

# Određivanje optimalne temperature za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

---

Samardžić, Ana

Master's thesis / Diplomski 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:159:135984>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2020.

Ana Samardžić

1274/BPI

**Određivanje optimalne temperature  
za rast i proizvodnju etanola s  
pomoću kvasca *Kluyveromyces  
marxianus* NBRC 1777**

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

Diplomski rad je izrađen u okviru projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (šifra projekta: IP-2018-01-9717) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

*Najveće hvala mojoj mentorici, doc.dr.sc. Antoniji Trontel, na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada, prenesenom znanju, izuzetnoj stručnosti, podršci, strpljenju i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela te samom pisanju rada. U ovakvoj situaciji izašli ste mi u susret te se prilagodili svim mojim dodatnim obavezama, bili uvijek na raspolaganju i pri tome mi prenijeli mnogo znanja, što pokazuje kvalitetu predavača i mentora. Još jednom veliko hvala!*

*Također se zahvaljujem asistentu Nenadu Marđetku, mag.ing.bioproc., za veliku pomoć pri izradi eksperimentalnog dijela rada, prenesenom znanju i vještinama te pridonosenju dobre radne atmosfere. Hvala doc.dr.sc. Mariu Novaku na susretljivosti, pomoći i prenesenom znanju tijekom rada u laboratoriju. Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva, na pruženoj pomoći i prenesenom znanju. Ovim putem se također želim zahvaliti i prof.dr.sc. Božidaru Šanteku za susretljivost tijekom studiranja, pruženoj pomoći i motiviranju studenata.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja, dijelili sa mnom dobre i loše dane te uvijek bili spremni pomoći. Posebno hvala Luciji, koja je uljepšala moje studentske dane, bila mi partner u učenju i izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Hvala ti za sve trenutke.*

*Na kraju, najviše zahvaljujem svojim najbližima, roditeljima i sestri. Hvala vam što ste mi omogućili bezbrižne studentske dane, hvala vam na pruženoj ljubavi i podršci te strpljenju kroz sve teške dane. Ova diploma nije samo moja nego i vaša.*



# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## Određivanje optimalne temperature za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca

*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Ana Samardžić, 1274/BPI

### Sažetak:

Razvoj bioprocasa proizvodnje etanola trebao bi biti usmjeren prema pronalaženju termotolerantnog kvasca koji može koristiti različite ugljikohidrate kao izvore ugljika, posebice one prisutne u lignoceluloznim sirovinama, proizvoditi etanol uz visoke prinose i produktivnost pri temperaturama koje su optimalne za aktivnost enzima potrebnih za hidrolizu lignoceluloznih sirovina ( $\approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kvasac *Kluyveromyces marxianus* je termotolerantni kvasac koji može rasti i pri temperaturi od  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a etanol može proizvoditi pri temperaturama od  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  ovisno o odabranom soju ovog kvasca. U ovom radu su zbog pronalaženja optimalne temperature za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provedeni uzgoji u YPD (Yeast extract pepton dextrose) podlozi pri temperaturama od  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Između testiranih temperatura, najveća specifična brzina rasta ( $\mu = 0,42\text{ h}^{-1}$ ) te brzine proizvodnje etanola ( $r_{\text{EtOH}} = 0,35\text{ h}^{-1}$ ) i glicerola ( $r_{\text{glicerol}} = 0,19\text{ h}^{-1}$ ), kao i produktivnost procesa proizvodnje etanola ( $Pr_{\text{EtOH}} = 0,96\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) određene su pri temperaturi od  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri temperaturi od  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  ovaj soj kvasca raste vrlo sporo i proizvodi minimalne količine etanola uz vrlo nisku produktivnost procesa proizvodnje etanola ( $Pr_{\text{EtOH}} = 0,15\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ).

**Ključne riječi:** *utjecaj temperature, bioetanol, glukoza, Kluyveromyces marxianus*

**Rad sadrži:** 44 stranice, 11 slika, 9 tablica, 62 literaturne reference, 5 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

### Stručno povjerenstvo za obranu:

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

**Datum obrane:** 18. prosinac 2020.





## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### Determination of optimal temperature for growth and ethanol production by yeast

*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Ana Samardžić, 1274/BPI

#### Abstract:

*The development of ethanol production bioprocess should be aimed at finding thermotolerant yeast that can use various carbohydrates as carbon sources, especially those present in lignocellulosic feedstocks, produce ethanol with high yields and productivity at temperatures optimal for the activity of enzymes required for hydrolysis of lignocells ( $\approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Yeast *Kluyveromyces marxianus* is a thermotolerant yeast that can grow at temperatures from  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  and ethanol can be produced at temperatures from  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  depending on the selected strain of this yeast. In this work, in order to find the optimal temperature for the growth and production of ethanol with the help of yeast *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, cultivations were performed in YPD (Yeast extract pepton dextrose) medium at temperatures of  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Between the tested temperatures, the highest specific growth rate ( $\mu = 0.42\text{ h}^{-1}$ ) and the production rate of ethanol ( $r_{\text{EtOH}} = 0.35\text{ h}^{-1}$ ) and glycerol ( $r_{\text{glycerol}} = 0.19\text{ h}^{-1}$ ), as well as the productivity of the production process ethanol ( $Pr_{\text{EtOH}} = 0.96\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) were determined at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . At a temperature of  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  this yeast strain grows very slowly and produces minimal amounts of ethanol with very low productivity of the ethanol production process ( $Pr_{\text{EtOH}} = 0.15\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ).*

**Keywords:** influence of temperature, bioethanol, glucose, *Kluyveromyces marxianus*

**Thesis contains:** 44 pages, 11 figures, 9 tables, 62 references, 5 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** MSc Nenad Marđetko

#### Reviewers:

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

**Paper defended:** 18th December, 2020.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. PRIMJENA KVASACA U BIOTEHNOLOGIJI.....	2
2.2. NE- <i>Saccharomyces</i> KVASCI.....	3
2.2.1. Kvasac <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	4
2.3. METABOLIZAM KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	8
2.4. Utjecaj temperature na rast i aktivnost kvasca .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
3.1. MATERIJALI .....	13
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Hranjive podloge.....	13
3.1.4. Aparatura i pribor.....	14
3.1.4.1. Spektrofotometar .....	14
3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (UPLC).....	14
3.1.4.3. Ostala oprema i programi .....	15
3.2. METODE RADA.....	16
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	16
3.2.2. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	16
3.3. ANALITIČKE METODE .....	17
3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka .....	17
3.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca .....	17
3.3.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata fermentacije UPLC metodom .....	17
3.3.3.1. Priprema uzoraka za UPLC analizu.....	18
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI.....	19
3.4.1. Prinos biomase ( $Y_X$ ) .....	19
3.4.2. Prinos produkta ( $Y_P$ ).....	19
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ ).....	19
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ( $Y_{P/S}$ ) .....	19
3.4.5. Brzina potrošnje supstrata ( $r_{glc}$ ).....	19
3.4.6. Brzina nastajanja produkta ( $r_P$ ) .....	20
3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase ( $\mu_m$ ) .....	20
3.4.8. Produktivnost ( $Pr$ ) .....	20

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
4.1. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 U YPD PODLOZI PRI 20 °C .....	22
4.2. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 U YPD PODLOZI PRI 30 °C .....	24
4.3. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 U YPD PODLOZI PRI 40 °C .....	26
4.4. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 U YPD PODLOZI PRI 50 °C .....	28
4.5. ODREĐIVANJE OPTIMALNIH KINETIČKIH PARAMETARA ZA PROIZVODNJU ETANOLA S POMOĆU KVASCA <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 .....	31
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
<b>7. PRILOZI</b>	
7.1. POPIS KRATICA	
7.2. PROMJENA OPTIČKE GUSTOĆE TIJEKOM UZGOJA KVASCA <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA	



# 1. UVOD

Za primjenu otpadne lignoceluloze kao glavnog izvora ugljika u industrijskoj proizvodnji etanola, najveće ekonomske prepreke predstavljaju cijena celulolitičkih enzima te pad produktivnosti hidrolize i fermentacije koji se javlja uslijed inaktivacije enzima odnosno radnog mikroorganizma- kvasca (Caspeta i Nielsen, 2015). Tijekom proizvodnje etanola u većem mjerilu, visoka koncentracija supstrata (glukoze), visoke koncentracije dobivenog etanola te visoke temperature mogu biti faktori koji utječu na inhibiciju kvasca. U slučaju vođenja fermentacije pri višim temperaturama, moglo bi doći do smanjenja troškova hlađenja, simultanog procesa saharifikacije i fermentacije i kontaminacije procesa (Abdel-Banat i sur., 2010).

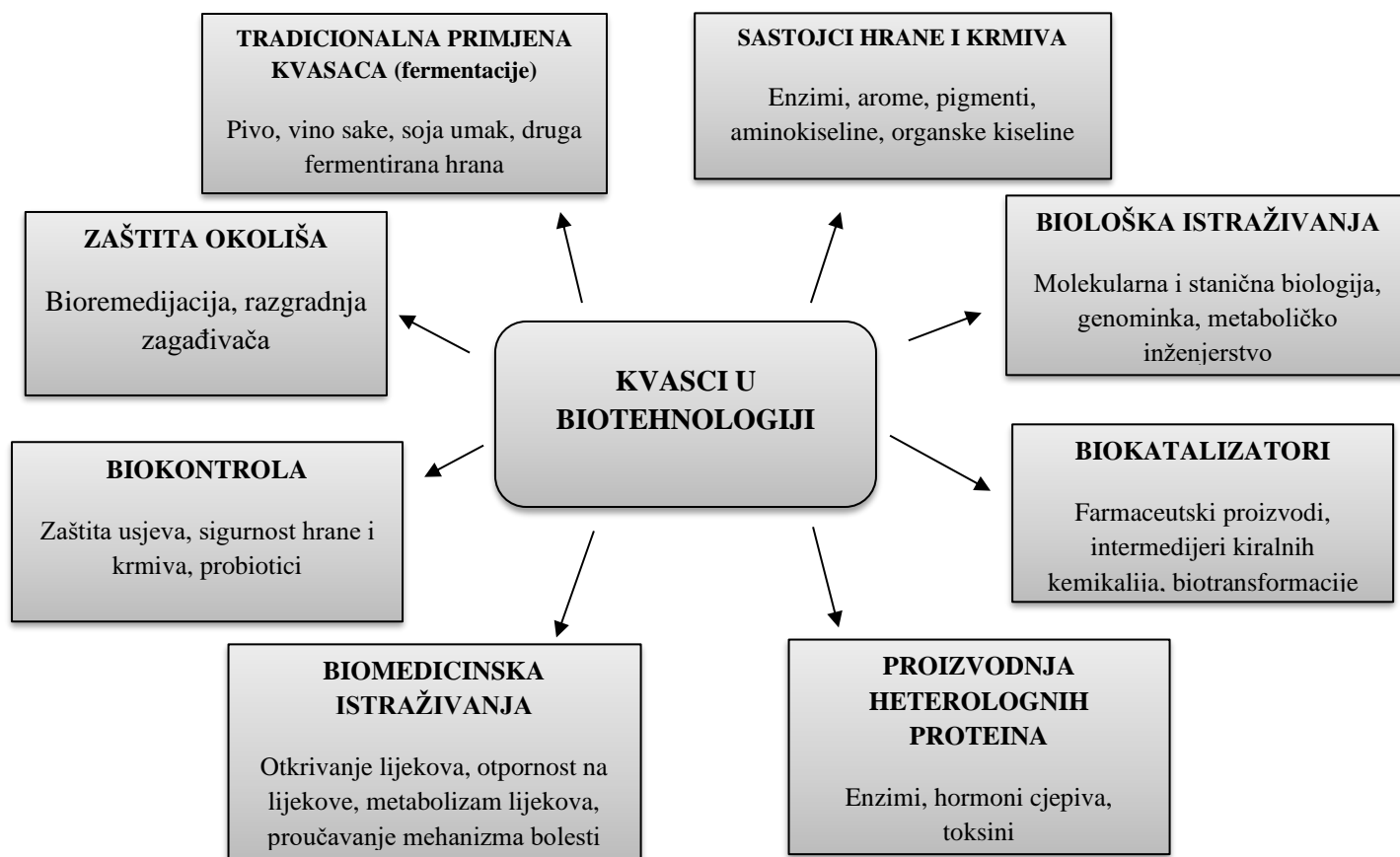
Ne-*Saccharomyces* kvasci pokazuju razna svojstva važna za industrijsku primjenu, a neka od njih su korištenje različitih ugljikohidrata, tolerancija na stresne uvjete (npr. niska pH vrijednost) te inhibitore. Otpornost na visoke temperature, odnosno svojstvo termotolerancije pokazuje kvasac *Kluyveromyces marxianus* koji raste na temperaturama od 47, 49 i 52 °C, te proizvodi etanol na temperaturama iznad 40 °C (Radecka i sur., 2015). Osnovne karakteristike koje navedenom kvascu daju prednost pred drugim kvascima u industrijskoj proizvodnji su također brz rast i proizvodnja etanola uz nastajanje minimalnih količina nusprodukata fermentacije (Lane i sur., 2011).

U ovom radu provedeni su uzgoji kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C) u anaerobnim uvjetima. Iz dobivenih rezultata izračunati su osnovni biokinetički parametri rasta i proizvodnje etanola za sve testirane temperature te je na temelju dobivenih podataka određena optimalna temperatura za provođenje bioprocasa proizvodnje etanola u većem mjerilu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PRIMJENA KVASACA U BIOTEHNOLOGIJI

Kvasci imaju dugu povijest primjene u biotehnološkoj proizvodnji. Od davnina se koriste za proizvodnju tradicionalnih biotehnoloških i prehrambenih proizvoda kao što su alkoholna pića (pivo i vino), kruh, ocat i dr. Takvi proizvodi dobiveni su uglavnom fermentacijom pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Tamang i Fleet, 2009). Proizvodnja i primjena kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na godišnjoj razini dvostruko je veća od primjene drugih vrsta kvasaca. Ipak, ne-*Saccharomyces* kvasci sve više se koriste i u drugim poljima moderne biotehnologije. Uz primjenu za proizvodnju biogoriva, koriste se u proizvodnji biokemikalija, industrijskih enzima, za *in vivo* transformacije, kao pokazatelji onečišćenja okoliša, u bioremedijaciji i sl. (Branduardi i Porro, 2012). Na slici 1 prikazana su područja u kojima je moguća primjena kvasaca.



Slika 1. Primjena kvasaca u biotehnologiji (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

## 2.2. NE-*Saccharomyces* KVASCI

*Saccharomyces cerevisiae* dio je najvažnije grupe mikroorganizama koji se koriste u biotehnološkoj proizvodnji. Osim primarne, tradicionalne proizvodnje, primjenjuju se u proizvodnji bioetanola, industrijskih enzima, spojeva male molekulske mase i dr. Koristi se kao glavni model eukariotskog organizma u različitim područjima istraživanja (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

Neki tipovi proizvodnje kao što je proizvodnja bioetanola druge generacije, tj. proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, karakteristični su po stresnim uvjetima (npr. prisutnost furana, organskih kiselina, razgradnih spojeva lignina) koji dovode do inhibicije staničnog metabolizma te shodno tome manjim prinosima etanola i nižim produktivnostima bioprocasa. Za razliku od *Saccharomyces cerevisiae*, neke vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca otpornije su na navedene stresne uvjete (Mukherjee i sur., 2017).

Osim navedenog, ne-*Saccharomyces* kvasci pokazuju razna svojstva važna za industrijsku primjenu kao što su korištenje različitih ugljikohidrata, rast pri niskim pH vrijednostima podloge i visokim temperaturama te osmotolerantnost. Evolucija ovih kvasaca tekla je neovisno o evoluciji kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pa se može pretpostaviti da imaju jedinstvene mehanizme preživljavanja koji nisu prisutni kod *Saccharomyces* vrsta. Iako se većina ne-*Saccharomyces* kvasaca u literaturi karakterizira kao kvasci kvarenja zbog izolacije iz kontaminiranih proizvoda (pića i hrane), napretkom tehnologije sekvencioniranja i molekularnog inženjerstva javlja se mogućnost otkrivanja molekularne osnove zbog koje ovi kvasci imaju superiornu otpornost prema nepovoljnim/stresnim uvjetima u odnosu na *Saccharomyces* kvasce (Radecka i sur., 2015).

Visoka osmotolerantnost uočena je kod kvasca *Zygosaccharomyces rouxii*, koji može rasti na koncentracijama šećera do 90 % (w/v) (Membré i sur., 1999). Otpornost na visoke temperature, odnosno svojstvo termotolerancije pokazuje kvasac *Kluyveromyces marxianus* koji raste na temperaturama od 47, 49 i 52 °C te proizvodi etanol na temperaturama iznad 40 °C. Još jedna vrsta koja pripada skupini termotolerantnih kvasaca je *Ogataea polymorpha* koja može rasti na temperaturama višim od 50 °C (Kata i sur., 2016; Banat i sur., 1992).



*Zygosaccharomyces bailii* kvasac je poznat po visokoj otpornosti na octenu kiselinu. Može rasti pri koncentraciji octene kiseline od 24 g L<sup>-1</sup>, za razliku od *S. cerevisiae* koji može rasti pri koncentraciji octene kiseline do 9 g L<sup>-1</sup> (Arneborg i sur., 2000).

### 2.2.1. Kvasac *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces marxianus* prvi put je opisan 1888. od strane E. C. Hansena. U to vrijeme ovaj kvasac bio je klasificiran kao mikroorganizam iz roda *Saccharomyces*, naziva *Saccharomyces marxianus*, dobivenog prema prvoj osobi koja ga je izolirala iz grožđa, Marxu. Lodder i Kreger-van-Rij su u svojoj monografiji 1952. naveli deset sojeva kvasaca *Saccharomyces marxianus* koji se razlikuju prema mogućnosti asimilacije i rasta na laktozi kao supstratu te nastanku pseudomicelija. Zbog razlika u morfologiji askusa i spora, svojstva fermentacije i oksidacije različitih šećera te mogućnosti hibridizacije među sojevima u odnosu na tipične *Saccharomyces* kvasce, javila se potreba za promjenom klasifikacije *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus* i *Saccharomyces lactis* u novo nazivlje. Van der Walt je 1956. opisao novi rod *Kluyveromyces*, odnosno vrstu *Kluyveromyces polysporus*, koja je pokazivala ista svojstva kao i navedene tri *Saccharomyces* vrste te su klasificirani u rod *Kluyveromyces*. Kroz povijest se taksonomija i broj vrsta unutar roda *Kluyveromyces* mijenjao, a 2003. su Kurtzman i Robnett prema filogenetskim svojstvima odredili šest vrsta roda *Kluyveromyces* (Fonseca i sur., 2008).

Istraživanja su pokazala da *Kluyveromyces marxianus* pripada skupini Crabtree-negativnih kvasaca, odnosno nije primijećeno stvaranje etanola u aerobnim uvjetima uz dovoljnu koncentraciju supstrata. Naime, kad se uključi oksido-reduktivni metabolizam navedenog kvasca, uslijed povećanja glikolitičkog fluksa ne dolazi do postizanja maksimalnog respiratornog kapaciteta stanica kao što je slučaj kod *Saccharomyces cerevisiae* (Van Urk i sur., 1990).

Osnovne karakteristike koje kvascu *K. marxianus* daju prednost pred drugim kvascima u industrijskoj proizvodnji su brz rast, termotolerantnost i proizvodnja etanola uz nastajanje minimalnih količina nusprodukata fermentacije (Lane i sur., 2011).

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* može se koristiti za proizvodnju etanola na višim temperaturama u odnosu na kvasac *S. cerevisiae* uz potencijalnu uštedu energije. Osim smanjenih troškova hlađenja, pri povišenim temperaturama postiže se veća brzina saharifikacije te fermentacije. Nedostatak ovakvog načina proizvodnje je niži prinos etanola te moguć utjecaj na vitalnost stanice zbog rada na povišenoj temperaturi (Lane i sur., 2011; Fonseca i sur., 2008).

Osim za proizvodnju bioetanola, *Kluyveromyces marxianus* koristi se u bioprocima za proizvodnju različitih industrijskih enzima kao što su inulinaza,  $\beta$ -galaktozidaza,  $\beta$ -glukozidaza i endopoligalaktorunaza. Ovaj kvasac se koristi i kao izvor enzima koji se rjeđe primjenjuju u industriji, a to su protein-fosfataze, karboksipeptidaze te aminopeptidaze. U tablici 1 se može vidjeti pregled dosad izoliranih enzima koje proizvodi kvasac *Kluyveromyces marxianus* i drugi kvasci iz ovog roda te njihovu moguću upotrebu (Fonseca i sur., 2008).

**Tablica 1.** Enzimi koje proizvode kvasci iz roda *Kluyveromyces* te njihova upotreba (Fonseca i sur., 2008)

Enzim	Upotreba	Soj	Referenca
<b>Inulinaza</b>	proizvodnja fruktoznog sirupa iz zaliha hranjivih tvari koje sadrže inulin	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424; <i>K. marxianus</i> CBS 6397; <i>K. marxianus</i> CBS 6556	Workman i Day (1984); Rouwenhorst i sur. (1988); Rouwenhorst i sur. (1990a,b)
<b><math>\beta</math>-galaktozidaza</b>	redukcija laktoze sadržane u hrani	<i>K. fragilis</i> (several strains); <i>K. marxianus</i> NCYC 111; <i>K. marxianus</i> ATCC 10022; <i>K. marxianus</i> IMB3; <i>K. marxianus</i> CBS 6556	Mahoney i sur. (1975); Gonçalves i Castillo (1982); Bacci i sur. (1996); Brady i sur. (1995); Martins i sur. (2002)
<b><math>\beta</math>-glukozidaza</b>	hidroliza celuloznih materijala	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	Raynal i Guerineau (1984); Leclerc i sur. (1987)
<b>endo-poligalaktorunaza</b>	smanjenje viskoznosti u produktima prerade voća	<i>K. marxianus</i> CCT 3172; CCT 3172 (mutant); neidentificiran izolat (NCYC)	Jia i Wheals (2000)
<b>protein fosfataza</b>	modifikacija sira	<i>K. marxianus</i> (neodređen soj)	Jolivet i sur. (2001)
<b>karboksipeptidaza</b>	smanjenje gorkog okusa hrane koja sadrži proteine	<i>K. marxianus</i> (vlastiti izolat)	Ramírez-Zavala i sur. (2004b)
<b>aminopeptidaza</b>	izravna prerada ili starenje mliječnih ili proizvoda prerade mesa	<i>K. marxianus</i> (vlastiti izolat)	Ramírez-Zavala i sur. (2004a)

Uz kvasac *Kluyveromyces marxianus*, treba spomenuti kvasac *Kluyveromyces lactis* koji je izabran kao modelna vrsta unutar roda *Kluyveromyces*. Pripada skupini Crabtree-negativnih kvasaca, a može koristiti i laktozu kao izvor ugljika. Jedan od razloga zašto je *Kluyveromyces lactis* izabran kao modelna vrsta je nedovoljna istraženost te razumijevanje fiziologije vrste *Kluyveromyces marxianus*. Sve češća upotreba kvasca *Kluyveromyces marxianus* proizašla je iz raznih prednosti kao što su rast na različitim supstratima, rast pri višim temperaturama i mogućnost proizvodnje etanola pri višim koncentracijama šećera u odnosu na *Kluyveromyces lactis*. Također treba uzeti u obzir raznolikost izvora iz kojih su izolirani sojevi kvasca *Kluyveromyces marxianus*, koja za posljedicu ima metaboličku raznolikost te raznovrsniju primjenu u biotehnološkim procesima (Fonseca i sur., 2008).

Nekoliko sojeva *Kluyveromyces marxianus* imaju GRAS (eng. General ly Regarded As Safe) status pa ne postoji takva vrsta prepreke u korištenju navedenog kvasca u industrijskoj proizvodnji. Vrste koje su označene GRAS statusom mogu se industrijski primijeniti u proizvodnji aromatičnih spojeva (voćni esteri, furani, karboksilne kiseline, alkoholi, izoamil-acetat i dr.) (Zhang i sur., 2020a).

Za *Kluyveromyces marxianus* poznato je da proizvodi različite ekstracelularne enzime (tablica 1). To je još jedna značajna prednost, obzirom da se smanjuju troškovi procesa izdvajanja i pročišćavanja, odnosno „downstream“ procesa. Ova vrsta kvasca proizvodi enzim pektinazu koja se koristi u prerađivanju voćnih sokova, maceraciji povrća, ekstrakciji ulja i formulaciji hrane za životinje. Još jedan od ekstracelularnih enzima koje proizvodi ovaj kvasac je endopoligalakturonaza te u odnosu na proizvodnju s pomoću plijesni iz roda *Aspergillus* ima određene ekonomske prednosti. Najviše endopoligalakturonaze proizvodi se u stacionarnoj fazi, za razliku od pektinaza koje se uglavnom proizvode u eksponencijalnoj fazi rasta. Industrijski vrlo bitan enzim, inzulinaza je također jedan od enzima koji se mogu proizvesti s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Uloga inulinaze je da provodi endohidrolizu  $\beta$ -(2,1,-)D-fruktozidnih veza u inulinu te se ovaj enzim može koristiti u proizvodnji fruktoznog sirupa iz inulina (Fonseca i sur., 2008).

Nadalje, *Kluyveromyces marxianus* može poslužiti kao izvor oligonukleotida koji se koriste kao pojačivači okusa u prehrambenim proizvodima, kao prebiotici te imunostimulatori dodani mliječnim proizvodima (Scharpf i sur., 1986).

Još jedna grana u kojoj se može koristiti navedeni mikroorganizam je bioremedijacija, za uklanjanje bakrenih i olovnih iona iz otpadnih voda, koristeći melasu kao izvor hranjive tvari (Aksu i Dönmez, 2000).

### 2.3. METABOLIZAM KVASCA *Kluyveromyces marxianus*

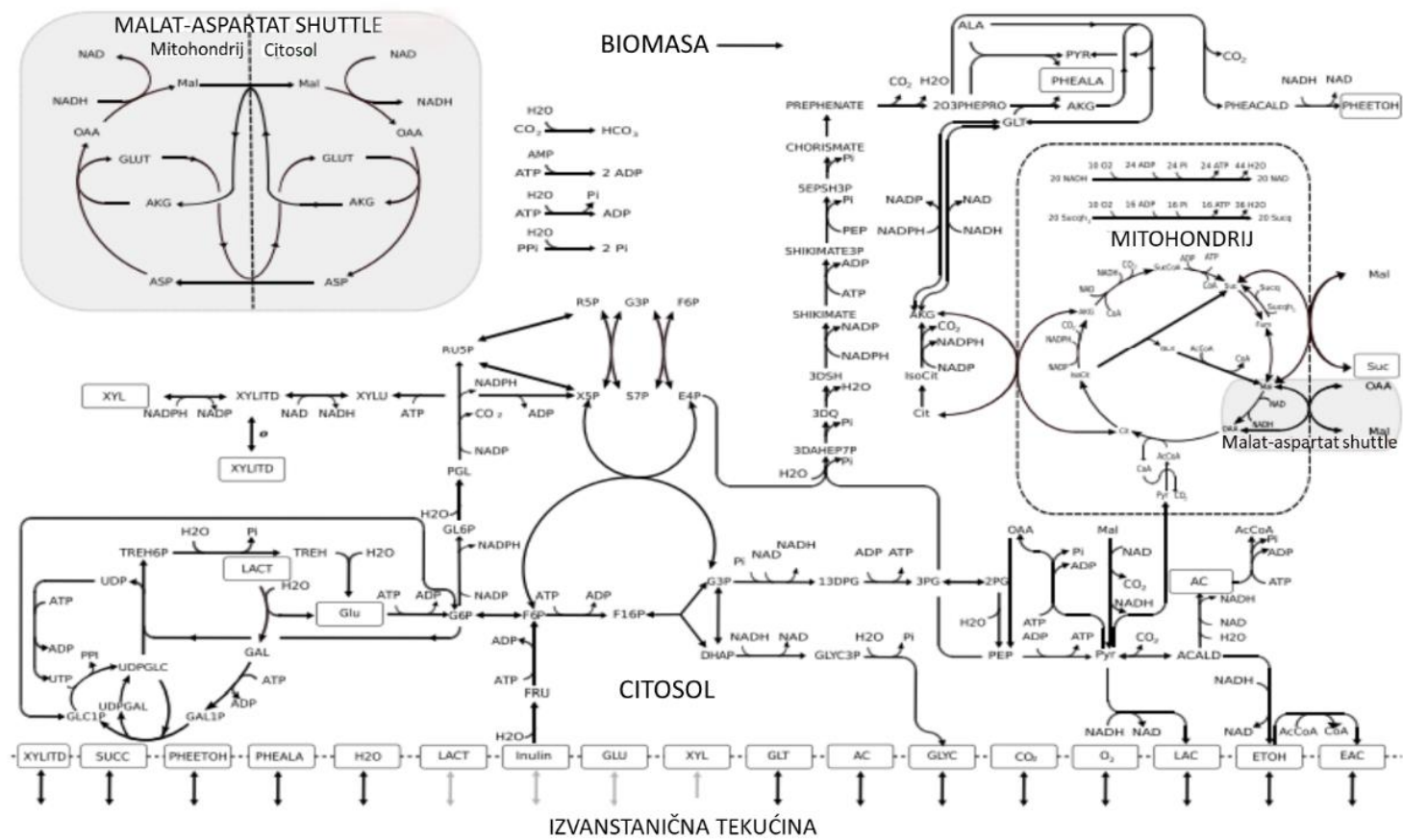
Iako se tradicionalno klasificira kao Crabtree-negativan kvasac, neke studije pokazuju prisutan pozitivan Crabtree učinak kod navedenog kvasca jer je sposoban istovremeno provoditi respiratorni metabolizam i fermentaciju. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* vrlo je djelotvoran proizvođač etanola te se kategorizira kao jedan od brzorastućih mikroorganizama među eukariotima sa specifičnom brzinom rasta od 0,6 do 0,8 h<sup>-1</sup> (Lane i Morrisay, 2010).

Kvasac *K. marxianus* može rasti na glukozi, fruktozi, ksilozi, galaktozi, laktozi i inulinu kao jedinim izvorima ugljika prisutnim u hranjivoj podlozi (Pentjuss i sur., 2017). Transport i metabolizam izvora ugljika kod kvasca *K. marxianus* prikazan je na slici 2.

Specifičan je po tome što može koristiti laktozu kao izvor ugljika, za razliku od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Laktoza je prisutna u sirutki koja predstavlja jeftinu kompleksnu sirovinu za rast mikroorganizama, a dostupna je u velikim količinama (Zafar i Owais, 2006). Korištenje laktoze kao izvora ugljika omogućuju mu dva do sada identificirana gena, a to su LAC12, koji kodira laktoza permeazu potrebnu za transport laktoze u stanicu i LAC4, koja kodira za enzim  $\beta$ -galaktozidazu koja hidrolizira laktozu u monomere glukozu i galaktozu. Rast na ksilozi druga je prednost ovog kvasca u odnosu na kvasac *S. cerevisiae* te daje mogućnost korištenja ovog kvasca u proizvodnji etanola i biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina (Lane i Morrisay, 2010).

Osim navedenih šećera, kvasac može rasti i na galaktozi dok je prisutna kao jedini izvor ugljika. Ako su u podlozi prisutni drugi šećeri kao glukoza ili laktoza, dolazi do kataboličke represije izvorom ugljika te se primarno troše navedeni šećeri, a tek onda galaktoza (Beniwal i sur., 2017). *Kluyveromyces marxianus* može koristiti arabinozu kao izvor ugljika pri čemu proizvodi arabitol, ali ju ne može fermentirati do etanola (dobivaju se neznatni prinosi etanola) (Du i sur., 2019; Rodussamee i sur., 2011).

Glicerol je tipični nusprodukt fermentacije etanola, a nastaje kao odgovor na potrebu uravnoteženja citoplazmatske oksidacije NADH u slučajevima kad nije moguća oksidacija NADH putem lanca za transport elektrona, odnosno kod ograničene opskrbe kisikom (Pentjuss i sur., 2017). Glicerol također može služiti kao supstrat, odnosno sirovina u bioprocesima, budući da je učinkoviti ko-supstrat za proizvodnju NADPH tijekom redukcije ksiloze u ksilitol pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* (Zhang i sur., 2020b).



Slika 2. Transport i metabolizam ugljika kod kvasca *K. marxianus* (prilagođeno iz Pentjuss i sur., 2017)

## 2.4. UTJECAJ TEMPERATURE NA RAST I AKTIVNOST KVASCA

Poznato je da na rast mikroorganizma u određenoj okolini, utjecaj imaju razni parametri kao što su temperatura, pH i raspoloživost hranjivih tvari. Ako neki od navedenih uvjeta nisu optimalni za mikroorganizam, mogu imati negativan utjecaj na njegov rast (Ho i Powel, 2014).

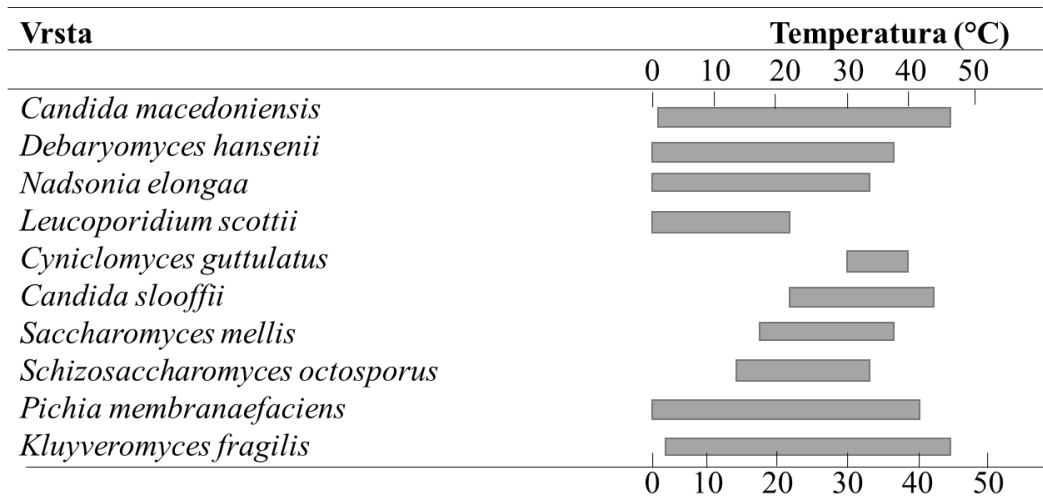
Mikroorganizmi u svom prirodnom staništu mogu rasti u temperaturnom rasponu od -10 °C do 110 °C. S obzirom na temperaturu rasta, mikroorganizmi se mogu podijeliti u tri glavne skupine:

- 1.) PSIHROFILI (od 0 °C do 20 °C ) koji mogu rasti u antarktičkom i arktičkom ledu te u dubokim oceanima. Ovoj skupini pripadaju uglavnom alge, bakterije, gljive i protozoe.
- 2.) MEZOFILI (od 20 °C do 45 °C ) kojima pripada većina kvasaca.
- 3.) TERMOFILI (od 45 °C do više od 90 °C) mogu rasti u vulkanskim izvorima, zemljištu i u vrućim izvorima, kao i u stajskom gnojivu.

Za svaki mikroorganizam postoji minimalna, optimalna i maksimalna temperatura razvoja koje ovise o nizu čimbenika (starost, uvjeti okoline, enzimi organizma i dr.) (Duraković i Redžepović, 2002; Duraković, 1996).

Temperatura je jedan od najvažnijih fizičkih parametara koji imaju izravan utjecaj na rast kvasaca. Većina kvasaca koji se koriste za proizvodnju etanola su mezofilni mikroorganizmi koji mogu rasti u rasponu temperature od 0 °C do 40 °C. Ipak za rast kvasaca iz roda *Saccharomyces*, poželjno je da temperatura bude između 25 i 35 °C (Ho i Powel, 2014). Na slici 3 prikazani su rasponi temperatura pri kojima mogu rasti neke vrste kvasaca.





**Slika 3.** Rasponi temperatura u kojima mogu rasti neke vrste kvasaca (prilagođeno iz Van Uden, 1985)

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* može rasti u velikom rasponu temperatura. Iako je karakteriziran kao termofilni mikroorganizam, pri temperaturama višim od 40 °C dolazi do inhibicije rasta. Vivier i sur. (1993) određivali su utjecaj fizikalno-kemijskih uvjeta na dva različita soja kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Dobiveni rezultati su pokazali da je minimalna temperatura rasta za oba soja bila -1 °C, optimalna temperatura 36 °C, a rast oba kvasca bio je inhibiran pri temperaturama od 44, odnosno 48 °C. Većina ostalih provedenih istraživanja pokazala su da optimalna temperatura za rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* tijekom proizvodnje  $\beta$ -galaktozidaze iznosi 30 °C (Furlan i sur., 2001; Rech i sur., 1999; Fiedurek i Sczcodrak, 1994). Istraživanja su pokazala da je optimalna temperatura za proizvodnju etanola pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* 40 °C (Yanasa i sur., 2010; Banat i sur., 1996).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam u ovom radu korišten je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 iz zbirke organizama NBRC Culture Collection (NBRC, Japan), a izoliran je iz tla u Japanu.

##### 3.1.2. Kemikalije

Popis, čistoća i podrijetlo kemikalija koje su korištene u radu nalazi se u tablici 2.

**Tablica 2.** Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
YPD broth	za upotrebu u biotehnologiji	Fisher BioReagents, SAD
agar	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
glukoza monohidrat	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov sulfat 7-hidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
sumporna kislina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka

##### 3.1.3. Hranjive podloge

Čista kultura kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 održavana je na čvrstim YPD hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i za provedene uzgoje bila je YPD tekuća podloga. Sastav korištenih podloga prikazan je u tablici 3.

**Tablica 3.** Sastav tekuće i čvrste YPD podloge

Komponenta podloge	Tekuća YPD podloga	Čvrsta YPD podloga
glukoza (g L <sup>-1</sup> )	20	20
kvašičev ekstrakt (g L <sup>-1</sup> )	10	10
pepton (g L <sup>-1</sup> )	20	20
agar (g L <sup>-1</sup> )	-	20

### 3.1.4. Aparatura i pribor

#### 3.1.4.1. Spektrofotometar

Za određivanje optičke gustoće ( $\lambda = 600$  nm) uzoraka izuzetih tijekom uzgoja korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Optička gustoća uzoraka određena je u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

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

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), sastoji se od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10  $\mu$ L, a protok mobilne faze (0,0025 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

### *3.1.4.3. Ostala oprema i programi*

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija);
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20  $\mu\text{m}$ , 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- SigmaPlot ver 11.0 (Systat Software, SAD)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Čvrste hranjive podloge pripravljene su tako što se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana masa komercijalno dostupne YPD podloge (50 g L<sup>-1</sup>; Fisher BioReagents, SAD) i agara (20 g L<sup>-1</sup>; Liofilchem, Italija). Zatim se hranjiva podloga sterilizirala u autoklavu (121 °C/20 minuta) i izlivala u Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima. Na ohlađenu hranjivu podlogu nacijepnjene su kulture kvasca pomoću mikrobiološke ušice.

Podloge za uzgoj inokuluma pripravljene su tako da se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana količina komercijalno dostupne YPD podloge (50 g L<sup>-1</sup>; Fisher BioReagents, SAD). Po 10 mL podloge prebačeno je u epruvete i sterilizirano u autoklavu (121 °C/20 min). Tako pripravljena podloga služila je za uzgoj inokuluma za uzgoje u većem mjerilu.

Za uzgoj kvasca korištena je YPD podloga. Podloga se pripravna tako da se u 250 mL demineralizirane vode doda izračunata količina komercijalno dostupne YPD podloge (50 g L<sup>-1</sup>; Fisher BioReagents, SAD). Tako pripravljene podloge sterilizirane su u autoklavu (121 °C/20 min).

### 3.2.2. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Tekuće YPD podloge (V = 250 mL; pripravljena kao što je opisano u poglavlju 3.2.1) u tikvicama inokulirane su s 5 % (vol/vol) inokuluma uzgojenog preko noći (≈ 18 h/28 °C). Uzgoj je proveden u anaerobnim uvjetima (za postizanje anaerobnih uvjeta korištene su vrelnjače) na magnetnoj miješalici ( $n = 200 \text{ min}^{-1}$ ) pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C). Uzorci za analizu uzimani su u redovitim vremenskim intervalima. U izuzetim uzorcima određivana je optička gustoća pri 600 nm (poglavljje 3.3.1.), koncentracija biomase kvasca (poglavljje 3.3.2.) te je UPLC analizom određena koncentracija supstrata i produkata fermentacije (poglavljje 3.3.3.). Iz određenih vrijednosti izračunati su neki parametri bioprocasa (poglavljje 3.4.).

### 3.3. ANALITIČKE METODE

#### 3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka

Optička gustoća uzoraka određivana je pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) pri valnoj duljini od 600 nm ( $OD_{600}$ ). Mjerena je optička gustoća prvog decimalnog razrjeđenja uzorka.

#### 3.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca

Nakon izuzimanja uzorka, 5 mL uzorka preneseno je u prethodno izvaganu plastičnu kivetu te je zatim centrifugirano 5 minuta pri 6000 okretaja/min (centrifuga SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen, a talog je stavljen na sušenje pri 100 °C do konstantne mase. Nakon toga kivete su ohlađene u eksikatoru te im je izvagana masa. Koncentracije biomase kvasca,  $\gamma_X$  ( $g L^{-1}$ ), određena je prema sljedećoj ovisnosti:

$$\gamma_X = \frac{m_{kb} - m_k}{V_{uz}} \quad [g L^{-1}] \quad [3-1]$$

gdje je

$m_{kb}$  - masa kivete s biomasom [g]

$m_k$  - masa prazne kivete [g]

$V_{uz}$  - volumen uzorka [L]

#### 3.3.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata fermentacije UPLC metodom

Koncentracije supstrata (glukoza) i produkata fermentacije (etanol, glicerol, octena kiselina) određene su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC; poglavlje 3.1.4.2.). Uzorci za UPLC analizu pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.3.3.1. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa OpenLAB CDS, a nepoznate koncentracije detektiranih spojeva u uzorcima određene su prema jednadžbama baždarnih dijagrama (tablica 4).

**Tablica 4.** Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, $t_R$ (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
<b>Etanol</b>	11,1000 ± 0,0000	$A = 361299,75 \gamma_{\text{Etanol}} + 27468,6$	1,0000
<b>Glicerol</b>	7,0067 ± 0,0007	$A = 120817 \gamma_{\text{Glicerol}} - 3671,6$	0,9997
<b>Glukoza</b>	4,7000 ± 0,0000	$A = 132342 \gamma_{\text{Glukoza}} + 1503,7$	0,9999
<b>Octena kiselina</b>	7,7924 ± 0,0045	$A = 8664,6 \gamma_{\text{Octena kiselina}} - 67,234$	0,9992

A= površina

### 3.3.3.1. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (poglavlje 3.3.2.) korišten je za pripremu uzoraka za UPLC analizu. Po 750  $\mu\text{L}$  supernatanta uzorka dodano je u 750  $\mu\text{L}$  otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100  $\text{g L}^{-1}$ . Dobivena otopina zatim se intenzivno izmiješala 20 sekundi i ostavila na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000 o/min. Centrifugiranjem su istaloženi proteini i nečistoće. Tako dobiven uzorak zatim je razrijeđen tako što smo 750  $\mu\text{L}$  uzorka dodali u 750  $\mu\text{L}$  demineralizirane vode. Razrijeđeni uzorci su zatim profiltrirani kroz filter s porama veličine 0,20  $\mu\text{m}$ . Tako pripremljeni uzorci korišteni su za UPLC analizu.

### 3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

#### 3.4.1. Prinos biomase ( $Y_X$ )

$$Y_X = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3-2]$$

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

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

#### 3.4.2. Prinos produkta ( $Y_P$ )

$$Y_P = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3-3]$$

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

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

#### 3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ( $Y_{X/S}$ )

$$Y_{X/S} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-4]$$

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

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

(Marić i Šantek, 2009).

#### 3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ( $Y_{P/S}$ )

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-5]$$

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

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

(Marić i Šantek, 2009).

#### 3.4.5. Brzina potrošnje supstrata ( $r_{\text{glc}}$ )

$$\ln(S) = r_S \cdot t + b \quad [3-6]$$



3.4.6. Brzina nastajanja produkta ( $r_p$ )

$$\ln(P) = r_p \cdot t + b \quad [3-7]$$

Gdje P može bit etanol (EtOH) ili glicerol

3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase ( $\mu_m$ )

$$\ln(X) = \mu_m \cdot t + b \quad [3-8]$$

3.4.8. Produktivnost ( $Pr$ )

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad [3-9]$$

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

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

$t_U$ - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 odabran je između 16 različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasca kao mikroorganizam koji može rasti na gotovo svim ugljikohidratima prisutnim u lignoceluloznim sirovinama te može rasti u podlozi s visokim koncentracijama organskih kiselina (Lončar, 2019; Mrak, 2019). Kako do sada nisu poznati osnovni biokinetički i procesni parametri rasta i proizvodnje etanola i drugih produkata fermentacije kvasca *K. marxianus* NBRC 1777, u ovom radu proveden je uzgoj ovog ne-*Saccharomyces* kvasca u YPD podlozi pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C) u anaerobnim uvjetima. Na temelju ovih rezultata mogu se odrediti optimalni procesni parametri za proizvodnju etanola s pomoću ovog kvasca u većem mjerilu.

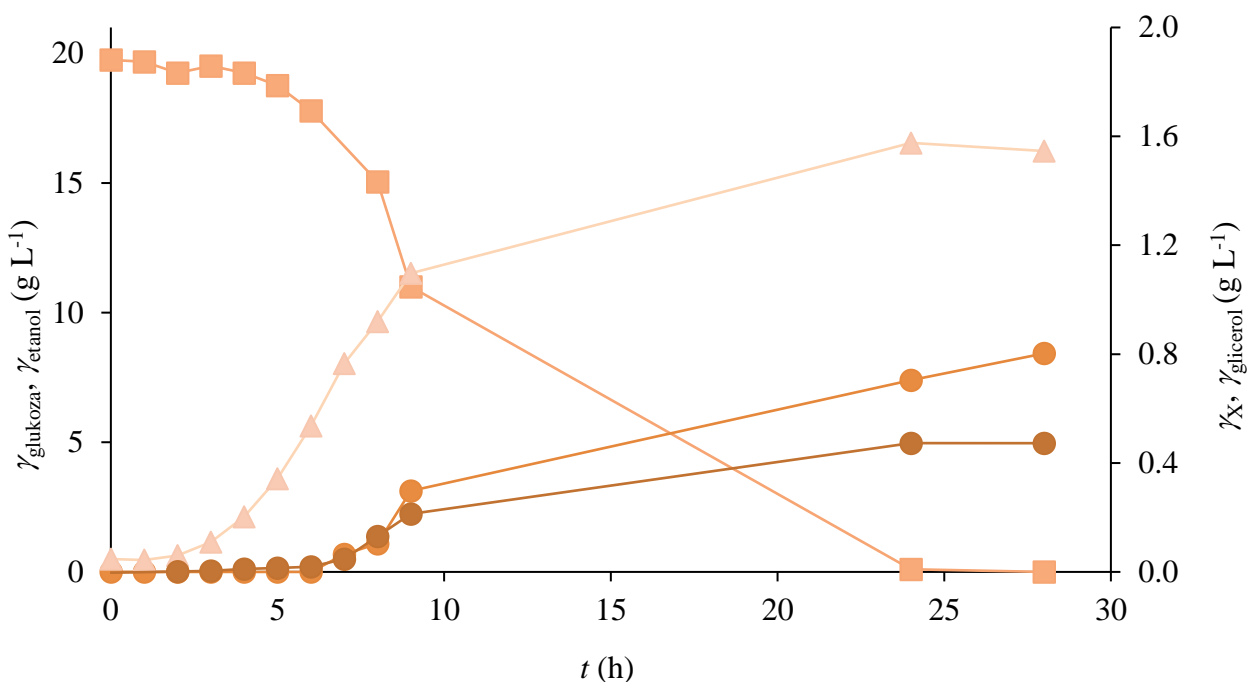
Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- a) Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 20 °C (poglavljje 4.1.)
- b) Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 30 °C (poglavljje 4.2.)
- c) Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 40 °C (poglavljje 4.3.)
- d) Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 50 °C (poglavljje 4.4.)
- e) Određivanje kinetičkih parametara za proizvodnju etanola s pomoću kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 (poglavljje 4.5.)

#### 4.1. UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 U YPD PODLOZI PRI 20 °C

Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 proveden je u YPD podlozi koja je sadržavala kvašćev ekstrakt ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), pepton ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) i glukozu ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). Uzgoj je proveden na magnetnoj miješalici pri brzini okretaja miješala od  $200 \text{ min}^{-1}$  u anaerobnim uvjetima pri temperaturi od  $20 \text{ °C}$ . Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće podloge pri  $600 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{600}$ , vidi prilog 7.2.), koncentracija suhe tvari biomase (poglavlje 3.3.2.), koncentracije glukoze i produkata fermentacije poput etanola, glicerola i octene kiseline (poglavlje 3.3.3.).

Na slici 4 prikazana je promjena glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri  $20 \text{ °C}$  u anaerobnim uvjetima, a u tablici 5 prikazani su pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri  $20 \text{ °C}$  u anaerobnim uvjetima. Anaerobni uvjeti tijekom uzgoja osigurani su korištenjem vrelnjače.



**Slika 4.** Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (▲), etanola (●) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri  $20 \text{ °C}$  u anaerobnim uvjetima

Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 20 °C, može se uočiti da se kvasac u fazi prilagodbe nalazi vrlo kratko ( $t_{lag} = 1$  h; slika 4, tablica 5), dok vrijeme trajanja eksponencijalne faze iznosi oko 8 h. Bioprocen proizvodnje etanola s pomoću ovog kvasca praćen je 28 h, tijekom kojeg je kvasac utrošio svu glukozu iz podloge i proizveo 8,43 g L<sup>-1</sup> etanola uz koeficijent konverzije glukoze u etanol od 0,43 g g<sup>-1</sup> te produktivnost od 0,6 g<sub>EIOH</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (tablica 5). U svom istraživanju 1987., Bajpai i Margaritis određivali su utjecaj temperature i pH na proizvodnju etanola iz ekstrakta jeruzalemske artičoke s pomoću imobiliziranih stanica kvasca *K. marxianus*. Pri uzgoju na 25 °C, proizvedeno je 44,5 g<sub>EIOH</sub> L<sup>-1</sup> uz koeficijent konverzije šećera u etanol od 0,485 g g<sup>-1</sup>.

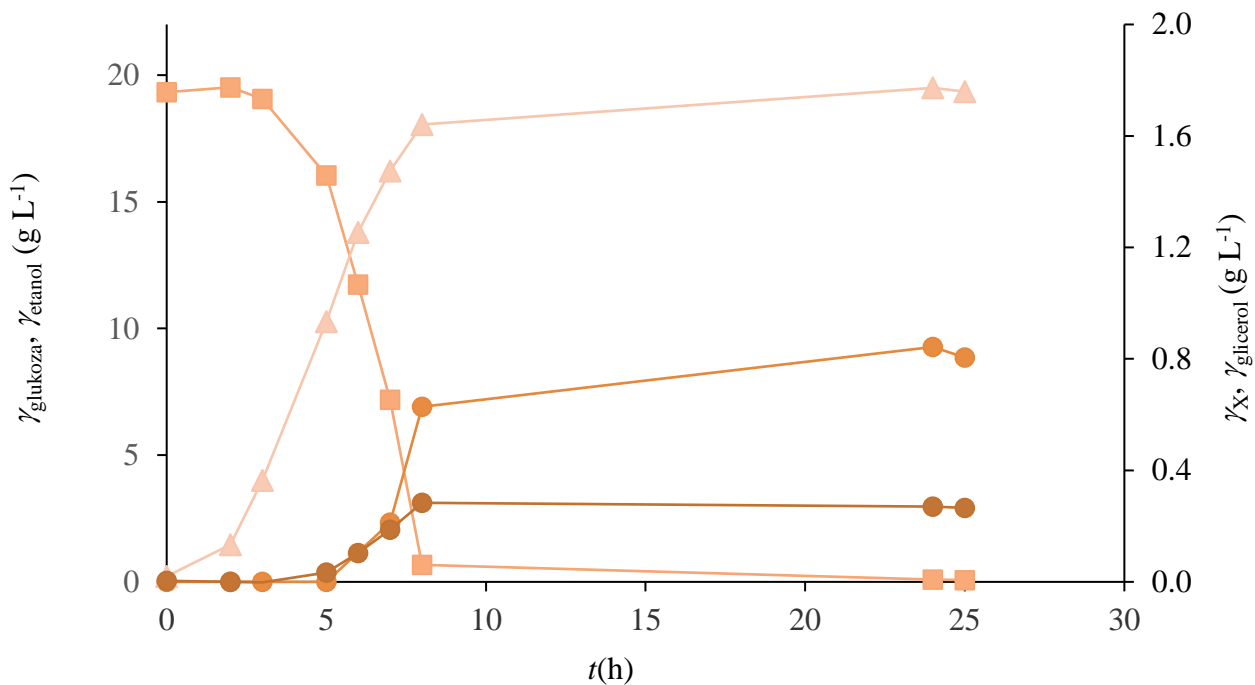
Osim etanola, ovaj kvasac u navedenim uvjetima proizvodi male količine glicerola ( $\gamma_{glicerol} = 0,47$  g L<sup>-1</sup>), uz koeficijent konverzije glukoze u glicerol od 0,02 g g<sup>-1</sup> (slika 4, tablica 5). Octena kiselina nije detektirana tijekom ovog uzgoja. Ostali biokinetički parametri poput specifične brzine rasta, brzine potrošnje supstrata i brzine proizvodnje produkata prikazani su grafički (slike 8-11) u poglavlju 4.5. kako bi se lakše vizualno i računski odredio trend promjene navedenih vrijednosti s promjenom temperature uzgoja.

**Tablica 5.** Pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 20 °C u anaerobnim uvjetima

$t_{lag}$	1 h
$t_{eksp}$	8 h
$Y_{X/S}$	0,08 g g <sup>-1</sup>
$Y_{etanol/S}$	0,43 g g <sup>-1</sup>
$Y_{glicerol/S}$	0,02 g g <sup>-1</sup>
$Pr_X$	0,06 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{etanol}$	0,30 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{glicerol}$	0,02 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

#### 4.2. UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 U YPD PODLOZI PRI 30 °C

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 uzgojen je i u YPD podlozi pri 30 °C (slika 5) u istim uvjetima ( $n = 200 \text{ min}^{-1}$ , anaerobno). I tijekom ovog uzgoja praćena je promjena glukoze, biomase i produkata fermentacije (etanola i glicerola). Iz dobivenih rezultata izračunati su osnovni biokinetički parametri (tablica 6).



**Slika 5.** Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (▲), etanola (●) i glicerola (X) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 30 °C u anaerobnim uvjetima

Faza prilagodbe, odnosno lag faza trajala je 1 h dok je trajanje eksponencijalne faze iznosilo 7 h. Za razliku od uzgoja provedenog pri 20 °C, trajanje eksponencijalne faze značajno je kraće te je kvasac već nakon 8 sati utrošio gotovo svu glukozu iz podloge ( $\gamma_{\text{glukoza}, 8\text{h}} = 0,67 \text{ g L}^{-1}$ ; slika 5). U anaerobnim uvjetima glavni produkt fermentacije je etanol ( $\gamma_{\text{etanol}, 25\text{h}} = 8,86 \text{ g L}^{-1}$ ; slika 5). Koeficijent konverzije glukoze u etanol 15 % je veći od koeficijenta konverzije glukoze u etanol pri uzgoju provedenom pri 20 °C te iznosi  $0,46 \text{ g g}^{-1}$  (tablica 6). Vrijednost produktivnosti od  $0,35 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  je oko 17 % veća od iste vrijednosti određene pri uzgoju provedenom pri 20 °C. Koeficijent konverzije glukoze u glicerol ( $Y_{\text{glicerol/glukoza}} = 0,01 \text{ g g}^{-1}$ ), prinos ( $Y_{\text{glicerol}} = 0,27 \text{ g L}^{-1}$ ) i produktivnost glicerola ( $Pr_{\text{glicerol}} = 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; tablica 6, slika 5) vrlo su niski, slično kao i kod uzgoja provedenog pri 20 °C (tablica 5, slika 4).

Goshima i sur. (2013) proizvodili su bioetanol iz lignoceluloznih sirovina s pomoću kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. Tijekom uzgoja na YPD podlozi pri 30 °C, vođenog 72 h, proizvedeno je  $17,85 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1}$ , što je 50 % više od vrijednosti dobivene u ovom radu, za razliku od koeficijenta konverzije glukoze u etanol koji je iznosio  $0,457 \text{ g g}^{-1}$ , odnosno bio gotovo jednak dobivenoj vrijednosti. Lopez i sur. (2014) ispitali su interakcije između dva kvasca, *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces marxianus*, tijekom fermentacije pri 30 °C u procesu proizvodnje tekile. Istraživanje je pokazalo da osim etanola i biomase kao nusprodukt nastaje određena količina glicerola. Oba kvasca imala su jednak koeficijent konverzije etanola, koji je iznosio  $0,38 \text{ g g}^{-1}$ . Ipak *Kluyveromyces marxianus* postigao je veći koeficijent konverzije glicerola,  $0,046 \text{ g g}^{-1}$ , za razliku od *Saccharomyces cerevisiae* čiji koeficijent konverzije iznosi  $0,037 \text{ g g}^{-1}$ .

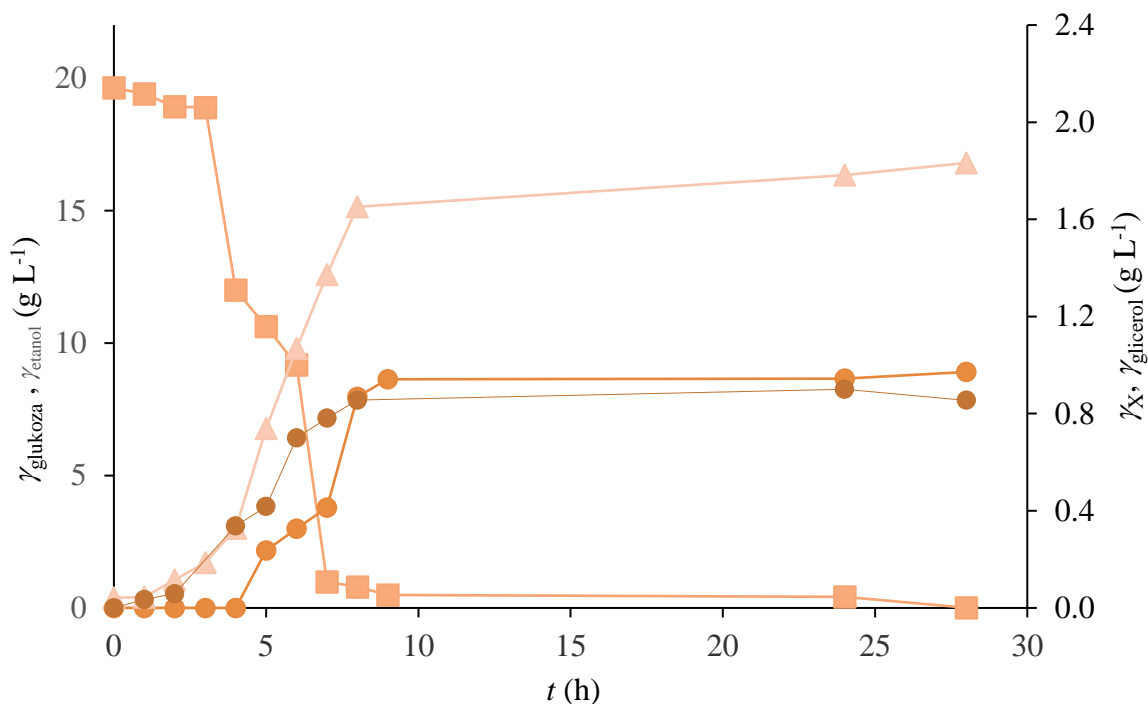
**Tablica 6.** Pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 30 °C u anaerobnim uvjetima

$t_{lag}$	1 h
$t_{eksp}$	7 h
$Y_{X/S}$	0,09 g g <sup>-1</sup>
$Y_{etanol/glukoza}$	0,46 g g <sup>-1</sup>
$Y_{glicerol/glukoza}$	0,01 g g <sup>-1</sup>
$Pr_X$	0,07 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{etanol}$	0,35 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{glicerol}$	0,01 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

#### 4.3. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 40 °C

Kvasac *K. marxianus* je kategoriziran kao termotolerantni kvasac kojim se može proizvoditi etanol i pri temperaturama višim od 40 °C, a određeni sojevi mogu rasti i pri temperaturi od 52°C (Lane i Morrissey, 2010). Stoga je proveden uzgoj ovog kvasca pri 40 °C i pri 50 °C (poglavlje 4.4.) u anaerobnim uvjetima.

Promjena glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 40 °C u anaerobnim uvjetima prikazana je na slici 6, a u tablici 7 prikazani su pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi.



**Slika 6.** Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (▲), etanola (●) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 40°C u anaerobnim uvjetima

Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* pri 40 °C, lag faza trajala je 2 h, a eksponencijalna faza 6 h. Iako je bioproces proizvodnje etanola praćen tijekom 28 h, već nakon 9 h uzgoja iz podloge je iscrpljeno više od 95 % glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}, 9\text{h}} = 0,49 \text{ g L}^{-1}$ ; slika 6) što je za 1 h duže nego kod uzgoja pri 30 °C (slika 5, poglavlje 4.2.). Glavni produkt metabolizma je etanol uz koeficijent konverzije glukoze u etanol od  $0,45 \text{ g g}^{-1}$  i produktivnost procesa od  $0,32 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

U svom istraživanju Abdel-Banat i sur. (2010) uspoređivali su tradicionalni proces proizvodnje etanola s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 na melasi pri temperaturama od 35 do 45 °C. Istraživanje je pokazalo da kvasac *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 pri temperaturama od 35 i 40 °C proizvodi najviše etanola ( $\approx 58 \text{ g L}^{-1}$  nakon 12 h fermentacije) te iscrpi sav supstrat iz podloge, dok pri temperaturi od 45 °C etanol se proizvodi sporije ( $\approx 25 \text{ g L}^{-1}$  nakon 12 h



fermentacije) i tek nakon 24 h procesa je sva saharoza utrošena iz podloge i proizvedeno je oko 48 g L<sup>-1</sup> etanola.

Tijekom svih provedenih uzgoja, proizvodi se glicerol, čiji koeficijent konverzije glukoze u etanol pri temperaturi uzgoja od 40 °C iznosi 0,05 g g<sup>-1</sup>, a produktivnost 0,04 g<sub>glicerol</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Iz literature je poznato da prinos glicerola raste s porastom temperature kod *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca (Ivit i sur., 2020). Prinos glicerola najveći je pri 40 °C ( $Y_{\text{glicerol}} = 0,86 \text{ g L}^{-1}$ ; slika 6).

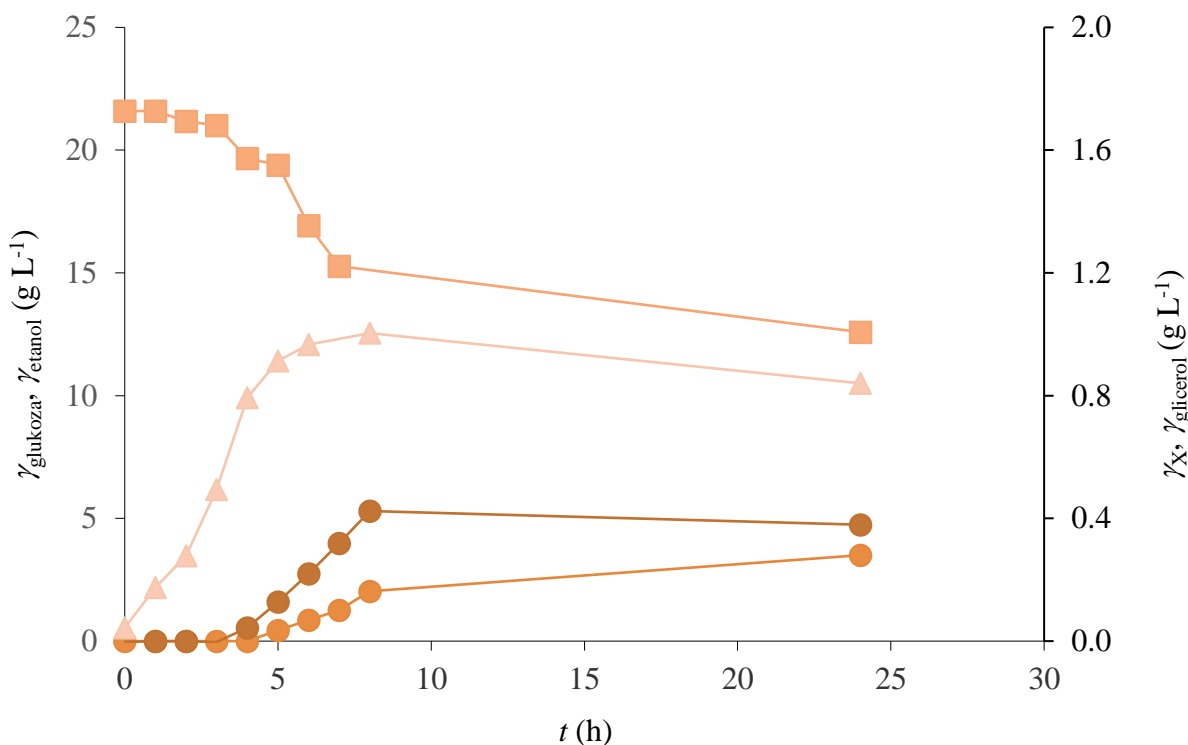
**Tablica 7.** Pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 40 °C u anaerobnim uvjetima

$t_{\text{lag}}$	2 h
$t_{\text{eksp}}$	6 h
$Y_{\text{X/S}}$	0,09 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{etanol/glukoza}}$	0,45 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{glicerol/glukoza}}$	0,05 g g <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{X}}$	0,06 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{etanol}}$	0,32 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{glycerol}}$	0,04 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

#### 4.4. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 50 °C

Kvasac *K. marxianus* može rasti pri temperaturi od 42 °C do 52 °C u aerobnim uvjetima (Abdel-Banat i sur., 2010; Fonseca i sur., 2008), a etanol može proizvoditi u rasponu temperatura od 38 °C do 45 °C (Abdel-Banat i sur., 2010). Autori Anderson i sur. (1986) istraživali su utjecaj visoke temperature na proizvodnju etanola i vijabilnost stanica različitih sojeva kvasaca *K. marxianus* (39 °C do 47 °C).

Stoga je proveden uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 i proizvodnja etanola u YPD podlozi pri 50 °C u anaerobnim uvjetima (slika 7) kako bi se odredila mogućnost provođenja procesa proizvodnje etanola pri 50 °C te odredili osnovni pokazatelji uspješnosti rasta i proizvodnje etanola s pomoću ovog kvasca (tablica 8).



**Slika 7.** Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (▲), etanola (●) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 50 °C u anaerobnim uvjetima

Tijekom uzgoja pri 50 °C ovaj kvasac nije imao fazu prilagodbe ( $t_{\text{lag}} = 0$  h; slika 7, tablica 8), a eksponencijalna faza rasta trajala je svega 5 h nakon čega kvasac ulazi u stacionarnu fazu rasta i fazu odumiranja (slika 7) iako je u podlozi prisutna glukoza. Istraživanja autora Anderson i sur. (1986) o preživljavanju stanica pri temperaturama u rasponu od 39 °C do 47 °C u podlozi sa glukozom i etanolom u koncentraciji od 7 % (vol/vol) pokazuju značajan pad broja živih stanica. Tako pri temperaturi od 47 °C nakon 2 h broj živih stanica je smanjen na 60 do 70 %, nakon 4 h

broj živih stanica pri ovoj temperaturi svega 20 do 25 %, a nakon 12 h sve stanice su bile inaktivirane/mrtve. Stoga se i u ovom radu može pretpostaviti sinergistički efekt visoke temperature i etanola na smanjenje aktivnosti stanica.

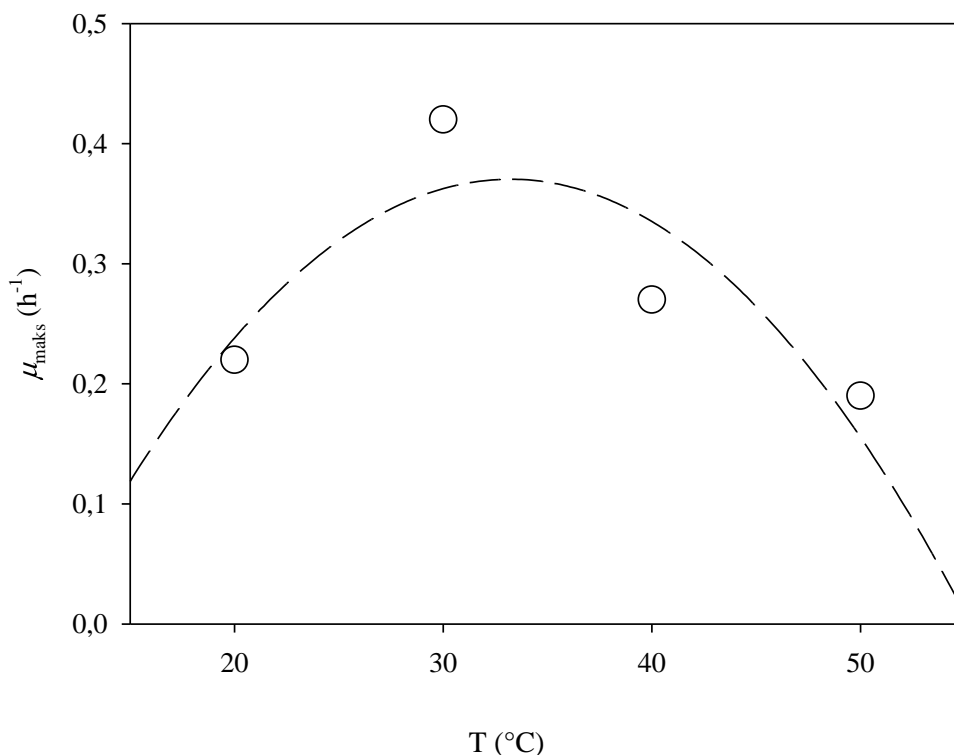
Tijekom ovog procesa proizvedene su vrlo male koncentracije etanola ( $Y_{\text{EtOH}} = 3,50 \text{ g L}^{-1}$ ) stoga su i vrijednosti za koeficijent konverzije glukoze u etanol i produktivnost procesa proizvodnje etanola (računato na  $S_0$ ) su vrlo niske te možemo zaključiti da je temperatura od 50 °C previsoka za proizvodnju etanola i rast stanica ovog kvasca, iako se radi o termotolerantnom kvascu. Iz dobivenih rezultata možemo uočiti i ostali pokazatelji uspješnosti procesa imaju značajno niže vrijednosti od onih određenih pri 30 °C odnosno 40 °C.

**Tablica 8.** Pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 i proizvodnje etanola u YPD podlozi pri 50 °C u anaerobnim uvjetima

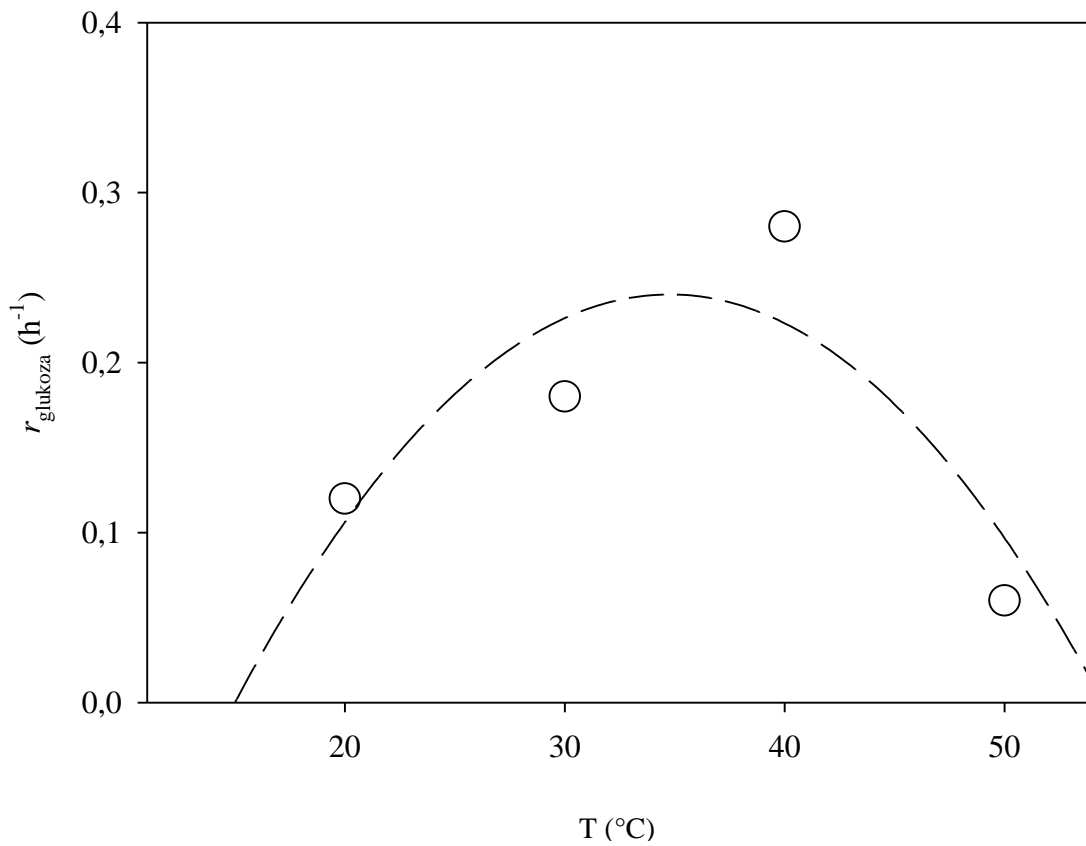
$t_{\text{lag}}$	0 h
$t_{\text{eksp}}$	5 h
$Y_{\text{X/S}}$	0,04 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{etanol/S}}$	0,16 g g <sup>-1</sup>
$Y_{\text{glicerol/S}}$	0,02 g g <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{X}}$	0,04 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{etanol}}$	0,15 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$Pr_{\text{glicerol}}$	0,02 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

#### 4.5. ODREĐIVANJE OPTIMALNIH KINETIČKIH PARAMETARA ZA PROIZVODNJU ETANOLA S POMOĆU KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777

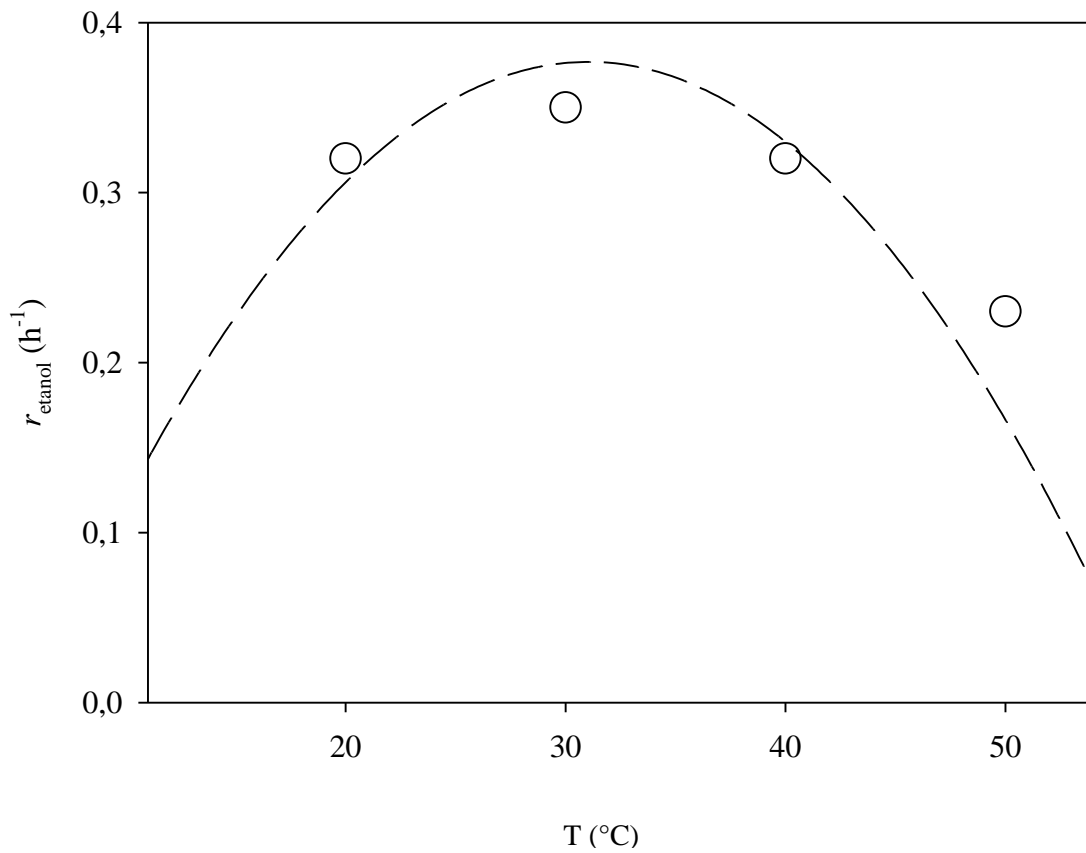
Uz prikazane promjene glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom uzgoja kvasca pri različitim temperaturama te izračunate pokazatelje uspješnosti procesa (poglavlje 4.1.-4.4.), izračunati su kinetički parametri (specifična brzina rasta,  $\mu_{\text{maks}}$ ; brzina potrošnje supstrata,  $r_s$ ; brzina proizvodnje etanola,  $r_{\text{EtOH}}$ ; i brzina proizvodnje glicerola,  $r_{\text{glicerol}}$ ) za bioprocen proizvodnje etanola s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 (slika 8-11). Korištenjem Sigmaplot programa V11.0 (Systat, SAD) nelinearnom regresijom određene su jednadžbe (polinomi drugog stupnja) koje opisuju promjenu navedenih kinetičkih parametara u ovisnosti o temperaturi fermentacije i odgovarajuće  $R^2$  vrijednosti kojima se opisuje slaganje eksperimentalnih i vrijednosti dobivenih modelom (tablica 9).



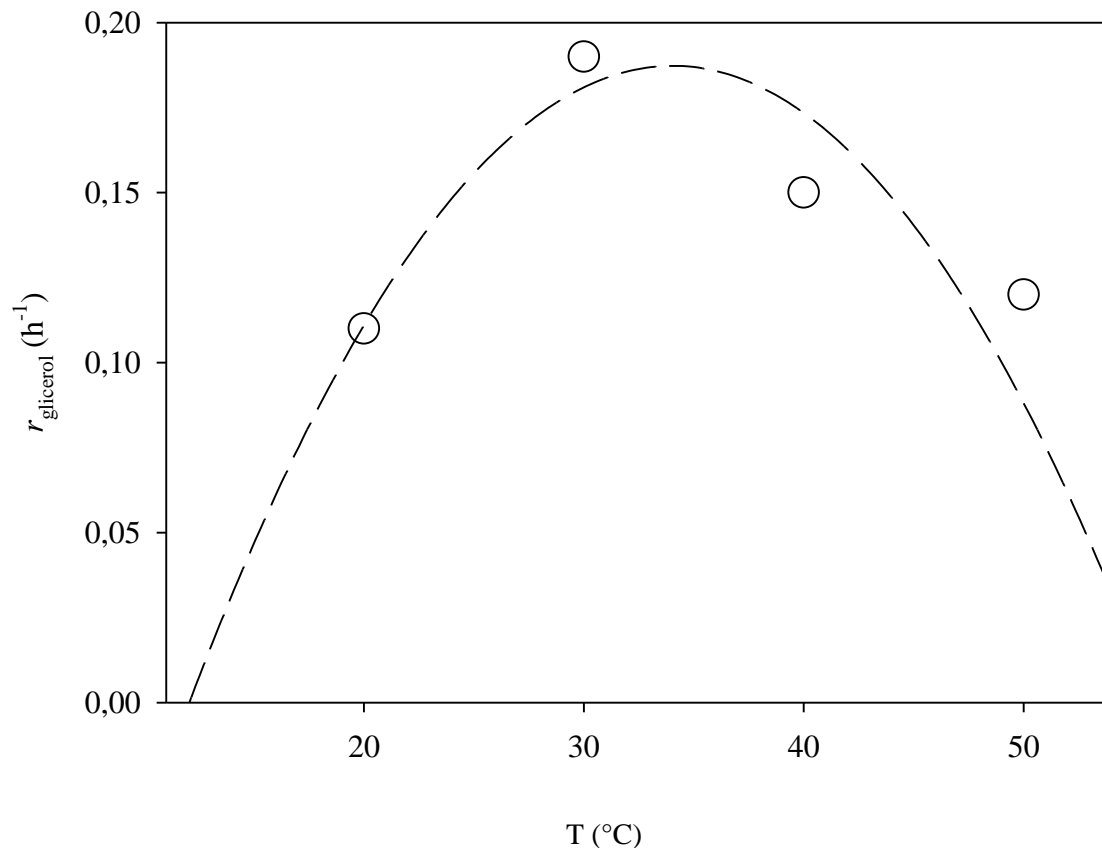
**Slika 8.** Promjene maksimalne specifične brzine rasta određene tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri temperaturama od 20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C u anaerobnim uvjetima



**Slika 9.** Promjene brzine potrošnje glukoze određene tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri temperaturama od 20  $^{\circ}\text{C}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ , 40  $^{\circ}\text{C}$  i 50  $^{\circ}\text{C}$  u anaerobnim uvjetima



**Slika 10.** Promjene brzine proizvodnje etanola određene tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri temperaturama od 20  $^{\circ}\text{C}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ , 40  $^{\circ}\text{C}$  i 50  $^{\circ}\text{C}$  u anaerobnim uvjetima



**Slika 11.** Promjene brzine proizvodnje glicerola određene tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri temperaturama od 20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C u anaerobnim uvjetima

Fonseca i sur. (2007) odredili su određene kinetičke parametre kao što su specifična brzina rasta, specifična brzina potrošnje supstrata i brzina potrošnje kisika za šaržni i kontinuirani uzgoj kvasca *K. marxianus* ATCC 26548 u aerobnim uvjetima. Rodrussamee i sur. (2011) ispitivali su rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 i proizvodnju etanola koristeći različite ugljikohidrate kao supstrate (glukozu, ksilozu, manozu, arabinozu) pri 30 °C i 45 °C u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima. Tijekom rasta u mikroaerofilnim/statičnim uvjetima na glukozu pri navedenim temperaturama određena su maksimalne specifične brzine rasta od 0,59 h<sup>-1</sup> za 30 °C, odnosno od 0,09 h<sup>-1</sup> za uzgoj proveden pri 45 °C. U ovom radu maksimalna specifična brzina rasta za kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 određena tijekom uzgoja u YPD podlozi pri 30 °C i iznosila

je  $0,42 \text{ h}^{-1}$  (slika 8), što je oko 30 % manja vrijednost nego u radu Rodrussamee i sur. (2011) za istu temperaturu fermentacije. Za fermentacije provedene pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  odnosno  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  određene su maksimalne specifične brzine rasta od  $0,27 \text{ h}^{-1}$  odnosno  $0,19 \text{ h}^{-1}$  pa bi se moglo zaključiti da je ovaj soj kvasca *K. marxianus*, iako postiže manju maksimalnu specifičnu brzinu rasta termotolerantiji od soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042.

Vrijednosti za brzinu potrošnje glukoze kretale su se u rasponu od  $0,06 \text{ h}^{-1}$  ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) do  $0,28 \text{ h}^{-1}$  što je određeno pri temperaturi od  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (slika 9). Vrijednosti određene za brzinu proizvodnje etanola kretale su se u rasponu od  $0,23$  ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) do  $0,35 \text{ h}^{-1}$  ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), iako su na preostale dvije testirane temperature ove vrijednosti bile vrlo slične i iznosile su  $0,32 \text{ h}^{-1}$  (slika 10). Brzina proizvodnje glicerola prati trend brzine proizvodnje etanola i tako je maksimalna vrijednost za ovaj parametar određena pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $r_{\text{glicerol}} = 0,19 \text{ h}^{-1}$ , slika 11), a vrijednosti su se kretale u rasponu od  $0,11$  do  $0,19 \text{ h}^{-1}$  (slika 11). Za navedene parametre nema dostupnih podataka iz literature za usporedbu.

Podudaranje jednostavnih jednadžbi drugog stupnja s eksperimentalnim podacima prikazano je  $R^2$  vrijednostima (tablica 9), koje se kreću u rasponu od  $0,85$  do  $0,92$ , dobivenim linearnom regresijom te se može zaključiti da ove jednostavni matematički izrazi dobro opisuju odnos kinetičkih parametara i temperature fermentacije.

**Tablica 9.** Matematički izrazi kojima se opisuju promjene kinetičkih parametara u ovisnosti o temperaturi fermentacije tijekom bioprocasa proizvodnje etanola s pomoću kvasca *K. marxianus* NBRC 1777

parametar	jednadžba	$R^2$
$\mu_{\text{maks}}$	$\mu_{\text{maks}} = -0,4671 + 0,5050 \cdot T - 0,0008 \cdot T^2$	0,90
$r_{\text{glukoza}}$	$r_{\text{glukoza}} = -0,5031 + 0,0428 \cdot T - 0,0006 \cdot T^2$	0,85
$r_{\text{EtOH}}$	$r_{\text{EtOH}} = -0,1844 + 0,0362 \cdot T - 0,0006 \cdot T^2$	0,92
$r_{\text{glicerol}}$	$r_{\text{glicerol}} = -0,2621 + 0,0264 \cdot T - 0,0004 \cdot T^2$	0,91

T, temperatura ( $^\circ\text{C}$ )



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata opisanih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 raste u YPD podlozi, proizvodi etanol i glicerol pri svim testiranim temperaturama (20, 30, 40 i 50°C) u anaerobnim uvjetima. Octena kiselina nije detektirana u značajnijim količinama tijekom navedenih uzgoja.
2. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 ima najveću specifičnu brzinu rasta ( $\mu = 0,42 \text{ h}^{-1}$ ) te brzine proizvodnje etanola ( $r_{\text{EtOH}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ ) i glicerola ( $r_{\text{glicerol}} = 0,19 \text{ h}^{-1}$ ) pri temperaturi od 30 °C. Pri ovoj temperaturi određena je i najveća produktivnost proizvodnje etanola ( $Pr_{\text{EtOH}} = 0,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).
3. Koeficijent konverzije glukoze u etanol i koeficijent konverzije glukoze u glicerol tijekom provedenih uzgoja kreće se u rasponu od 0,16 do 0,45  $\text{g g}^{-1}$ , tj. 0,01 do 0,05  $\text{g g}^{-1}$  te imaju najveću vrijednost tijekom uzgoja ovog kvasca pri 40 °C ( $Y_{\text{EtOH/S}} = 0,45 \text{ g g}^{-1}$ ;  $Y_{\text{glicerol/S}} = 0,05 \text{ g g}^{-1}$ ).
4. Iako je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 kategoriziran kao termotolerantan kvasac, tijekom uzgoja na 50 °C, vrijednosti koeficijenta konverzije glukoze u etanol i produktivnosti procesa proizvodnje etanola su vrlo niske ( $Y_{\text{EtOH/S}} = 0,16 \text{ g g}^{-1}$ ;  $Pr_{\text{EtOH}} = 0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) te iz podloge nije utrošena sva glukoza tijekom 24 sata uzgoja.

## 6. LITERATURA

Abdel-Banat, B. M. A., Hoshida, H., Ano, A. (2010) High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 861–867.

Aksu Z., Dönmez G. (2000) The use of molasses in copper (II) containing wastewaters: effects on growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*. *Proc. Biochem.* **36**, 451–458.

Anderson, P. J., McNeil, K., Watson, K. (1986) High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl. Environ. Microb.* **51**(6), 1314-1320.

Arneborg, N., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2000) Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Arch. Microbiol.* **174**, 125–128.

Bacci, J. M., Siqueira, C. G., Antoniazzi, S. A., Ueta, J. (1996) Location of the b-galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. *A. van Leeuw. J. Microb.* **69**, 357–361.

Bajpai, P., Margaritis, A. (1987) The effect of temperature and pH on ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke extract. *Biotechnol. Bioeng.* **30**(2), 306-313.

Banat, I. M., Nigam, P., Marchant, R. (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 259–263.

Banat, I. M., Singh, D., Marchant, R. (1996) The use of a thermotolerant fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production. *Acta Biotechnol.* **16**(2-3), 215-223.

Beniwal, A., Saini, P., Kokkiligadda, A., Vij, S. (2017) Physiological growth and galactose utilization by dairy yeast *Kluyveromyces marxianus* in mixed sugars and whey during fermentation. *3 Biotech.* **7**(5), 349.

Branduardi, P., Porro, D. (2012) Yeast Biotechnology. U: Yeast: Molecular and Cell Biology, 2. izd. (Feldmann, H., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, str. 347-370.

Brady, D., Marchant, R., McHale, L., McHale, A. P. (1995) Isolation and partial characterization of b-galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 696–699.

Caspeta, L., Nielsen, J. (2015) Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *Mbio.* **6** (4).

Duraković, S. (1996) Opća mikrobiologija, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb.

Duraković, S., Redžepović, S. (2002) Uvod u opću mikrobiologiju, Kugler, Zagreb.

Du, C., Li, Y., Zhao, X. (2019) The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2845–2855.

Fiedurek, J., Szczodrak, J. (1994) Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Microbiol. Pol.* **43**(1), 57.

Fonseca, G. G., Gombert, A. K., Heinzle, E., Wittmann, C. (2007) Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Res.* **7**(3), 422-435.

Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**(3), 339–354.

Furlan, S. A., Schneider, A. L. S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M. F., Jonas, R. (2001) Optimization of pH, Temperature and Inoculum Ratio for the Production of  $\beta$ -D-Galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* Using a Lactose-free Medium. *Acta biotechnol.* **21**(1), 57-64.

Ho, D. H. N., Powell, C. (2014) The effect temperature on the growth characteristics of ethanol producing yeast strains. *Int. J. Renew. Energ. Environ. Eng.* **2**(1), 1-6.

Gonçalves, J. A., Castillo, F. J. (1982) Partial Purification and characterization of b-D-galactosidase from *Kluyverormyces marxianus*. *J. Dairy Sci.* **65**, 2088–2094.

Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H. (2013) Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1505-1510.

Hansen, E. C. (1888) Undersogelser fra gjaeringsindustriens praxis. *Meddel. Carlsberg Labor.* **2**, 257-322.

Ivit, N. N., Longo, R., Kemp, B. (2020) The effect of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces non-cerevisiae* yeasts on ethanol and glycerol levels in wine. *Fermentation.* **6**(3) 77.

Jia, J., Wheals, A. (2000) Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* **38**, 264–270.

Johnson, E. A., Echavarri-Erasun, C. (2011) Yeast Biotechnology. U: The yeasts, a taxonomic study, (Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., ured.), Elsevier Science, Amsterdam, str. 21-44.

Jolivet, P., Bergeron, E., Benyair, H., Meunier, J. C. (2001) Characterization of major protein phosphatases from selected species of *Kluyveromyces*. Comparison with protein phosphatases from *Yarrowia lipolytica*. *Can. J. Microbiol.* **47**, 861–870.

Kata, I., Semkiv, M. V., Ruchala, J., Dmytruk, K. V., Sibirny, A. A. (2016) Overexpression of the genes PDC1 and ADH1 activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Yeast.* **33**(8), 471-478.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* **3**, 417–432.

Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R. (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *A. van Leeuwen. J. Microb.* **100**, 507–519.

Lane, M. M., Morrissey, J. P. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister’s shadow. *Fungal Biol. Rev.* **24**,17–26.

Leclerc, M., Chemardin, P., Arnaud, A., Ratomahenina, R., Galzy, P., Gerbaud, C., Raynal, A., Guérineau, M. (1987) Comparison of the properties of the purified beta-glucosidase from the transformed strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the donor strain *Kluyveromyces fragilis* Y610. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**,410–422.

Lodder, J., Kreger-van Rij, N. J. W. (1952) The yeasts: a taxonomic study, NHPC, Amsterdam

Lončar, A. (2019) Selekcija kvasaca iz rodova *Scheffersomyces*, *Candida* i *Spathaspora* za industrijsku proizvodnju biokemikalija (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Lopez, C. L. F., Beaufort, S., Brandam, C. (2014) Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 2223–2229

Mahoney, R.R., Nickerson, T.A., Whitaker, J.R. (1975) Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **58**, 1620–1629.

Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1.izd., Golden Marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.

Martins, D. B., De Souza C. G. Jr., Simões, D. A., De Morais, M. A. Jr. (2002) The b-galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. *Curr. Microbiol.* **44**,379–382

Membré, J. M., Kubaczka, M., Chéné, C. (1999) Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a Bakery Product Spoilage Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(11), 4921-4925.

Mrak, K. (2019) Selekcija određenih vrsta ne-Saccharomyces kvasaca za industrijsku proizvodnju biokemikalija (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., Thevelein, J. M. (2017) Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 216.

Pentjuss, A., Stalidzans, E., Liepins, J. (2017) Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 1177–1190.

Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R.Q., Stojiljkovic, M., Foulque-Moreno, M. R., Thevelein, J. M. (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res.* **15** (6).

Ramirez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernandez-Rodriguez, C., Villa Tanaca, L. (2004a) Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**, 369–375

Ramirez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernandez-Rodriguez, C., Villa-Tanaca, L. (2004b) Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 245–252.

Raynal, A., Guerineau, M. (1984) Cloning and expression of the structural gene for  $\beta$ -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet.* **195**, 108–115.

Rech, R., Cassini, C. F., Secchi, A., Ayub, M. A. Z. (1999) Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**(2), 91-96.

Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K. (2011) Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1573–1586.

Rouwenhorst, R. J., Visser, L. E., Van der Baan, A. A., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1988) Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1131–1137.

Rouwenhorst, R. J., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1990a) Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3337–3345.

Rouwenhorst, R. J., Ritmeester, W. S., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1990b) Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3329–3336.

Scharpf, L. G., Seitz, E. W., Morris, J. A., Farbood, M. I. (1986) Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. *ACS Chem. Bio.* **317**, 323–346.

Tamang, J. P., Fleet, G. H. (2009) Yeasts Diversity in Fermented Foods and Beverages. U: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, (Satyanarayana, T., Kunze G., ed.), Springer, str. 170-199.

Van der Walt, J. P. (1956) *Kluyveromyces*- a new yeast genus of the Endomycetales. *A. van Leeuwen.* **22**, 265–272.

Van Uden, N. (1985) Temperature profiles of yeasts. U: *Advances in microbial physiology*, Academic Press, str 192-215.

Van Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1990) Transient-state analyses of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 281–287.

Vivier, D., Ratomahenina, R., Moulin, G. (1993) Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 157–161.



Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2010) Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Microbiol. Biot.* **88**(1), 381-388.

Workman, W. E., Day, D. F. (1984) The cell wall-associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. *A. van Leeuw. J. Microb.* **50**, 349–353.

Zafar, S., Owais, M. (2006) Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Eng. J.* **27**(3), 295–298.

Zhang, B., Ren, L., Wang, Y., Xu, D., Zhang, S., Wang, H., Li, F. (2020a) Glycerol production through TPI1 defective *Kluyveromyces marxianus* at high temperature with glucose, fructose, and xylose as feedstock. *Biochem. Eng. J.*, **161**, 107689.

Zhang, B., Ren, L., Wang, H., Xu, D., Zeng, X., Li, F. (2020b) Glycerol uptake and synthesis systems contribute to the osmotic tolerance of *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Tech.* **140**, 109641.

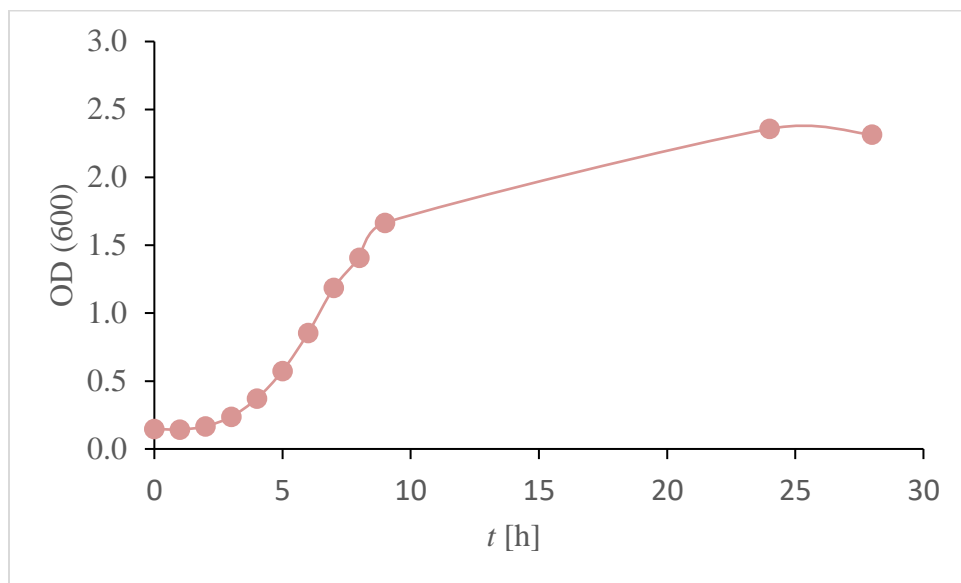
## 7. PRILOZI

### 7.1. POPIS KRATICA

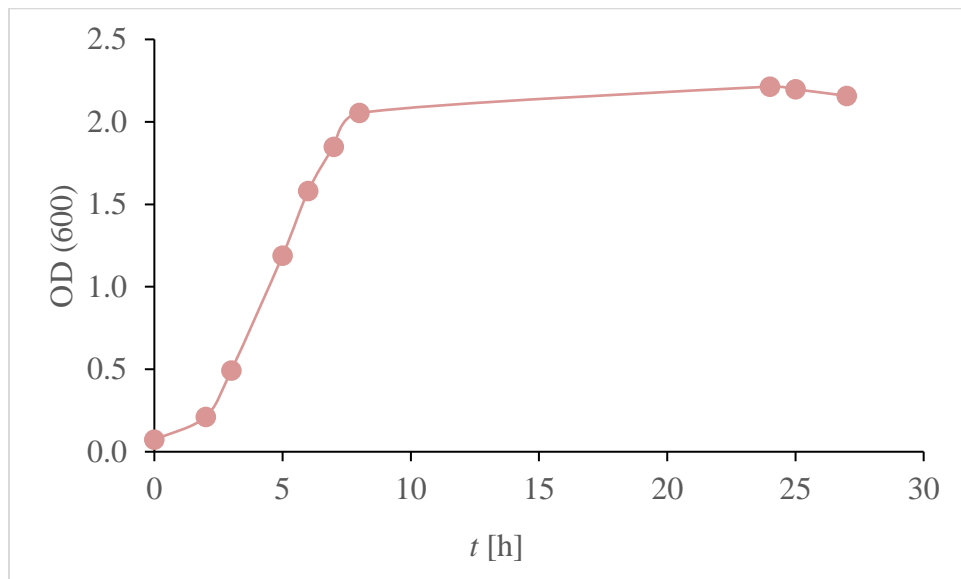
**Prilog 1.** Popis kratica uz navedene oznake veličine, veličine i jedinice

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
$t_{lag}$	lag faza rasta	[h]
$t_{eksp}$	eksponencijalna faza rasta	[h]
$Y_{X/S}$	koeficijent konverzije supstrata u biomasu	[g g <sup>-1</sup> ]
$Y_{etanol/S}$	koeficijent konverzije supstrata u etanol	[g g <sup>-1</sup> ]
$Y_{glicerol/S}$	koeficijent konverzije supstrata u glicerol	[g g <sup>-1</sup> ]
$Y_{octene\ kiselina/S}$	koeficijent konverzije supstrata u octenu kiselinu	[g g <sup>-1</sup> ]
$Pr_{X/S}$	produktivnost proizvodnje biomase	[g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$Pr_{etanol/S}$	produktivnost proizvodnje etanola	[g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$Pr_{glicerol/S}$	produktivnost proizvodnje glicerola	[g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$Pr_{octena\ kiselina/S}$	produktivnost proizvodnje octene kiseline	[g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$r_S$	brzina potrošnje supstrata	[h <sup>-1</sup> ]
$r_{P(etanol)}$	brzina proizvodnje etanola	[h <sup>-1</sup> ]
$r_{P(glicerol)}$	brzina proizvodnje glicerola	[h <sup>-1</sup> ]
$r_{P(octena\ kiselina)}$	brzina proizvodnje octene kiseline	[h <sup>-1</sup> ]
$\mu_{max}$	maksimalna specifična brzina rasta biomase	[h <sup>-1</sup> ]

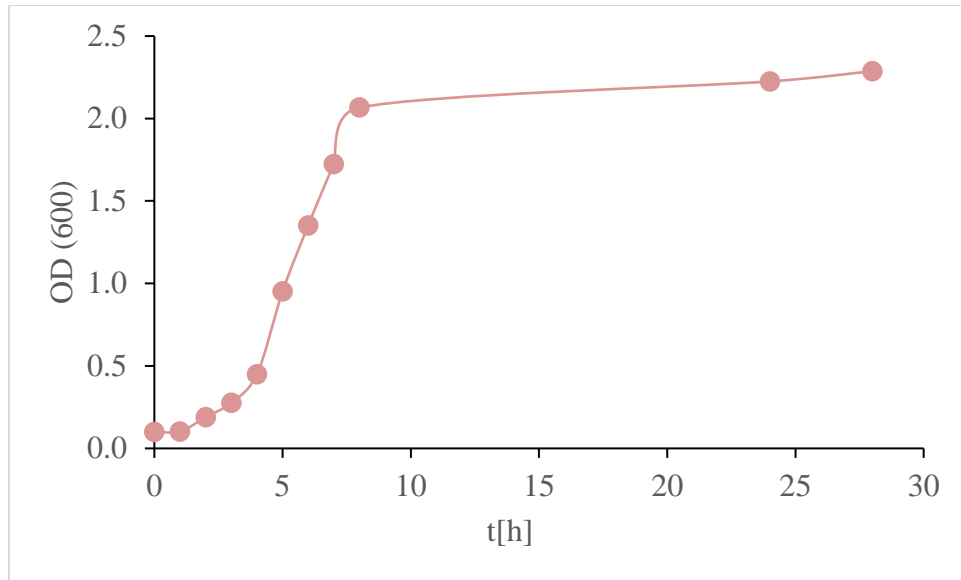
## 7.2. PROMJENA OPTIČKE GUSTOĆE TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777 PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA



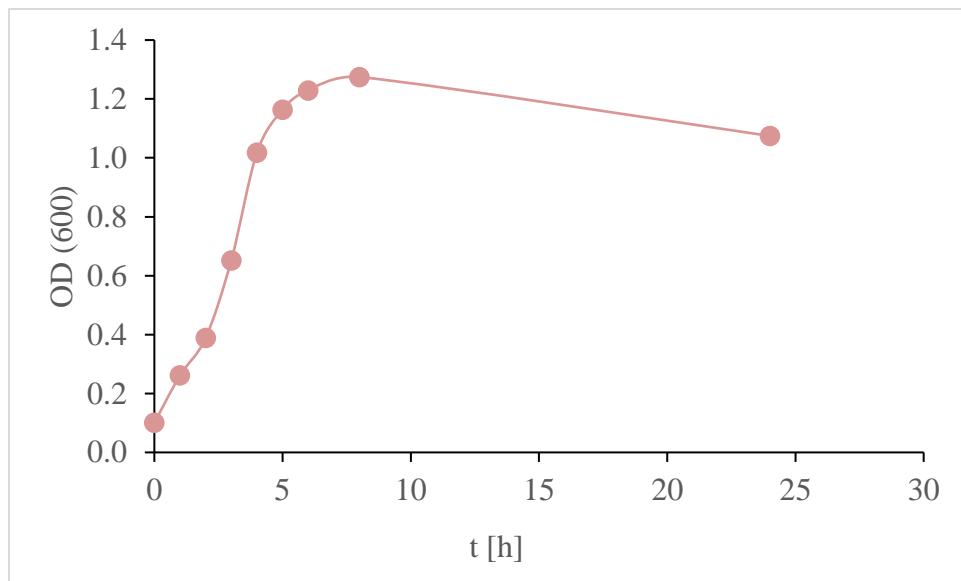
**Prilog 2.** Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri 20 °C



**Prilog 3.** Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri 30 °C



**Prilog 4.** Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri 40 °C



**Prilog 5.** Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri 50 °C

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Sawardzić

---

Potpis