitnih gljiva. Postoji nekoliko vrsta gljiva koje imaju sposobnost korištenja lignoceluloze kao supstrata, a dijele se na bijele, smeđe i meke. Smeđe gljive posjeduju enzime kojima mogu hidrolizirati hemicelulozu i celulozu, a bijele i meke celulozu i lignin. Prednosti biološkog predtretmana su nizak utrošak energije i blagi uvjeti a nedostaci relativno dugo trajanje, nemogućnost kontrole samog postupka kao i nisko iskorištenje (Sidhu i sur., 2015).

Enzimska hidroliza izvodi se uglavnom pri blagim uvjetima kao što su neutralan pH i niža temperatura, zavisno o svojstvima i vrsti samog enzima, a odvija se u tri koraka. Prvi korak je adsorpcija celulaznih i hemicelulaznih enzima na površinu sirovine nakon čega dolazi do postepene biorazgradnje celuloze i hemiceluloze u fermentabilne šećere. U trećem, posljednjem, koraku potrebno je izvršiti uklanjanje enzima (Sun i Cheng, 2002).

Enzimi koji se najčešće koriste su već prethodno spomenute celulaze i hemicelulaze, a finalni produkti njihovog djelovanja su fermentabilni šećeri glukoza i ksiloza. Iako postoji relativno veliki broj mikroorganizama koji mogu proizvoditi celulaze, za komercijalnu proizvodnju najviše se koriste fungi i to iz rodova *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizopyllum* i *Penicillium* (Sun i Cheng, 2001). Celulolitički enzimi hidroliziraju  $\beta$ -1,4-glikozidne veze pri čemu kao produkt nastaju molekule celobioze. Da bi hidroliza bila u potpunosti efektna potrebna je prisutnost  $\beta$ -glukozidaze kojoj je zadaća cijepanje molekule celobioze na dvije molekule glukoze (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996.). Kod hemicelulolitičkih enzima, da bi došlo do potpune hidrolize hemiceluloze, potrebno je upotrijebiti nekoliko različitih vrsta uključujući endo-1,4- $\beta$ -ksilanazu te 1,4- $\beta$ -ksilozidazu. Također, za oslobađanje ksilana i manana potrebni su enzimi ksilan esteraza,  $\alpha$ -L-arabnofuranozidaza i  $\alpha$ -4-O-metilglukoronozidaza (Guierro i sur., 2015).

Kada se radi o ligninu, kao što je već spomenuto, za njegovu depolimerizaciju potrebne su dvije vrste enzima, peroksidaze i lakaze. Prirodni producenti ovih enzima su saprofitne gljive a primjenom genetičkog inženjerstva razvijeni su sojevi poput *Sporotrichum pulverulentum* koji se mogu koristiti u ovakvim postupcima. Osim *Sporotrichuma*, saprofitna gljiva *P. chrysosporium* također posjeduje enzime lignin peroksidaze i mangan-ovisne peroksidaze kao odgovor sekundarnog metabolizma na uvjete sa smanjenom koncentracijom ugljika i dušika (Guierro i sur., 2015).

Bitno je napomenuti da brojni faktori utječu na enzimsku hidrolizu; od vrste supstrata pa sve do okolišnih uvjeta kao što su temperatura i pH. Optimizacijom uvjeta enzimске hidrolize postiže se veća aktivnosti enzima ali i bolje ošeeerenje (Sun i Cheng, 2002).

### **2.3. Inhibitori**

Prilikom predobradbe lignoceluloznih sirovina, zavisno o odabranom predtretmanu i uvjetima, dolazi do formiranja spojeva koji mogu negativno utjecati na proizvodni mikroorganizam, a time posljedično i na uspješnost fermentacije. Također, koncentracija i udio pojedinih vrsta inhibitora zavisi i od same sirovine koja se koristi u predobradi. S obzirom na njihovu zastupljenost i učestalost inhibitore koji nastaju možemo podijeliti u 3 kategorije: derivate slabih kiselina, furane te fenolne spojeve. Za neke vrste inhibitora dokazano je da mogu imati sinergističko djelovanje (Ko i sur., 2015).

Nastanak pojedine vrste inhibitora može se minimizirati optimizacijom predtretmana i uvjeta hidrolize. Također, mogu se primijeniti i metode detoksifikacije prije fermentacije za hidrolizate s visokim koncentracijama neželjenih spojeva. Metode koje se koriste u tom slučaju možemo također podijeliti u 3 skupine: fizikalne, kemijske i biološke. Kemijske metode uključuju taloženje inhibitora i toksina nakon hidrolize, adsorpciju na aktivni ugljen ili korištenje dijatomejske zemlje kao adsorbensa. Uparavanjem u vakuumu, kao fizikalnom metodom, mogu se ukloniti hlapivi spojevi kao što su octena kiselina i furfural, dok biološke metode detoksifikacije uključuju primjenu mikroorganizama i enzima kao što su lakaze i peroksidaze (Rezić, 2012).

#### **2.3.1. Slabe kiseline**

U ovu skupinu spadaju octena, mravlja kiselina i levulinska kiselina. Octena kiselina nastaje, uz ksilozu, hidrolizom hemiceluloze, a pri visokim temperaturama i tlakovima ksiloza se može razgraditi u furfural, a glukoza u 5-HMF (5-hidroksi-metilfurfural). Daljnjom razgradnjom furfurala i 5-HMFa nastaju mravlja kiselina i levulinska kiselina (Jönsson i sur., 2013). Sve kiseline, pa tako i ove mogu biti u disociranom ili nedisociranom obliku što značajno ovisi o pH vrijednosti podloge. U radnom mikroorganizmu, nedisocirane kiseline imaju značajniji utjecaj u odnosu na disocirane kiseline. Ne disocirane kiseline su topljive u mastima te mogu difundirati kroz staničnu membranu mikroorganizama. Jednom kad dođu do staničnog cistosola, dolazi do njihove disocijacije što posljedično snižava unutarstanični pH. Zadržavanje neutralne unutarstanične pH vrijednosti bitno je za normalnu funkciju stanice dok se stopa

preživljavanja stanica značajno smanjuje njenim snižavanjem (Palmqvist i sur., 1996). Optimalna pH vrijednost za rast većine kvasaca koji se koriste u biotehnološkoj proizvodnji etanola je oko 5.0-6.0 pH jedinica iako je u nekim slučajevima zabilježen i rast pri nižim vrijednostima (detektiran je rast pri pH 2,5 bez prisutnosti octene kiseline, a minimalni pH za rast stanice u prisutnosti octene kiseline je 4,5). Niske koncentracije slabih kiselina pokazuju stimulirajući efekt na produkciju etanola pri pH od 5.5, ali povećanjem koncentracije slabih kiselina prinos se smanjuje. Različita membranska propusnost za kiseline koje nastaju u postupku predobradbe znači i različiti stupanj negativnog djelovanja na stanicu ili toksičnost anionskog oblika prilikom njihove disocijacije u stanici. Naime, stanica posjeduje mehanizam očuvanja unutarstaničnog pH u slučaju da dođe do njegove promjene zbog porasta koncentracije H<sup>+</sup> iona. On uključuje ATP-azu koja se nalazi na staničnoj membrani te koja aktivnim transportom pumpa protone izvan stanice. S obzirom da je stanici potreban dodatni ATP za njihov transport, dodatna energija osigurava se razgradnjom ugljikohidrata. Pri jako visokim koncentracijama kiselina, odnosno disociranih protona premašuje se kapacitet protonske pumpe u stanici te dolazi do njenog iscrpljivanja. Dolazi do naglog smanjenja dostupnog ATP-a kojeg nije moguće dovoljno brzo regenerirati i posljedično se citoplazma zakiseljuje što dovodi do inhibicije rasta stanice. S druge strane, anioni octene i mravlje kiseline su lipofobni što znači da ne prolaze kroz staničnu membranu tj. stanica ih ne može transportirati van citosola. Iz tog razloga jedno od tumačenja jest i da je toksičnost kiselina posljedica nakupljanja anionskih oblika tih kiselina u citosolu. Pri niskoj pH vrijednosti komine, udio disociranih kiselina će biti manji, ali unutarstanična akumulacija aniona bit će visoka što će imati značajan utjecaj na proizvodni mikroorganizam (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

### **2.3.2. Furani**

Furan-aldehidi kao što su furufural i 5-HMF formiraju se pri visokim temperaturama i tlakovima razgradnjom pentozna i heksoza koje potječu iz hemiceluloze. Oni, uz prisutnost drugih inhibitora, negativno utječu na rast kvasaca i smanjuju prinos etanola. Kako bi neutralizirali ovaj efekt, u anaerobnim uvjetima neki kvasci mogu reducirati furfural u fufuril alkohol te 5-HMF u 2,5-bis-hidroksimetilfuran (Kim, 2018). Enzimi koji mogu reducirati furfural za koenzim imaju NADH odnosno NADPH u slučaju 5-HMF-a. Iako su navedeni spojevi inhibitori rasta mikroorganizama, dodavanje malih količina furfurala u nekim slučajevima, rezultiralo je povećanim prinosima etanola za rekombinantni soj *S. cerevisiae* koji je imao sposobnost fermentacije ksiloze (Ko i sur, 2015). Uzrok tome mogla bi biti redukcija furfurala u fufuril alkohol što rezultira smanjenom formacijom nusprodukta ksilitola i povećanom produkcijom

etanola. Istraživanja su pokazala da neki kvasci mogu tolerirati visoke koncentracije furan aldehida što je objašnjeno teorijom da je inhibicija furan aldehidima jača uz prisutnost drugih inhibitora (Ko i sur., 2015). Furfural također može interferirati s piruvatom te na taj način utjecati na normalno funkcioniranje stanice. Negativan utjecaj vidljiv je kroz smanjenje brzine rasta stanica, prinos ATP-a te smanjenje volumetrijske produktivnosti procesa fermentacije etanola. U nekim slučajevima može doći i do produljenja trajanja lag faze rasta. Za razliku od furfurala, 5-HMF se sporije metabolizira u stanici, a pretpostavlja se da je razlog tome niska propusnost membrane za 5-HMF što smanjuje mogućnost ulaska 5-HMFa u stanicu i posljedično smanjuje interferenciju sa metabolizmom stanice. (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

### **2.3.3. Fenoli**

Fenolni spojevi primarno potječu od djelomične razgradnje lignina, a mogu se formirati i tijekom razgradnje ugljikohidrata. Vanilna kiselina i vanilin te sinirginska kiselina i sinirgaldehid mogu nastati razgradnjom 3-fenilpropanskih jedinica lignina kao i hidrokvinon, katehol i 4-hidroksibenzojeva kiselina (Jönsson i sur., 2013). Neki od spojeva koji nastaju prilikom predobrade lignocelulozne sirovine su i 4-hidroksibenzojeva kiselina i 4-hidroksibezaldehid, sinirgaldehid. 4-hidroksibenzojeva kiselina je spoj koji je prvi korišten kako bi se proučavao utjecaj fenolnih spojeva na fermentaciju te su rezultati pokazali značajno smanjenje prinosa. U slučaju vanilina kada je prisutan u podlozi u kojoj se provodi fermentacija također je uočeno smanjenje prinosa etanola (Larsson, 2000.). Osim inhibitornog utjecaja neki fenolni spojevi pospješuju proces taloženja proteina (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000). Mehanizmi djelovanja fenolnih spojeva još uvijek nisu detaljno razjašnjeni ali poznato je da ih neki kvasci, pomoću enzima lakaze i peroksidaze mogu oksidirati do manje toksičnih. Smatra se da ovi spojevi povećavaju propusnost membrane i na taj način utječu na njihovu nemogućnost da djeluje selektivno ( Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

### **2.3.4. Sinergijsko djelovanje inhibitora**

Kombinacija različitih inhibitora, kao što su alifatske kiseline, furan aldehidi i fenoli, koji mogu istovremeno biti prisutni u podlozi, može imati jače izražen inhibitorni utjecaj nego svaki pojedinačno. Sastav sirovina te izbor procesa predtretmana jako utječe na sastav konačnog hidrolizata te posljedično na sinergijski efekt inhibitora. Na primjer, alifatske kiseline i furan aldehidi zasebno djeluju blago inhibitorno na rast mikroorganizama, ali ako su istovremeno



prisutni u podlozi stopa rasta znatno pada. S druge strane, prisutnost malih količina octene, mravlje i levulinske kiseline te furfurala i 5-HMFa nema toliko izražen sinergijski negativan utjecaj na rast nekih mikroorganizama (Pérez i sur., 2002).

#### **2.4. Kvasci koji se koriste u biotehnološkim postupcima proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina**

Kvasci su mikroskopski organizmi koji pripadaju u carstvo *Fungi*. Mogu se podijeliti u dvije skupine; *Ascomycetes* kao što su *Candida* i *Saccharomyces* te *Basidiomycetes* kao što su *Rhodotorula* ili *Filobasidiella*. Kvasci mogu rasti u širokom području pH vrijednosti dok, kada je temperatura u pitanju, većina spada u mezofile što znači da toleriraju temperature od 25°C do 50°C. Najčešće, postupci u kojima se koriste kvasci u industriji provode se na temperaturama između 20°C i 30°C. Kvasci koji se koriste u proizvodnji etanola uglavnom mogu fermentirati heksoze i oligosaharide, pa je iz tog razloga ograničena vrsta sirovina koje se mogu koristiti. Najpoznatiji industrijski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, na primjer, nema mogućnost fermentacije pentoza, iako je do sad dobiveno nekoliko rekombinantnih sojeva koji mogu fermentirati ovaj šećer. Nemogućnost korištenja nekih ugljikohidrata iz podloge smanjuje učinkovitost postupka u kojima se lignoceluloza koristi kao sirovina. Neke od karakteristika poželjnih kod mikroorganizama koji se koriste u biotehnološkoj proizvodnji etanola uključuju visoku produktivnost, visok prinos te toleranciju na povišene koncentracije etanola i inhibitora. Osim roda *Saccharomyces* i kvasca *S. cerevisiae*, potencijal u njihovoj primjeni pokazali su i tzv. ne-*Saccharomyces* kvasci kao npr. *P. tannophilus*, *Candida spp.* i *Pichia spp.* Navedeni kvasci imaju sposobnost fermentiranja pentoza te mogućnost rasta u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Potencijal u proizvodnji alkohola pokazuju i neke bakterije. One se često koriste za dobivanje spojeva poput butanola, izopropil- alkohola, octene kiseline, mravlje kiseline, glicerola, metana itd. (Mohd Azhar i sur., 2017).

Do danas, ne-*Saccharomyces* kvasci su se više koristili kao domaćini za ekspresiju proteina, biokatalizatori te katalizatori za sintezu raznih spojeva male molekulske mase koji imaju veliku ulogu u medicini i farmaceutskoj industriji. Također, primjenjuju se i u agrokulturi te služe za biokontrolu i bioremedijaciju (Johnson, 2013).

#### **2.4.1. Kvasci roda *Kluyveromyces***

Rod *Kluyveromyces* spada u askomicete, a kvasci iz ove skupine najviše se koriste za proizvodnju heterolognih proteina. Za razliku od nekih drugih vrsta kvasaca, *Kluyveromyces* kvasci mogu sintetizirati beta-galaktozidazu, enzim ključan kod metabolizma laktoze. Sposobnost korištenja galaktoze kao izvor ugljika omogućila im je značajniju primjenu u industriji mlijeka i mliječnih proizvoda. Donedavno su jeftini supstrati, kao sirutka, predstavljali velik problem za zbrinjavanje, međutim, danas oni predstavljaju polazišne sirovine u proizvodnji brojnih spojeva. Osim primjene u mliječnoj industriji, ovi kvasci pokazali su i potencijal u proizvodnji jednostaničnih proteina, egzopolisaharida i finih kemikalija (Johnson, 2013).

*K. marxianus* spada u termotolerantne kvasce i zbog te činjenice njegova primjena u biotehnološkim procesima omogućuje smanjenu mogućnost kontaminacije i utrošak rashladne vode. S druge strane, eksperimentalno je uočeno da dolazi do smanjenja prinosa etanola pri povišenoj temperaturi što nije optimalno. U usporedbi sa *S. cerevisiae*, *K. marxianus* pokazuje slabiju toleranciju na etanol (Fonesca i sur., 2008).

#### **2.4.2. *Pichia stipitis***

*P. stipitis* također spada u skupinu askomiceta i do sada je korišten u dosta eksperimenata sa fermentacijama ksiloze u etanol, L-mliječnu kiselinu i druge produkte. Pošto je hemiceluloza druga najzastupljenija sastavnica lignoceluloznih sirovina, fermentacija šećera koji potječu iz hemiceluloze može povećati prinos etanola u biotehnološkim procesima. U nekim istraživanjima, korištenjem tehnika genetskog inženjerstva, neki od gena *Pichie* inserirani su u genom kvasca *S. cerevisiae* u svrhu poboljšanja karakteristika proizvodnog mikroorganizma (Johnson, 2013).

#### **2.4.3. *Candida shehatae***

Kvasci ovog roda najčešće se koriste u biotehnološkoj proizvodnji jednostaničnih proteina, D-aminokiselina i ksilitola (Johnson, 2013). Ovaj kvasac također može fermentirati pentoze i heksoze u etanol (Jeffries i Sreenath, 1988).

#### **2.4.4. *Pachysolen tannophilus***

*Pachysolen tannophilus* može prevesti i D-ksilozu u etanol u aerobnim i anaerobnim uvjetima, no za rast biomase mora biti prisutan kisik (Maleszka i Schneider, 1982).

## 2.5. Utjecaj inhibitora na ne-*Saccharomyces* kvasce

Do danas su provedena mnoga istraživanja koja se bave proučavanjem inhibitornog utjecaja spojeva koji se nalaze u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina na proizvodni mikroorganizam i prinos etanola.

Primjerice, provedeno je ispitivanje inhibitornih efekata različitih koncentracija mravlje, octene i levulinske kiseline, katehola, furfurala, vanilina, 4-hidroksibenzaldehida i sinirgaldehida na rast kvasca *K. marxianus* CECT 10875. Dobiveni rezultati su bili izraženi kao postotak rasta i prinosa etanola u odnosu na kontrolu koja je uzgojena u mediju bez prisutnosti inhibitora. Pri maksimalnim koncentracijama mravlje, octene i levulinske kiseline, od 10 g/L, za svaku kiselinu zasebno (kao jedinog prisutnog inhibitora u uzgoju), nije došlo do značajne inhibicije proizvodnje etanola, iako je brzina rasta bila skoro za pola manja od kontrole. Nadalje, furfural i 5-HMF imali su sličan utjecaj kao navedene kiseline, iako je furfural imao veći inicijalni inhibitorni utjecaj od 5-HMFa. Pri nižim koncentracijama navedenih inhibitora nije bilo značajnijeg utjecaja na rast biomase i proizvodnju etanola već je do nagle inhibicije došlo pri koncentracijama tek oko 20 g/L. U prisutnosti 4-hidroksibenzaldehida u rasponu koncentracija 1-4 g/L kao donjih vrijednosti koncentracija, inhibicija nije bila toliko izražena, dok je kod maksimalne koncentracije rast u potpunosti zaustavljen. Najveći inhibitorni utjecaj u eksperimentima zabilježen je u prisutnosti katehola i 4-hidroksibenzaldehida. Već pri inicijalnoj koncentraciji katehola od 1 g/L zabilježena je inhibicija rasta stanica koja je iznosila oko 50 % u odnosu na kontrolu.

U nekim slučajevima sa inhibitorima poput furfurala, vanilina i sinirgaldehida kada je inhibitor prisutan u podlozi ne dolazi do proizvodnje etanola. Međutim ako mikroorganizam ima sposobnost metabolizirati inhibitore, njihovim nestankom u podlozi dolazi do ponovne uspostave proizvodnje alkohola. U slučaju kvasca *K. marxianus* pokazalo se da skoro dvostruko brže metabolizira aldehide, furfural i vanilin u odnosu na *S. cerevisie*.

U slučaju kvasca *K. marxianus* CECT 10875 donesen je zaključak da je više izražen inhibitorni utjecaj na rast stanica u usporedbi s proizvodnjom etanola, po čemu se ovaj kvasac razlikuje od *C. shehatae* i *P. stipitis*. Također, dokazano je da *K. marxianus* može najbrže asimilirati aldehide u odnosu na neke druge mikroorganizme koji se koriste u proizvodnji etanola iz lignoceluloznih sirovina (Olivá i sur., 2003).

Ovo istraživanje prošireno je na kvascu *K. marxianus* te je dodatno ispitivano inhibitorno djelovanje octene kiseline, furfurala i katehola. Pokazalo se da niska koncentracija furfurala utječe na brzinu rasta te da njegovo dodavanje u podlogu produljuje i trajanje lag faze. Octena

kiselina pri niskim koncentracijama negativno utječe na proizvodnju etanola, a u kombinaciji kada se i furfural nalazi u mediju, inhibitorni učinak je pojačan. Ova pojava objašnjena je činjenicom da furfural vjerojatno utječe na mehanizam pumpanja protona iz stanice i na taj način uzrokuje inhibiciju. Dodatkom sva tri inhibitora u podlogu pokazalo se da imaju sinergijsko inhibitorno djelovanje na stanice mikroorganizma (Olivá i sur., 2005).

Utjecaj katehola i dva aromatska aldehida, 4-hidroksibezaldehida i vanilina provedeno je 2008. godine od strane istih znanstvenika ponovno na istom mikroorganizmu. Također proučavao se i sinergijski utjecaj navedenih inhibitora. U zaključku ovog istraživanja navedeno je da je inhibicija izraženija u slučaju kada su dva inhibitora dodana u podlogu istovremeno.

Nadalje, proučavan utjecaj 5-HMFa, furfurala, octene kiseline i mliječne kiseline na rast triju kvasaca; dva *Kluyveromyces marxianus* i jedan *S. cerevisiae* kvasca. Sojevi kvasca *K. marxianus* (TISTR5925 i NCYC587) su uzgajani pri temperaturama od 30°C i 42°C. Podloge za uzgoj sadržavale su različite koncentracije furfurala i 5-HMFa. Furfural je u ovom slučaju potpuno inhibirao rast stanica dok je dodatak iste koncentracije 5-HMFa utjecao samo na produljenje lag faze rasta. U eksperimentu sa TISTR5925 koji je bio izložen različitim koncentracijama mliječne i octene kiseline tijekom 24h pri 30°C, zabilježena je umjerena inhibicija rasta. Pri 42°C inhibicija octenom kiselinom bila je izraženija, a slični rezultati dobiveni su i u eksperimentima s mliječnom kiselinom. U konačnici soj TISTR5925 pokazao je veću toleranciju na slabe kiseline u usporedbi s drugim sojem *K. marxianus* i kvascem *S. cerevisiae*. Utjecaj inhibitora na ove kvasce ispitan je i u laboratorijskom mjerilu i u industrijskom mjerilu gdje su dobiveni slični rezultati (Rugthaworn i sur., 2014).

Također je provedeno istraživanje gdje je proučavan utjecaj inhibitora pronađenih u hemiceluloznom hidrolizatu otpadaka šećerne trske tretirane kiselinom na rast i proizvodnju etanola pomoću kvasca *Pachysolen tannophilus*. I ovdje su dobiveni slični rezultati kao i kod *K. marxianus* u slučaju kada su octena kiselina i furfural prisutni u podlozi. Furfural je već kod koncentracije od 0,33 g/L jače utjecao na brzinu rasta nego brzinu proizvodnje etanola. Kod octene kiseline dodatak nižih koncentracija (3,88 g/L) nije imao veliki efekt, međutim kod je viših koncentracija (10,44 g/L) rast je značajnije usporen, ali nije u potpunosti zaustavljen. Snižavanjem pH vrijednosti podloge ovaj efekt bio je još izraženiji s obzirom da je veći udio nedisociranog oblika ove kiseline u odnosu na disocirani. Zaključno, brzina rasta i proizvodnja etanola bili su niži u usporedbi sa *Saccharomyces cerevisiae* (Watson i sur., 1984).

Nadalje, istraživanje je prošreno na proučavanje utjecaja inhibitora pronađenih u lignoceluloznim sirovinama na kvasce *P. tannophilus* i *P. stipitis*. Rezultati istraživanja su

pokazali da je kvasac *P. tannophilus* otporniji na utjecaj furfurala i 5-HMFa kada su navedeni inhibitori dodani u podlogu. Izraženiji inhibitoryni utjecaj zabilježen je dodavanjem octene kiseline i kada je više inhibitora istovremeno dodano u hranjivu podlogu (Lohmeyer-Vogel i sur., 1998).

Provedeno je i istraživanje gdje je uspoređivana tolerancija kvasaca *S. cerevisiae* i *P. tannophilus* na inhibitore furfural, 5-HMF i levulinsku kiselinu. U podlozi koja je sadržavala glukozu i furfural, kvasac *S. cerevisiae* pokazao je veći prinos etanola (85,5 % u odnosu na kontrolu bez prisutnosti inhibitora u mediju) od *P. tannophilus* (46,7 % u odnosu na kontrolu). U mediju u kojem su bili prisutni ksiloza i furfural, inhibitoryni utjecaj na proizvodnju etanola bio je izraženiji za kvasac *P. tannophilus*. Prinos je iznosio 12,4 % u odnosu na kontrolu, što pokazuje da furfural značajno utječe na metabolizam ksiloze. U slučaju kvasca *S. cerevisiae* utjecaj levulinske kiseline i 5-HMF bio je znatno manji u odnosu na *P. tannophilus* (Yang i sur., 2012).

Osim toga provedeno je i istraživanje gdje je izučavan utjecaj raznih koncentracija furfurala, octene kiseline, 5-HMFa, sinirgaldehida, 4-hidroksibenzaldehida te vanilina na različite sojeve kvasaca. Uz eksperimente sa različitim koncentracijama dodanih inhibitora u paraleli su provedena i istraživanja sa podlogama bez dodanih inhibitora koje su služile kao kontrola. Eksperimenti su provedeni sa kvascima *S. cerevisiae*, *P. stipitis* i *C. shehatae*.

Furfural je pri inicijalnoj koncentraciji od 0,5 g/L imao približno isti utjecaj i na rast i na produkciju etanola i kod ksiloza fermentirajućih kvasaca i kod *S. cerevisiae*. Kao najotporniji pokazao se kvasac *C. shehatae* kojemu je rast iznosio 81 % u odnosu na kontrolnu skupinu, a proizvodnja etanola 80 %. *P. stipitis* pokazao je slične rezultate sa malo većim inhibitorynim utjecajem furfurala. Brzina rasta iznosila je 75 % u odnosu na kontrolu, a postotak proizvedenog etanola 71 % u odnosu na kontrolu. Furfural je pri inicijalnoj koncentraciji imao puno veći inhibitoryni utjecaj na *S. cerevisiae* kod kojeg je brzina rasta iznosila 53 % u odnosu na kontrolu, a proizvodnja etanola 57 %. Razlika utjecaja furfurala kada uspoređujemo ksiloza i heksoza fermentirajuće kvasce leži u činjenici da kod *S. cerevisiae* furfural ima veći inhibitoryni utjecaj na rast, a kod ksiloza fermentirajućih kvasaca na proizvodnju etanola. Povećavanjem koncentracije furfurala na 1 g/L došlo je do naglog smanjenja brzine rasta i proizvodnje etanola. Zaključno, kvasac *S. cerevisiae* imao je veću brzinu rasta i proizvodnju etanola u odnosu na kontrolu nego ksiloza fermentirajući kvasci pri maksimalnoj koncentraciji furfurala.

Inhibitoryni utjecaj octene kiseline kod kvasca *C. shehatae* pri inicijalnoj koncentraciji od 5 g/L nije bio toliko izražen, ali je došlo do smanjene količine proizvedenog etanola na 78 % u odnosu

na kontrolu. Daljnjim povećanjem koncentracije octene kiseline na 10 g/L i 15 g/L došlo je do inhibicije brzine rasta od 15 % odnosno 20 % u odnosu na kontrolu, dok je količina proizvedenog etanola pri obje koncentracije iznosila približno 60 %. Kod kvasca *P. stipitis* je pri sve tri koncentracije octene kiseline došlo do sličnog postotka inhibicije rasta (63 %, 64 %, i 64 % u odnosu na kontrolu), a inhibicija proizvodnje etanola je pri svim koncentracijama bila visoka (30 % u odnosu na kontrolu i nije znatno mijenjala povećanjem koncentracije octene kiseline). Kod kvasca *S. cerevisiae* dodatak octene kiseline imao je, za razliku od ksiloza fermentirajućih kvasaca, veći utjecaj na rast nego na proizvodnju etanola. Pri početnoj koncentraciji od 5 g/L proizvodnja etanola bila je približno ista kao i u kontroli iako se brzina rasta smanjila za 20 %. Pri povećanju koncentracije octene kiseline na 10 i 15 g/L brzina rasta se smanjila i bila je slična pri obje koncentracije (52 % i 56 % u odnosu na kontrolu), a proizvodnja etanola se smanjivala proporcionalno s povećanjem koncentracije inhibitora (73 % pri 10 g/L i 62 % pri 15 g/L), što pokazuje izraženiji negativan utjecaj na brzinu rasta stanica.

Pri inicijalnoj koncentraciji 5-HMFa od 1 g/L, ksiloza fermentirajući kvasci pokazali su se otporniji nego *S. cerevisiae*. Kod kvasca *P. stipitis* zabilježena je manja inhibicija brzine rasta u odnosu na kontrolu te smanjenje brzine proizvodnje etanola od 20 %. Eksperiment sa *C. shehatae* dao je slične rezultate, a brzina proizvodnje etanola iznosila je 67 % u odnosu na kontrolu. Najizraženiji negativan utjecaj na brzinu rasta i proizvodnju etanola uočen je kod *S. cerevisiae* gdje su navedeni parametri bili smanjeni za 65 % i 70 % u odnosu na kontrolu. Daljnjim povećanjem koncentracije inhibitora na 3 i 5 g/L došlo je do snažne inhibicije u rastu i proizvodnji etanola kod sva tri kvasca.

Inicijalna koncentracija vanilina od 0,5 g/L skoro je potpuno inhibirala rast i proizvodnju etanola kod kvasca *P. stipitis* dok je kod kvasca *C. shehatae* zabilježen izraženiji utjecaj inhibitora na proizvodnju etanola (47 % u odnosu na kontrolu) nego na brzinu rasta (67 % u odnosu na kontrolu). Kod kvasca *S. cerevisiae* rezultat su bili slični (brzina rasta je iznosila 49 % a brzina proizvodnja etanola 70 % u odnosu na eksperiment bez dodanog inhibitora). Daljnje povećanje koncentracije vanilina na 1 i 2 g/L gotovo u potpunosti zaustavlja rast i proizvodnju etanola kod sva tri kvasca.

Početna koncentracija 4-hidroksibenzaldehida od 0,5 g/L imala je sličan utjecaj na brzine rasta kvasaca *C. shehatae* i *P. stipitis*. Brzina rasta iznosila je 57 % u slučaju kvasca *P. stipitis*, a 60 % za *C. shehatae* kada se uspoređuju sa kontrolom. Kod *P. stipitis* došlo je do značajne inhibicije brzina proizvodnje etanola (pad od 70 %), dok je kod kvasca *C. shehatae* pad iznosio 40 %. Daljnjim povećavanjem koncentracije na 0,75 g/L i 1,5 g/L rat stanica i proizvodnja

etanola su gotovo u potpunosti zaustavljeni. Pri inicijalnoj koncentraciji 4-hidroksibezaldehida kod *S. cerevisiae* nije došlo do izraženijeg pada proizvodnje etanola, ali je došlo do inhibicije brzine rasta. Daljnjim povećanjem koncentracije inhibitora došlo je do daljnjeg smanjenja rasta i proizvodnje etanola, a zaključno, povećanje koncentracije inhibitora imalo je blaži utjecaj na promatrane parametre u slučaju kvasca *S. cerevisiae*.

Pri inicijalnoj koncentraciji sinirgaldehida od 0,2 g/L kod kvasca *C. shehatae* zabilježeno je smanjenje specifične brzine rasta i proizvodnje etanola (89 % i 83 % u odnosu na kontrolu). Sličan rezultat uočen je i kod *P. stipitis* gdje je utjecaj inhibicije bio izraženiji kod proizvodnje etanola (pad od 40 % u odnosu na kontrolu, a brzina rasta 28 %). Daljnjim povećanjem koncentracije inhibitora na 0,75 g/L inhibicija postaje izraženija, a pri najvećoj koncentraciji od 1,5 g/L došlo je do potpune inhibicije u oba slučaja. U slučaju *S. cerevisiae* niže inicijalne koncentracije navedenog inhibitora utjecale su samo na brzinu proizvodnje etanola (74 % u odnosu na kontrolu). Pri najvećoj koncentraciji inhibitora negativan utjecaj izraženiji je kod brzine rasta stanica u usporedbi s proizvodnjom etanola.

Na temelju ovih rezultata istraživanja donesen je zaključak da inhibitori imaju veći utjecaj na brzinu proizvodnje etanola nego na specifičnu brzinu rasta u slučaju ne-*Saccharomyces* kvasaca. Ovi zaključci najvidljiviji su kod sojeva koji su uzgajani u podlogama sa dodanom octenom kiselinom i 5-HMF-om. U većini eksperimenata sa *S. cerevisiae* inhibitori su značajnije utjecali na brzinu rasta dok se ovaj kvasac generalno pokazao kao bolji producent etanola u odnosu na ne-*Saccharomyces* kvasce. Ova pojava najuočljivija je kod eksperimenata s octenom kiselinom i vanilinom. Također, inhibitorni utjecaj zavisi i o koncentraciji samog inhibitora i o vrsti mikroorganizma. Inhibitor koji je imao najveći utjecaj na rast mikroorganizama i proizvodnju etanola bio je vanilin (Delgenes i sur., 1995).

Svi navedeni zaključci u skladu su sa istraživanjem gdje je uspoređivan utjecaj furfurala i octene kiseline na kvasce *S. cerevisiae* i *C. shehatae*. I u tom slučaju utvrđeno je da je kvasac *C. shehatae* puno osjetljiviji na inhibitor furfural nego *S. cerevisiae*. Parametar koji su proučavali u ovim eksperimentima je bila redokсна aktivnosti stanica. U slučaju *S. cerevisiae* ta vrijednost je iznosila 60 % dok je kod *C. shehatae* relativna redokсна aktivnost iznosila 20 % u odnosu na kontrolu. Specifične brzine rasta ovih mikroorganizama ostale su niske, a većina furfurala nije prevedena u furfural alkohol u oba slučaja. Toksičnost octene kiseline bila je sve izraženija posebice u slučaju sa kvascem *C. shehatae*. Usporavanjem katabolizma, kao posljedica inhibicije, usporava se proces fermentacije i rast stanica, a kvasac *C. shehatae* pokazao se osjetljivijim na octenu kiselinu i furfural (Zhao i sur., 2005).

Nadalje, u istraživanju sa kvascem *P. stipitis* proučavan je utjecaj inhibitora furfurala i 5-HMF-a na soj NRRL Y-7124. I u ovom slučaju korištene koncentracije inhibitora odgovaraju koncentracijama pronađenim u lignoceluloznim hidrolizatima. Furfural i 5-HMF nisu uzrokovali potpunu inhibiciju već zastoj u rastu stanica i fermentaciji etanola zbog asimilacije inhibitora. Furfural i 5-HMF bili su reducirani u alkohole, a nakon asimilacije nije bilo daljnje inhibicije i rast stanica se nastavio, a prinosi etanola nakon metaboliziranja inhibitora bili su slični kontroli u kojoj inhibitori nisu bili prisutni (P. J. Slininger, 2008).

U konačnici, proučavani su utjecaji furfurala, 5-HMFa i octene kiseline na kvasac *P. stipitis*. Rezultati istraživanja bili su u skladu sa prethodno navedenim istraživanjima. Donesen je zaključak da kvasac *P. stipitis* može metabolizirati furfural i 5-HMF, međutim znatno sporije nego kvasac *S. cerevisiae*. Od svih navedenih inhibitora, octena kiselina imala je najznačajniji utjecaj na ovaj mikroorganizam. Sinergističkim djelovanjem ovih inhibitora došlo je do nemogućnosti fermentacije ksiloze te djelomične inhibicije fermentacije glukoze kod kvasca *P. stipitis* (Bellido i sur., 2011).



### 3. ZAKLJUČCI

1. Glavne komponente lignoceluloznih sirovina su celuloza, hemiceluloza i lignin. Udio ovih komponenti u sirovini ovisi o vrsti biljke od koje sirovina potječe.
2. Lignocelulozne sirovine, zbog svoje kompleksnosti, ne mogu se direktno koristiti u biotehnološkim postupcima i zbog toga moraju proći postupke predtretmana.
3. Hidrolizati koji nastaju u konačnici smjesa su heksoza, pentoza i drugih spojeva koji mogu imati inhibitorni utjecaj na proizvodni mikroorganizam.
4. Zbog nemogućnosti korištenja pentoza kao izvora ugljika, pokušava se pronaći alternativa tradicionalno korištenom kvascu *S. cerevisiae* u biotehnološkoj proizvodnji etanola iz lignoceluloznih sirovina. Ne-*Saccharomyces* kvasci pokazuju potencijal u industrijskoj primjeni i zbog činjenice da mogu dobro podnositi različite koncentracije inhibitora koje susrećemo u ovim postupcima.
5. Kada se uspoređuju *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasci, u većini slučajeva, inhibitori imaju negativan utjecaj i na specifičnu brzinu rasta i na brzinu proizvodnje etanola kod viših koncentracija inhibitora. Generalno, utjecaj inhibicije izraženiji je na proizvodnju etanola, a manji na specifičnu brzinu rasta kod ne-*Saccharomyces* kvasaca dok je kod kvasca *S. cerevisiae* situacija obrnuta.

## IZVORI:

1. Agbor V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. (2011) Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnology Advances* **29**: 675–685.
2. Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M. T. (2011) Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*, *Bioresource Technology* **102**: 68–74
3. Bensah, E. C., Mensah, M. (2013) Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations, *International Journal of Chemical Engineering*, **2013**
4. Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., Ramakrishnan, S. (2011) Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review, *Enzyme Research*, **2011**
5. Carrasco, C., Baudel, H. M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., HahnHägerdal, B., Zacchi, G., Lidén, G. (2010) SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse, *Enzyme and Microbial Technology* **46**: 64–73.
6. Delgenes, J. P., Moletta, R., Navarro, J. M. (1996) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*, *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 220–225.
7. Fonesca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**: 339-354.
8. Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., Siddiqui, K. S. (2015) Destructuring plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases, *Plant Science* **234**: 180–193.

9. Jeffries, T. W., Sreentah, H. K. (1998) Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures by *Candida shehatae*, *Biotechnology and Bioengineering* **31**: 502-506
10. Johnson, E. A. (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes, *Applied Microbiolog and Biotechnology* **97**: 503-517
11. Jönsson, L. J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, *Biotechnology for Biofuels* **2013**; 6
12. Jönsson, L. J., Martin, C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresource Technology* **199**: 103-112.
13. Kim, D. (2018) Physico–Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review, *Molecules*, **23** (2)
14. Ko, J. K., Um, Y., Park, Y. C., Seo, J. H., Kim, K. H. (2015) Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 4201–4212.
15. Larsson, S. (2000) Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84–86., 617–632.
16. Latif, A. A., Harun, S., Sajab, M. S., Markom, M., Jahim, J. M. (2018) Ammonia-based pretreatment for lignocellulosic biomass conversion – an overview, *Journal of Engineering Science and Technology* **13** (6); 1595-1620.
17. Lohmeier-Vogel, E. M. (1998) Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts, *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* **20**: 75–81.
18. Maleszka, R., Schneider, H. (1982) Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* growing on D-xylose, *Applied Environmental Microbiology* **44** (4): 909–912.
19. Mohd Azhar, S. H., Jambo, S. A., Abdulla, R., Marbawi, H., Gansau, J. A., Ravindra, P. (2016) A review on third generation bioethanol feedstock, *Renew Sustain Energy Reviews* **65**: 756–69.

20. Olivá, J. M., Ballesteros, I., Negro, M. J., Manzanares, P., Cabanas, A., Ballesteros, M. (2004) Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Progress* **20**: 715–720.
21. Olivá, J. M., Negro, M. J., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., González, A., Ballesteros, M. (2006) Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*, *Process Biochemistry* **41**: 1223–1228.
22. Olivá, J. M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, M. (2003) Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**: 141–154.
23. Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates forethanol production, *Enzyme and Microbial Technology* **18**: 312-331.
24. Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition, *Bioresource Technology* **74**: 25–33.
25. Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Zacchi, G. (1996) The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation, *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 470-476.
26. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De-la-Rubia, T., Martínez, J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *International Microbiology* **5**: 53–63.
27. Rezić, T. (2012) Interna skripta Biotehnologija 3, str 17.
28. Rugthaworn, P., Murata, Y., Machida, M., Apiwatanapiwat, W., Hirooka, A., Thanapase, W., Dangjarean, H., Ushiwaka, S., Morimitsu, K., Kosugi, A., Arai, T., Vaithanomsat, P. (2014) Growth inhibition of thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus*, in hydrolysates from cassava pulp, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **173** (5): 1197–1208
29. Saha, B. C. (2004) Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology, *ACS Symposium Series* **889**: 2–34.

30. Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee S., Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: an overview, *Renew Energy* **37**: 19–27.
31. Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—an overview, *Bioresource Technology* **199**: 76–82.
32. Slininger, P. J., Dien, B. S., Gorsich, S. W., Liu, Z. L. (2006) Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 1285–1296.
33. Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology* **83**: 1–11.
34. Taherzadeh, M. J., Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *International Journal of Molecular Science* **9**, 1621–1651.
35. Teghammar, A., Karimi, K., Horvath, I. S., Taherzadeh, M. J. (2012) Enhanced biogas production from rice straw, triticale straw and softwood spruce by NMMO pretreatment, *Biomass Bioenergy* **36**: 116-120.
36. Viikari, L., Vehmaanpera, J., Koivula, A. (2012) Lignocellulosic ethanol: from science to industry, *Biomass Bioenergy* **46**: 13–24.
37. Watson, N. E., Prior, B. A., Lategan, P. M., and Lussi, M. (1984) Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*, *Enzyme and Microbial Technology* **1984** (6), 451-456.
38. Yang, P. Z., Zhen, Z., Luo, S. Z., Jiang, S. T., Chen, M. L., Gao, S. R. (2012) Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus* to diluted acid hydrolysis inhibitor, *Transactions of Chinese Society of Agricultural Machinery* **43** (4): 88-92.
39. Zhao, J., Yang, Z., Wang, M., Lu, Y., Yang, Z. Y., Gong, Q. T., Yang, L. Y. Z. (2005) Mediated electrochemical measurement of the inhibitory effects of furfural and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*, *Biotechnology Letters* **27**: 207–211.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Klara Kašnar

---

(ime i prezime studenta)