

Uzgoj kvasca *Pichia stipitis* na enzimskom hidrolizatu predobrađenog drveta bukve

Beštak, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:512443>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2021.

Lucija Beštak

1488/BPI

**UZGOJ KVASCA *Pichia stipitis* NA
ENZIMSKOM HIDROLIZATU
PREDOBRAĐENOG DRVETA
BUKVE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca u Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Damira Stanzera te uz pomoć mag. ing. Karle Hanousek Čiče, asistentice. Rad je izrađen u sklopu projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717).

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Damiru Stanzeru na vremenu, razumijevanju te savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Također, hvala i Karli Hanousek Čiči, mag. ing. na pomoći, strpljenju, trudu i prenesenom znanju prilikom izrade eksperimentalnog dijela izrade ovog rada. Hvala i Nenadu Marđetku, mag. ing. na pomoći i savjetima tijekom izrade dijela ovog rada.

Veliko hvala mojim kolegicama i prijateljicama, koje su olakšale moje studentske dane uz druženja, izlaske i zajednička učenja.

Najveća zahvala mojoj obitelji, roditeljima Ivanu i Mariji koji su mi omogućili studiranje i podržavali me na ovome putu te svojim sestrama na razumijevanju i potpori. Hvala i mome suprugu Tomislavu na podršci i razumijevanju tijekom zadnjih dana studiranja.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UZGOJ KVASCA *Pichia stipitis* NA ENZIMSKOM HIDROLIZATU PREDOBRAĐENOG DRVETA BUKVE

Lucija Beštak, 1488/BPI

Sažetak: Lignocelulozne sirovine poput drvnih ostataka najčešće ostaju neiskorištene, a jeftina su i lako dostupna sirovina za proizvodnju biokemikalija, npr. bioetanol. Glavni nedostatak upotrebe takvih sirovina je potreba za provođenjem procesa predobrade i hidrolize što poskupljuje proces proizvodnje biokemikalija. U ovome radu provedena je enzimska hidroliza (50°C, pH 5) kiselinski predobrađenog čvrstog dijela bukve u 0,01 M acetatnom puferu, pomoću enzima Viscozyme L (5 % vol vol⁻¹) i Cellulase enzyme blend (2 % vol vol⁻¹). Dobiveni hidrolizat korišten je za uzgoj kvasca *P. stipitis* pri različitim uvjetima temperature (25, 29 i 33°C), pH vrijednosti (3,7, 4,4 i 5,1), stupnja aeracije te sastava podloge. Među dobivenim produktima zabilježena je značajnija koncentracija etanola u rasponu od 7,54 do 14,5 g L⁻¹.

Ključne riječi: lignocelulozne sirovine, enzimska hidroliza, *Pichia stipitis*, kvasci, bioetanol

Rad sadrži: 48 stranica, 15 slika, 9 tablica, 52 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr. sc. Damir Stanzer

Pomoć pri izradi: Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. prof. dr. sc. Damir Stanzer
3. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

Datum obrane: 21. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

CULTIVATION OF YEAST *Pichia stipitis* ON ENZYMATIC HYDROLYSATE OF PRETREATED BEECH WOOD

Lucija Beštak, 1488/BPI

Abstract: Lignocellulosic raw materials like wood residues are mostly left unused, but they are cheap and easy available raw material for production of biochemicals, e.g. bioethanol. The main problem with utilization of such raw materials is the necessary pretreatments and hydrolysis that ultimately increase the cost of the production process. In this work, enzymatic hydrolysis (at 50°C, pH 5) of solid phase obtained by acid pretreatment of beech wood chips was preformed, in 0,01 M acetate buffer using Viscozyme L (5 % vol vol⁻¹) and Cellulase enzyme blend (2% vol vol⁻¹). The resulting beech hydrolysate was used for cultivation of yeast *Pichia stipitis* at various pH (3,7, 4,4, 5,1) and temperature (25, 29, 33°C) conditions, as well as various aeration rates and media composition. Among the products obtained, a significant concentration of bioethanol was recorded, in the range from 7,54 to 14,5 g L⁻¹.

Keywords: lignocellulosic raw material, enzymatic hydrolysis, *Pichia stipitis*, yeasts, bioethanol

Thesis Contains: 48 pages, 15 figures, 9 tables, 52 references

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. Damir Stanzer, Full professor

Technical support and assistance: Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

Reviewers:

1. PhD. Božidar Šantek, Full professor
2. PhD. Damir Stanzer, Full Professor
3. PhD. Vlatka PetravićTominac, Full professor
4. PhD. Jasna Mrvčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 21, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lignocelulozne sirovine	2
2.2. Enzimski hidroliza lignoceluloznih sirovina	5
2.2.1. Hidroliza celuloze	6
2.2.2. Hidroliza hemiceluloze	7
2.2.3. Primjena komercijalnih enzima u hidrolizi lignoceluloznih sirovina	8
2.3. Kvasci u proizvodnji bioetanol iz lignoceluloznih sirovina	9
2.3.1. Kvasci roda <i>Saccharomyces</i>	11
2.3.2. Kvasci roda <i>Kluyveromyces</i>	12
2.3.3. Kvasci roda <i>Candida</i>	13
2.3.4. Kvasci roda <i>Pichia</i>	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Sirovina	18
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.2.1. Priprema acetatnog pufera	19
3.1.3. Enzimi	19
3.1.4. Radni mikroorganizam	19
3.2. Aparatura i pribor	19
3.2.1. Laboratorijski pribor	19
3.2.2. Uređaji i instrumenti	20
3.3. Metode	21
3.3.1. Enzimski hidroliza čvrstog dijela blagokiselog hidrolizata bukve u erlenmeyerovim tikvicama	21
3.3.2. Priprema uzoraka i analiza monosaharida i inhibitora UPLC metodom	22
3.3.3. Priprema inokuluma kvasca <i>Pichia stipitis</i> JCM 10742 ^t	22
3.3.4. Uzgoj divljeg soja kvasca <i>Pichia stipitis</i> JCM 10742 ^t na hranjivim podlogama sa enzimskim hidrolizatom bukve	23
3.3.5. Utjecaj sastava podloge na rast divljeg soja kvasca <i>Pichia stipitis</i> JCM 10742 ^t	24
3.3.6. Utjecaj različite vrijednosti pH na rast divljeg soja kvasca <i>Pichia stipitis</i> JCM 10742 ^t	25
3.3.7. Utjecaj intenziteta aeracije na rast divljeg soja kvasca <i>Pichia stipitis</i> JCM 10742 ^t	25
3.3.8. Utjecaj temperature na rast divljeg soja kvasca <i>Pichia stipitis</i> JCM 10742 ^t	25
3.4. Analitičke metode	26
3.4.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase	26
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije biomase	26
3.4.3. Priprema uzoraka nakon uzgoja kvasca za HPLC analizu nastalih produkata i potrošnje glukoze	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Priprema hidrolizata bukve	28
4.2. Kinetika rasta i fermentacije divljeg soja kvasca <i>P. stipitis</i> JCM 10742 ^t	30

4.2.1. Utjecaj različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>P. stipitis</i> JCM 10742 ^t	30
4.2.2. Utjecaj pH vrijednosti na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>P. stipitis</i> JCM 10742 ^t	33
4.2.3. Utjecaj intenziteta aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>P. stipitis</i> JCM 10742 ^t	36
4.2.4. Utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>P. stipitis</i> JCM 10742 ^t	39
 5. ZAKLJUČCI	43
 6. LITERATURA	44

1. UVOD

Zadnjih nekoliko desetljeća intenzivno se istražuju obnovljive sirovine za biotehnološku proizvodnju te obnovljivi izvori energije s ciljem zamjene fosilnih goriva. Porast broja stanovnika u svijetu doveo je do iscrpljivanja zaliha fosilnih goriva te porasta njihove cijene, a izgaranjem fosilnih goriva nastaje ugljikov dioksid koji je jedan od glavnih uzročnika globalnog zatopljenja. Lignocelulozne sirovine predstavljaju potencijal u proizvodnji biogoriva i biokemikalija zbog široke rasprostranjenosti i dostupnosti, a jedna od najbitnijih prednosti je to što nisu sastavni dio prehrane ljudi i životinja pa njihovo korištenje nema utjecaj na zalihe hrane. Lignocelulozna biomasa se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina koji su uklopljeni u kemijski stabilnu i kompaktnu strukturu. Kompleksnost strukture lignoceluloze doprinosi potrebi za predobradom, tj. razdvajanjem celuloze, hemiceluloze i lignina kako bi se povećala efikasnost enzimske hidrolize u sljedećem koraku. Enzimskom hidrolizom polisaharida nastaje hidrolizat koji sadrži monosaharide koje mikroorganizmi mogu koristiti kao supstrat (Ivančić Šantek i sur., 2018; Marđetko i sur., 2018).

Tijekom kemijske hidrolize uz oslobađanje monosaharida nastaju i inhibitori koji mogu imati nepoželjan učinak na aktivnost mikroorganizama. Zbog toga je važno odabrati mikroorganizme koji imaju sposobnost korištenja oslobođenih monosaharida te neosjetljivost na nastale inhibitore. Mikroorganizmi koji se najčešće koriste u fermentaciji lignoceluloznog hidrolizata su kvasci, a najčešće se koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji kao supstrat može koristiti širok raspon šećer, no ne može koristiti pentoze. Zbog toga se sve više istraživanja posvećuje drugim rodovima kvasaca (npr. *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*), bakterijama i filamentoznim fungima. Kao potencijalni kandidat za korištenje hidrolizata lignoceluloznih sirovina pokazao se kvasac *Pichia stipitis*, koji ima sposobnost korištenja širokog raspona supstrata (šećera) te može koristiti i pentoze (npr. ksilozu) kao supstrat, a uz to daje i visoke prinose.

U ovome radu provest će se enzimska hidroliza čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom čipsa bukve, pomoću komercijalnih pripravaka enzima (Viscozyme L i Cellulase enzyme blend). Na dobivenom enzimskom hidrolizatu provest će se uzgoj divljeg soja kvasca *Pichia stipitis* na laboratorijskoj tresilici uz različite uvjete sastava podloge, temperature, pH vrijednosti te stupnja aeracije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1.LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignocelulozni materijali su glavna komponenta biljne biomase i predstavljaju obnovljivi izvor energije dostupan na Zemlji (Petravić-Tominac i sur., 2017). Lignocelulozne sirovine imaju ključne prednosti u odnosu na druge izvore biomase, budući da predstavljaju nejestive dijelove biljaka te njihova upotreba ne utječe na potrošnju zaliha hrane. Također, šumski i poljoprivredni otpad odlaže se svake godine u ogromnim količinama na poljima i odlagalištima otpada, što uzrokuje velike ekološke probleme. S ekonomskog stajališta, lignocelulozna biomasa se može proizvesti brže i jeftinije od drugih poljoprivredno važnih sirovina (npr. soje i šećerne trske). S druge strane, lignocelulozni otpad kao sirovina se rijetko upotrebljava zbog složene strukture, otpornosti na enzimsku i kemijsku hidrolizu te zahtjeva za predobradom sirovine, koja je skupa i još uvijek nedovoljno razvijena (Iskigor i Becer, 2015). Velika količina lignocelulozne biomase može se prevesti u različite visokovrijedne proizvode, kao što su biogoriva, fine kemikalije te jeftine izvore energije za mikrobnu fermentaciju i proizvodnju enzima (Anwar i sur., 2014). Sirovine koje sadrže lignocelulozu mogu se podijeliti u šest osnovnih grupa: otpadni poljoprivredni materijal (kukuruzovina, pšenična slama, slama ječma), tvrdo drvo (topola, bukva), meko drvo (bor, smreka), celulozni otpad (stare novine, iskorišteni papir), biljna biomasa te komunalni kruti otpad (Bušić i sur., 2018, Semenčenko i sur., 2011).

Osnovne kemijske komponente lignocelulozne sirovine su celuloza (40-50 %), hemiceluloza (25-35 %) i lignin (15-20 %) (Janušić i sur., 2008). Navedeni polimeri čvrsto su vezani jedan uz drugog te predstavljaju više od 90 % suhe tvari biljne stanice (slika 1). Udio svakog polimera varira ovisno o vrsti biljke, sezoni žetve te različitim dijelovima biljke (Alonso Bocchini Martins i sur., 2011). Maseni udjeli pojedinih strukturnih polimera lignoceluloze u različitim vrstama biljaka naveden je u tablici 1. Celuloza je glavna strukturna komponenta staničnih zidova biljaka te je odgovorna za mehaničku čvrstoću, dok se makromolekule hemicelulozesastoje od ponavljajućih slijedova pentosa i heksoza. Lignin sadrži tri aromatska alkohola, koji nastaju biosintezom, te tvori zaštitni dio oko celuloze i hemiceluloze (Anwar i sur., 2014).

Tablica 1. Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u različitim lignoceluloznim materijalima (Iskigor i Becer, 2015)

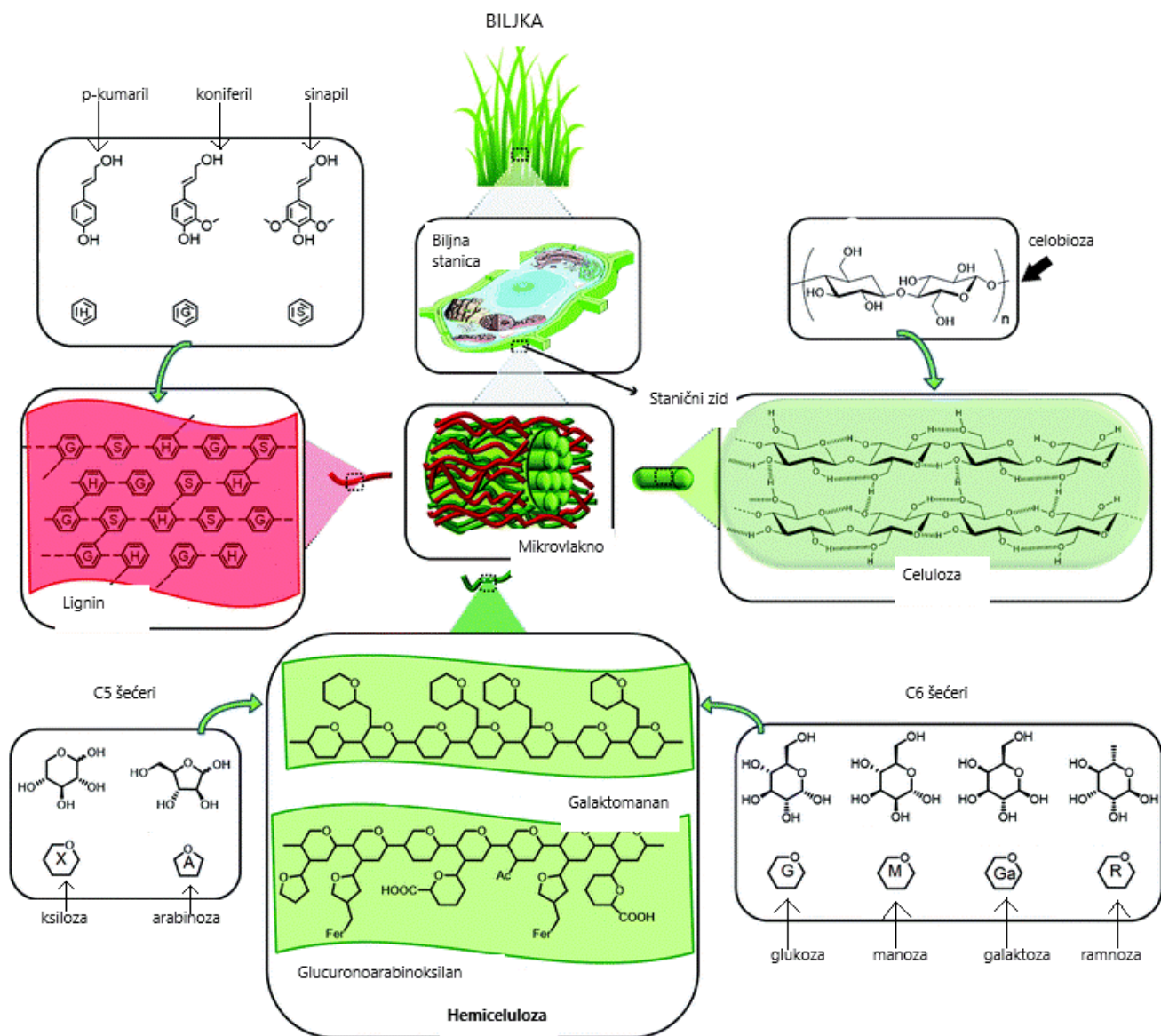
Lignocelulozni materijal		Celuloza (%)	Hemiceluloza (%)	Lignin (%)
Tvrdo drvo	Topola	50,8 – 53,3	26,2 – 28,7	15,5 – 16,3
	Hrast	40,4	35,9	24,1
	Eukaliptus	54,1	18,4	21,5
Meko drvo	Bor	42 – 50	24 – 27	20
	Jela	44	11	27
	Smreka	45,5	22,9	27,9
Poljoprivredni otpad	Slama pšenice	35 – 39	23 – 30	12 – 16
	Slama ječma	36 - 43	24 - 33	6,3 – 9,8
	Stabljika kukuruza	35 – 39,6	16,8 - 35	7 – 18,4
	Kukuruzni oklasci	33,7 – 41,2	31,9 - 36	6,1 – 15,9
Trave	Trava	25 - 40	25 - 50	10 – 30
	Divlji proso	35 - 40	25 - 30	15 – 20

Celuloza ($C_6H_{10}O_5$)_n je glavna komponenta stanične stijenke viših biljaka. Celulozna vlakna osiguravaju čvrstoću drveta i čine 40-50 % suhe tvari u ukupnoj masi drveta. Celuloza je homopolisaharidni polimer sastavljen od molekula β -D-glukopiranoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Molekule celuloze su linearne, a osnovna jedinica koja se ponavlja u molekuli celuloze je dimer celobioza, nastao povezivanjem dviju molekula glukoze (Semenčenko i sur., 2011). U celuloznim vlaknima izmjenjuju se kristalinične i amorfne regije. Kristalinične regije su vrlo kohezivne, krute strukture, formirane paralelnom konfiguracijom linearnih lanaca zbog čega nastaju intermolekulske vodikove veza. Stvaranje intermolekulskih vodikovih veza doprinosi netopljivosti celuloze i niskoj reaktivnosti, što je istovremeno čini otpornijom na kiselinsku hidrolizu, otežavajući ulazak vode te modificirajući elastičnost celuloznih vlakana. Amorfne regije tvore celulozni lanci koji su manje organizirani,

pristupačniji enzimima i podložniji hidrolizi (Alonso Bocchini Martins i sur., 2011). Visok stupanj polimerizacije, otporna kristalna struktura i povezanost celuloze sa matriksom hemiceluloze i lignina su najvažniji čimbenici koji otežavaju efikasnost i visoku produktivnost enzimske hidrolize celuloze iz lignoceluloznih sirovina (Ivetić i Antov, 2014).

Za razliku od celuloze, hemiceluloza ima nasumičnu amorfnu strukturu koja se sastoji od nekoliko različitih heteropolimera, uključujući ksilan, galaktomanan, glukuronoksilan, arabinoksilan, glukomanan te ksiloglukan. Heteropolimeri hemiceluloze su građeni od različitih pentoznih i heksoznih monosaharidnih jedinica: pentoza (ksiloza, arabinoza), heksoza (manoza, glukoza, galaktoza) i acetiliranih šećera (Iskigor i Becer, 2015). Sadržaj i struktura hemiceluloze razlikuje se ovisno o vrsti biljke. Trave i slama sadrže visoku koncentraciju arabinana, galaktana i ksilana, dok je manan sastavna komponenta hemiceluloze tvrdih i mekih vrsta drveta (Anwar i sur., 2014). Hemiceluloza u kombinaciji sa ligninom i celulozom povećava otpornost staničnestijenke prema razgradnji te doprinosi povećanju netopljivosti komponenata staničnog zida. Uz to, osnovna funkcija hemiceluloze je sudjelovanje u izgradnji stanične stijenke te regulacija rasta biljnih stanica (Chen, 2014).

Lignin je polimer sastavljen od tri različite fenilpropanske jedinice (*p*-kumaril alkohola, koniferil alkohola i sinapil alkohola) te djeluje kao vezivo između hemiceluloze i celuloze (Rezić i sur., 2016). Lignin daje biljci strukturnu potporu i čvrstoću, nepropusnost te zaštitu od mikroorganizama i oksidacijskog stresa. Budući da se celulozna vlakna ugrađuju u matriks hemiceluloze i lignina, lignin istovremeno predstavlja i fizičku barijeru za kontakt između celulolitičkih enzima i supstrata (Ivetić i Antov, 2014).



Slika 1. Prikaz strukture lignocelulozne sirovine (Iskigor i Becer, 2015)

2.2.ENZIMSKA HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Zbog sloja lignina i hemiceluloze, koji obavijaju celulozna vlakna i onemogućuju vezanje enzima na supstrat, stupanj enzimske hidrolize celuloze iz izvorne lignocelulozne sirovine vrlo je malen. Kako bi se promijenio sastav i struktura lignoceluloznih sirovina, potrebna je njihova predobrada. Ciljevi predobrade su izdvajanje netopljivog dijela (lignina) te modifikacija lignocelulozne strukture, hidroliza hemiceluloze, dekrystalizacija celuloze i stvaranje površina

dostupnih enzimima. Navedene promjene osiguravaju efikasnu enzimsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina, smanjenje energetske troškova za miješanje i izdvajanje proizvoda te smanjenje koncentracije inhibitora koji utječu na procese uzgoja određenih mikroorganizama (Rezić i sur., 2016). Razvijen je velik broj metoda predobrade lignoceluloznih sirovina, a dijele se na fizikalne (npr. usitnjavanje, zračenje, ekstruzija, piroliza), kemijske (npr. ozonoliza, hidroliza s kiselinama i lužinama, oksidativna delignifikacija, organosolv postupak), fizikalno-kemijske (npr. eksplozija vodenom parom, eksplozija vlakana s amonijakom, eksplozija sa CO₂) i biološke metode (primjenom npr. celulolitičkih enzima, gljiva bijelog i smeđeg truljenja). Jedna od najčešće primjenjivanih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina je alkalna hidroliza, kojom se učinkovito razgrađuje lignin uz djelomičnu razgradnju hemiceluloze. Također, alkalna sredina uzrokuje solvataciju hidroksilnih skupina u ugljikohidratima, što vodi do bubrenja celuloznih vlakana i povećanja unutarnje površine, smanjenja stupnja polimerizacije i kristaliničnosti celuloze (Ivančić Šantek i sur., 2018).

Enzimska hidroliza je proces u kojem se dodaju celulaze i drugi enzimi kako bi hidrolizirali predobrađenu lignoceluloznu sirovinu u jednostavne šećere (Fan, 2014). Osnovne prednosti enzimske hidrolize u odnosu na kiselinsku ili alkalnu hidrolizu su: blagi uvjeti odvijanja reakcije (pH 4.8, temperatura 45-50°C), mogućnost dobivanja visokog prinosa šećera, ne dolazi do problema s korozijom te su niži investicijski troškovi (Predojević, 2010).

2.2.1. Hidroliza celuloze

Da bi se postigla kompletna hidroliza celuloze u jednostavne šećere potrebno je zajedničko djelovanje tri osnovna tipa celulaza: endoglukanaza, egzoglukanaza (celobiohidrolaza) te β -glukozidaza. Endoglukonaze djeluju na celulozna vlakna niskog stupnja kristalizacije, režu ih u sredini ostavljajući slobodne krajeve. Egzoglukanaze uzrokuju depolimerizaciju i hidrolizu celuloznih vlakana višeg stupnja kristalizacije na način da odcjepljuju celobiozu s krajeva celuloznih lanaca, dok β -glukozidaze hidroliziraju jedinice celobioze na glukozu (Fan, 2014; Sun i Cheng, 2002). Enzimska hidroliza se može podijeliti u dvije faze: primarnu i sekundarnu. Primarna faza enzimske hidrolize uključuje aktivnost endo- i egzoglukanaza na površini čvrstog supstrata, što rezultira otpuštanjem oligosaharida u tekuću fazu. Sekundarna faza enzimske

hidrolize uključuje daljnju hidrolizu oligosaharida u celobiozu (egzoglukanaza) i glukozu (β -glukozidaza) (Bušić i sur., 2018).

Glavni proizvođači enzima celulaza za hidrolizu lignoceluloznih sirovina su bakterije i gljive. Ti mikroorganizmi mogu biti aerobni ili anaerobni, mezofili ili termofili. Bakterije koje imaju sposobnost proizvodnje celulaza pripadaju rodovima *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Streptomyces*, itd. Mnoge bakterije, posebno anaerobne vrste (npr. *Clostridium thermocellum* i *Bacteroides cellulosolvens*), proizvode celulaze sa visokom specifičnom aktivnošću, ali ne u velikim količinama; prvenstveno zbog zahtjeva takvih bakterija za striktno anaerobnim uvjetima tijekom uzgoja. Zbog toga, većina istraživanja za proizvodnju celulaza usmjerena je na funge. Fungi koji mogu proizvesti celulaze pripadaju rodovima *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* i *Penicillium* (Sun i Cheng, 2002). Vodeći mikroorganizam u industrijskoj proizvodnji celulaza je plijesan *Trichoderma reesei* koja može proizvesti celulazu u visokim koncentracijama, do 0,33 grama enzima po gramu iskorištenog šećera. *T. reesei* proizvodi najmanje pet različitih endoglukanaza, a u najvećoj koncentraciji enzim celobiohidrolazu, dok su za proizvodnju β -glukozidaza najviše zastupljene plijesni iz roda *Aspergillus* (Fan, 2014). Efikasnost enzimske hidrolize ovisi o različitim faktorima: supstratu, celulaznoj aktivnosti, reakcijskim uvjetima (pH vrijednosti, temperaturi), a važnu ulogu imaju i karakteristike miješanja te odnos tekuće i čvrste faze budući da prijenos mase i topline zahtijeva dobru interakciju enzima i supstrata (Gabiatti Junior i sur., 2020). Većina celulaza je nestabilna pri visokim temperaturama. Maksimalna aktivnost fungalnih celulaza postiže se pri temperaturi $50 \pm 5^\circ\text{C}$ te pH vrijednosti 4,5-5. Povećanjem temperature smanjuje se enzimska aktivnost, a pri temperaturi 80°C dolazi do potpunog gubitka aktivnosti (Verardi i sur., 2012).

2.2.2. Hidroliza hemiceluloze

Dostupnost celuloze enzimskoj hidrolizi ovisi o uklanjanju ksilana, koji je sastavni dio hemiceluloze, iz lignocelulozne strukture. U tu svrhu koriste se enzimi ksilanaze. Ksilanaze su jednolančani glikoproteini, veličine 6-80 kDa, aktivni u intervalu pH 4,5-6,5 te rasponu temperatura od 40 do 60°C (Butt i sur., 2008). Hemiceluloza nema kristaliničnu strukturu kao celuloza te je zbog toga osjetljivija na enzimsku hidrolizu. Potpuna hidroliza ksilana zahtijeva

zajedničko djelovanje enzima: endo-1,4- β -ksilanaza, β -ksilozidaza, α -arabinofuranozidaza i α -glukuronozidaza (Bušić i sur., 2018).

U proizvodnji enzima ksilanaza najzastupljeniji mikroorganizmi su bakterije i fungi. Bakterije zastupljene u proizvodnji enzima ksilanaze pripadaju rodovima *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*, a proizvedene ksilanaze djeluju u rasponu pH 5-9, pri optimalnoj temperaturi 35-60°C (Burlacu i sur., 2016). Filamentozne fungi su široko rasprostranjene u proizvodnji hidrolitičkih enzima, uključujući ksilanaze. Fungalne ksilanaze imaju veću specifičnu aktivnost u odnosu na one koje su proizvele bakterije, a još jedna od prednosti je ekstracelularna proizvodnja enzima kojeg je lakše izdvojiti. U proizvodnji ksilanaza, u industrijskom mjerilu, najzastupljeniji su mikroorganizmi iz rodova *Aspergillus* i *Trichoderma* (Maciel i sur., 2008).

Ksilanaze imaju veliku biotehnološku važnost zbog mogućnosti primjene u različitim vrstama industrija, npr. prehrambenoj i prerađivačkoj industriji. Ksilanaze se mogu koristiti u procesima bistrenja sokova i vina, u procesu ekstrakcije kave, biljnih ulja, za poboljšanje nutritivnih svojstava poljoprivredne silaže. Također, ksilanaze se mogu primijeniti u poboljšanju kvalitete lignoceluloznog otpada, na način da zajedno s celulazama prevode lignocelulozne materijale u gorivo i druge kemikalije. Upotreba ksilanaza omogućuje provedbu procesa sa smanjenom količinom kemikalija, u blažim uvjetima te sa manje popratnih reakcija (Butt i sur., 2008; Maciel i sur., 2008).

2.2.3. Primjena komercijalnih enzima u hidrolizi lignoceluloznih sirovina

Komercijalni enzimi, koji se primjenjuju u hidrolizi lignoceluloznih sirovina, najčešće se proizvode zajedničkom fermentacijom nekoliko različitih mikroorganizama. Optimalni uvjeti za aktivnost komercijalnih enzima su pH vrijednost od 4 do 5 te temperatura od 50°C. Za razgradnju celuloze najčešće se upotrebljava Celluclast tvrtke Novozyme iz Danske, kojeg proizvodi gljiva *Trichoderma reesei*. Često se koristi u kombinaciji sa Novozyme 188 koji sadrži enzim β -glukozidazu dobivenu iz plijesni *Aspergillus niger*, budući da *Trichoderma reesei* proizvodi endo- i egzoglukanaze u velikim količinama, a proizvedena količina β -glukozidaze je vrlo mala (Verardi i sur., 2012). Novozymov Viscozyme L je kombinacija β -glukanaza, celulaza, arabinaza, hemicelulaza i ksilanaza; dok je Cellulase enzyme blend mješavina celulaza, β -glukozidaza i hemicelulaza. Uz Novozyme, poznatiji proizvođač komercijalnih enzima je tvrtka

Genencor iz Kalifornije, a neki poznatiji proizvodi su Accelerase 1500 koji je mješavina egzoglukanaza, endoglukanaza, hemicelulaza i β -glukozidaza. Također, koriste se enzimi Accelerase XP koji razgrađuju ksilan i glukan, Accelerase XC koji posjeduje celulaznu i hemicelulaznu aktivnost te Accelerase BG koji sadrži samo β -glukozidaze. Noviji proizvod je Accelerase Duet, proizveden genetički modificiranom vrstom plijesni *Trichoderma reesei*, a sadrži egzoglukanaze, endoglukanaze, β -glukozidaze te ksilanaze. Takva mješavina enzima može učinkovito hidrolizirati lignoceluloznu biomasu u fermentabilne šećere (npr. glukozu i ksilozu) (Verardi i sur., 2012).

2.3.KVASCI U PROIZVODNJI BIOETANOLA IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Ubrzan razvoj svjetskog gospodarstva uzrokuje porast potrošnje obnovljivih izvora energije (nafte, ugljena i prirodnog plina), što vodi do bržeg iscrpljivanja njihovih zaliha te povećanja emisije stakleničkih plinova. Nestabilna cijena goriva i petrokemijskih sirovina, kao i potreba za sigurnijom dobavom energije pridonijeli su povećanoj proizvodnji alternativnih goriva, biogoriva. Biogoriva se proizvode preradom obnovljivih izvora energije, biomase, koja se koristi u kućanstvima za grijanje, kuhanje, proizvodnju električne energije i topline, a sve više i u proizvodnji biogoriva: etanola, metanola, biodizela, vodika i metana (Ivančić Šantek i sur., 2016).

Različiti tipovi biomase imaju različiti potencijal za proizvodnju bioetanola, a prema kemijskom sastavu mogu se svrstati u tri grupe: šećerne sirovine (šećerna repa, melasa, šećerna trska, slatki sirak), škrobne sirovine (kukuruz, ječam) te lignocelulozna biomasa (slama, poljoprivredni otpad, ostaci drveća). Šećerne i škrobne sirovine karakteristične su za proizvodnju bioetanola prve generacije, a njihova upotreba u proizvodnji etanola natječe se s korištenjem tih sirovina u prehrani ljudi i stoke, što u konačnici utječe na njihovu cijenu i dostupnost. Nasuprot tome, lignocelulozna biomasa (iz koje se proizvodi druga generacija goriva) predstavlja alternativu za proizvodnju bioetanola zbog svoje dostupnosti, široke rasprostranjenosti i niže cijene (Bušić i sur., 2018). Lignocelulozne sirovine pokazuju veliki potencijal za održivu proizvodnju kemikalija i goriva, obnovljiva su sirovina te su dostupne širom svijeta. Lignocelulozna biomasa u proizvodnji biogoriva utječe na smanjenje niza problema koji postoje u proizvodnji goriva iz fosilnih izvora. To se odnosi na visoke razine CO₂u atmosferi i emisiju

stakleničkih plinova, energetske nesigurnosti i ovisnosti te iscrpljivanje zaliha fosilnih goriva. Nadalje, osnovna komponenta lignocelulozne biomase, celuloza, smatra se najvećim potencijalnim kandidatom za zamjenu polimera na bazi nafte zbog svojih ekoloških svojstava, npr. obnovljivosti, biokompatibilnosti i biorazgradivosti (Iskigor i Becer, 2015).

Bioetanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) se proizvodi fermentacijom sirovine, a primjenjuje se kao pogonsko gorivo u smjesi s benzinom ili čist. U smjesama sa benzinom upotrebljava se bezvodni etanol minimalne čistoće od 99,5 do 99,8 %. Udio etanola u smjesi s benzinom iznosi od 5 do 85 % (Ivančić Šantek i sur., 2016). U usporedbi sa benzinom, bioetanol ima veću oktansku vrijednost te je mnogo korozivniji. Molekula etanola sadrži kisik što omogućava potpunije sagorijevanje ugljikovodika, smanjenje emisije stakleničkih plinova, ugljikova monoksida i dušikovih oksida te toksičnih aromatskih spojeva. Također, temperatura paljenja i latentna toplota isparavanja etanola veće su nego kod benzina, a posljedica toga je slabije isparavanje alkoholnih goriva što uzrokuje probleme prilikom pokretanja vozila pri niskim temperaturama (Balat i sur., 2008; Ivančić Šantek i sur., 2016). 2010. godine ukupna svjetska proizvodnja bioetanola iznosila je skoro 100 milijuna litara, od toga je 68 % korišteno za gorivo, 21 % za industrijsku upotrebu te 11 % za upotrebu u alkoholnim pićima (Vohra i sur., 2014). Vodeći svjetski proizvođači bioetanola, na šećernim i škrobnim sirovinama, su Sjedinjene Američke Države i Brazil, čija proizvodnja iznosi oko 70 % svjetskog tržišta (Balat i sur., 2008).

Lignocelulozna biomasa pokazuje ima potencijal u proizvodnji bioetanola, pretpostavlja se da je ukupni potencijal proizvodnje etanola iz ostataka usjeva i poljoprivrednog otpada oko 491 milijun litara godišnje, što je 16 puta više od trenutne svjetske proizvodnje etanola (Balat i sur., 2008). Celuloza, hemiceluloza i lignin su tri glavne strukturne komponente lignocelulozne biomase, a kompaktnost i kompleksnost njene strukture čini ju teže razgradivom od šećernih i škrobnih sirovina (Gray i sur., 2006). Zbog kristalinične strukture celuloze te kompleksne strukturne organizacije lignoceluloze, proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina sastoji se od četiri osnovna koraka: predobrade sirovine, hidrolize strukturnih ugljikohidrata, fermentacije te izdvajanja i pročišćavanja etanola (Gray i sur., 2016; Ivančić Šantek i sur., 2018). Hidrolizom lignoceluloznih sirovina oslobađaju se različiti šećeri, npr. hidrolizom celuloze dobiva se glukoza, a hidrolizom hemiceluloze smjesa heksoza (glukoza, manoza, galaktoza) i pentoza (ksiloza, ramnoza, arabinoza). Nastali monosaharidi se fermentacijom prevode u etanol

dok lignin predstavlja sekundarni produkt. Tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina, osim oslobađanja šećera, dolazi do nastajanja inhibitora koji su toksični za radne mikroorganizme, što smanjuje efikasnost procesa. Inhibitori se na temelju porijekla dijele u tri skupine: organske kiseline, derivati furana i fenolni spojevi (Petravić-Tominac i sur., 2017).

Zbog navedenih činjenica važno je odabrati odgovarajuće mikroorganizme koji mogu učinkovito fermentirati šećere prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima, a istodobno su dovoljno otporni na prisutne inhibitore. Kvasci imaju važnu ulogu u proizvodnji bioetanola zbog mogućnosti fermentacije širokog raspona šećera u etanol. Koriste se u industrijskim postrojenjima zbog mogućnosti rasta u jednostavnim, jeftinim hranjivim podlogama, otpornosti na inhibitore, tolerancije na visoke koncentracije etanola ($> 40 \text{ gL}^{-1}$), velike produktivnosti ($> 1 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), velikog prinosa etanola ($> 90\%$ teorijskog prinosa) (Mohd Azhar i sur., 2017). Također, mikroorganizam bi trebao tolerirati niske pH vrijednosti te visoke vrijednosti temperature kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Veća temperatura fermentacije smanjuje mogućnost pojave mezofilnih kontaminanata, čime se smanjuje potreba za sterilizacijom te povećava ekonomičnost procesa (Petravić-Tominac i sur., 2018). Uz kvasce, istražuje se mogućnost primjene nekih vrsta bakterija (rodovi *Bacillus*, *Clostridium*, vrste *Zymomonas mobilis* i *Escherichia coli*) te više vrsta filamentoznih funga za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih hidrolizata. Najčešći kvasci korišteni za industrijsku proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina pripadaju rodu *Saccharomyces*, a sve veći interes pobuđuju kvasci iz roda *Pichia* (po novoj taksonomskog podjeli *Sheffersomyces*), te kvasci *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* te rodovi *Candida* i *Pachysolen* (Petravić-Tominac i sur., 2017).

2.3.1. Kvasci roda *Saccharomyces*

Kvasci roda *Saccharomyces* imaju značajnu važnost u mnogim industrijskim procesima, koriste se u proizvodnji pekarskih proizvoda te u proizvodnji etanola u industriji alkoholnih pića. Vrste kvasaca koje pripadaju rodu *Saccharomyces* imaju sposobnost fermentacije različitih supstrata, uključujući glukozu, fruktozu, galaktozu, maltozu, saharozu, ksilulozu, dekstrin, rafinozu i škrob, a metodama genetičkog inženjerstva neki sojevi se mogu modificirati na način da metaboliziraju lignocelulozne šećere, npr. ksilozu i arabinozu (Dufour i sur., 2011). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najčešće se upotrebljava u industrijskoj proizvodnji etanola, a jedan

od razloga je njegova tolerancija na širok raspon pH vrijednosti što smanjuje osjetljivost procesa na kontaminacije. Također, kvasac *S. cerevisiae* daje visoke prinose etanola, visoku produktivnost te podnosi velike koncentracije etanola i inhibitora.

Nekada sekao starter kultura u proizvodnji etanola tradicionalno koristio pekarski kvasac, prvenstveno zbog niske cijene i dostupnosti. Međutim, pekarski kvasac te ostale *Saccharomyces* vrste kvasaca nisu se mogli natjecati sa divljim sojevima, koji su uzrokovali kontaminacije tijekom industrijskog procesa. Uz divlje sojeve kvasaca, stresni uvjeti kao što su povećanje koncentracije etanola, temperature, osmotski stres te bakterijske kontaminacije razlozi su zbog kojih kvasci ne mogu preživjeti tijekom fermentacije (Mohd Ahzar i sur., 2017). Jedan od nedostataka kvasca *S. cerevisiae* je taj što ne može hidrolizirati pentoze, tj. ksiloze iz lignoceluloznih sirovina zbog nedostatka enzima koji prevodi ksiloze u ksiluloze. Taj problem može se riješiti korištenjem genetički modificiranih vrsta kvasaca ili kokulturama tj. korištenjem dviju vrsta kvasacatijekom fermentacije istovremeno (Balat, 2011).

2.3.2. Kvasci roda *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* čine kvasci koji imaju sposobnost rasta na galaktozi, laktozi, fruktozi, sirutki i ksilozi (Dufour i sur., 2011). Kvasci iz roda *Kluyveromyces* koriste se u proizvodnji komercijalno zanimljivih enzima, npr. β -galaktozidaze, inulinaze i poligalakturonaze. Također, nalaze primjenu u proizvodnji oligosaharida, koji se koriste kao sastavne komponente funkcionalne hrane, a djeluju na način da inhibiraju rast patogenih Gram negativnih bakterija i stimuliraju rast bakterija iz roda *Bifidobacterium* u ljudskom i životinjskom probavnom sustavu (Belloch i sur., 2011). Kvasac *Kluyveromyces marxianus* se smatra mogućom alternativom kvascu *S. cerevisiae* u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kluyveromyces marxianus* ima visoku brzinu rasta, može preživjeti na temperaturama do 52°C, a efikasnost fermentacije je slična kao i kod *S. cerevisiae*. Također, može efikasno fermentirati etanol pri rasponu temperatura od 38°C do 45°C. Provođenje fermentacije pri višim temperaturama (40-50°C) može imati značajne prednosti, kao što je smanjen rizik od kontaminacije, mogućnost provođenja procesa u tropskim zemljama te ekonomičnija proizvodnja (Goshima i sur., 2013). K tome, stanična membrana kvasca *K. marxianus* pokazuje visoku otpornost na toksične komponente (npr. inhibitore fermentacije) te ih može učinkovito asimilirati (Demiray i sur., 2019). Neke od vrsta roda

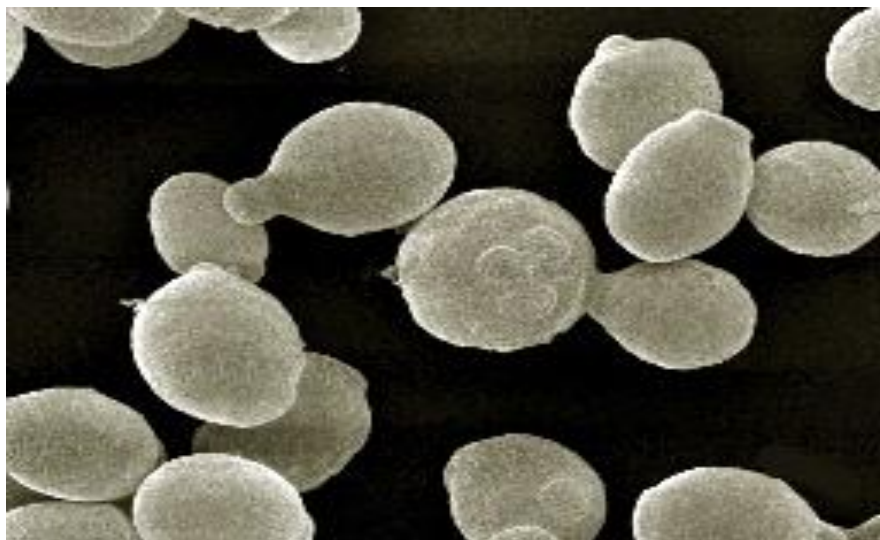
Kluyveromyces su poznati kao oportunistički patogeni kod imunokompromitiranih bolesnika što otežava postizanje GRAS statusa kojeg ima *S. cerevisiae* (Dufour i sur., 2011). Proučavajući fermentacijski potencijal kvasca *K. marxianus* tijekom uzgoja na glukozu i ksilozi, uočeno je da upotrebom glukoze kao supstrata tijekom fermentacije nastaje etanol, dok upotrebom ksiloze kao supstrata kao glavni produkt nastaje ksilitol, dok se etanol javlja kao međuprodukt. Također, veća produktivnost zabilježena je u mediju sa glukozom, no kvasac je pokazao veću specifičnu aktivnost u mediju sa ksilozom, upućujući na to da toksične komponente nemaju inhibicijski učinak na metabolizam šećera (Leonel i sur., 2021).

2.3.3. Kvasci roda *Candida*

Rod *Candida* uključuje 200 poznatih vrsta, od kojih su mnoge važne za proizvodnju bioetanol. Nekoliko vrsta, uključujući kvasce *Candida lusitanae*, *Candida shehatae* i *Candida tropicalis*, može koristiti ksilozu. Vrsta *C. tenuis* može koristiti celobiozu, manozu, saharozu i fruktozu kao supstrate u proizvodnji etanola (Dufour i sur., 2011). *C. shehatae* je Crabtree negativan kvasac koji uglavnom proizvodi biomasu i ugljikov dioksid kada nema limitacije hranjivim sastojcima, ali može proizvesti etanol u uvjetima limitacije kisikom (Fromanger i sur., 2010). Većina kvasaca roda *Candida* može rasti aerobno na ksilozi, ali samo nekoliko vrsta može fermentirati ksilozu i na taj način proizvesti etanol (npr. kvasac *C. tropicalis* koji fermentira ksilozu u uvjetima limitacije kisikom uz povećane koncentracije polietilen glikola) (Petravić-Tominac i sur., 2017).

2.3.4. Kvasci roda *Pichia*

Kvasci iz roda *Pichia* imaju sposobnost fermentacije glukoze i ksiloze u etanol, a kvasac *Pichia stipitis* (slika 2) pokazao se kao potencijalni kvasac za industrijsku primjenu u proizvodnji etanola zbog sposobnosti fermentacije ksiloze sa visokim prinosom etanola. Također, *P. stipitis* ne zahtijeva dodatak nutrijenata u podlogu tijekom fermentacije ksiloze te može fermentirati širok raspon šećera. (Agbogbo i sur., 2006; Nigam, 2001).



Slika 2. Kvasac *Pichia stipitis* (U. S. Forest Service, 2014)

P. stipitis ima sposobnost prevođenja šećera glukoze, ksiloze, manoze, galaktoze i celobioze u etanol. Također, može koristiti L-arabinozu kao supstrat za umnažanje biomase. Optimalna temperatura za kvasac *P. stipitis* tijekom provođenja fermentacije je između 25 i 33°C, a optimalna pH vrijednost između 4,5 i 5,5. Važnu ulogu u rastu kvasca i proizvodnji etanola imaju sastojci podloge koji su, kao i njihov utjecaj, navedeni u tablici 2. (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008).

U kvascu postoje dva sustava za transport šećera u stanicu. Jedan je sustav niskog afiniteta te se odvija olakšanom difuzijom, a koristi se za transport glukoze i ksiloze pri visokim koncentracijama šećera. U tom sustavu glukoza inhibira transport ksiloze nekonkurentnom inhibicijom. Drugi je sustav visokog afiniteta i stanice ga koriste kod niskih koncentracija šećera u okolini stanice, a funkcionira kao proton-simport (Jeffries i sur., 2007).

Tablica 2. Različiti sastojci podloge i njihov utjecaj na rast i proizvodnju etanola kod kvasca *P. stipitis* (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008)

Sastojak podloge	Soj kvasca <i>P. stipitis</i>	Utjecaj na rast stanica	Utjecaj na koncentraciju etanola
amonijak	NRRL Y-7124 CBS 6054	neznatno smanjenje rasta stanica	povećanje koncentracije etanola
aminokiseline	NRRL Y-7124	arginin, histidin, izoleucin i prolin povećavaju stanični rast; alanin, glutaminska kiselina, leucin i tirozin smanjuju stanični rast	alanin, arginin, aspartat, glutamat, glicin, histidin, leucin i tirozin povećavaju koncentraciju etanola; izoleucin smanjuje koncentraciju etanola
kalcij	NRRL Y-7124 CBS 6054	povećani stanični rast kod niskih koncentracija (0.34 mM), a kod viših koncentracija smanjen stanični rast (1 mM)	neznatno niža koncentracija etanola i prirast biomase na etanolu
ugljičkov dioksid	CBS 5773 CBS 5776	smanjenje brzine rasta	smanjenje brzine fermentacije i konačne koncentracije etanola
kukuruzna močevina	CBS 6054	povećanje rasta	povećanje brzine fermentacije i konačne koncentracije etanola
magnezij (1-4 mM)	NRRL Y-7124	povećanje rasta	povećanje koncentracije etanola
sladni ekstrakt, kvašćev ekstrakt i amonijev sulfat	CBS 6054	smanjenje rasta	smanjenje brzine fermentacije i konačne koncentracije etanola

Tablica 2. (nastavak)

pepton, kvašćev ekstrakt, MgSO₄ i KH₂PO₄	CBS 6054	smanjenje rasta	povećanje brzine fermentacije i konačne koncentracije etanola
purini i pirimidini	NRRL Y-7124	nemaju znatan utjecaj na rast	nemaju utjecaj na proizvodnju etanola
kvašćev ekstrakt iz kojeg su uklonjeni izvori ugljika	CBS 6054	smanjenje staničnog rasta	smanjenje brzine fermentacije, ali povećanje konačne koncentracije etanola
vitamini	NRRL Y-7124	poboljšavaju rast	nemaju utjecaj na proizvodnju etanola

Tijekom uzgoja kvasca *P. stipitis* važan parametar je i kisik budući da on utječe na stanični rast, redoks ravnotežu, funkcioniranje mitohondrija i proizvodnju energije za transport ksiloze (Skoog i Hahn-Hagerdal, 1990). Nadalje, što se tiče fermentacije, ona se ne inducira visokim koncentracijama šećera, ali se inaktivira aerobnim uvjetima. Smanjenje koncentracije kisika uzrokuje prelazak iz respiratornog u fermentativni metabolizam (Passoth i sur., 1996). Neka istraživanja su pokazala da *P. stipitis* ima sposobnost proizvodnje etanola i u anaerobnim uvjetima, no optimalni su mikroaerobni uvjeti (Grootjen i sur., 1990). Utjecaj na fermentaciju ima i početna koncentracija ksiloze, te je uočena maksimalna produktivnost kvasca *P. stipitis*, u proizvodnji etanola, kod početne koncentracije ksiloze od 50 g L⁻¹. Visoke koncentracije šećera povećavaju osmotski stres stanice što vodi do smanjenja rasta i brzine fermentacije (Agbogbo i Coward-Kelly, 2008).

Negativan utjecaj na stanice kvasca pokazuje i etanol, koji može oštetiti staničnu membranu narušavanjem njene organizacije i propusnosti. Etanol utječe na prijenos protona kroz staničnu membranu što dovodi do zakiseljavanja citoplazme i smrti stanice. Tolerancija kvasca *P. stipitis* povezana je sa ATP-aznom aktivnošću stanične membrane. ATP-aze se koriste za transport protona kroz staničnu membranu kako bi se smanjilo zakiseljavanje citoplazme. Stanice kvasca *P. stipitis* koje rastu na glukozu pokazuju veću ATP-aznu aktivnost od onih koje rastu na glukozu.

Iz navedenog se može zaključiti da stanice koje rastu na glukozi imaju veću toleranciju na proizvedeni etanol (Meyrial i sur., 1995).

Kvasac *Pichia stipitis* pokazuje značajnu proizvodnju etanola iz ksiloze, pri čemu neki sojevi proizvode gotovo 6 g L⁻¹ etanola (to je 67 % od teorijskog prinosa, koji iznosi 9 g L⁻¹). Optimiranjem koncentracije kisika u kontinuiranom uzgoju postignut je maksimalni prinos od 0,48 g g⁻¹ (gram etanola po gramu ksiloze) i specifična produktivnost 0,20 g L⁻¹ h⁻¹ (Skoog i Hahn-Hagerdal, 1990). Također, za proizvodnju etanola u podlozi koja sadrži 150 g L⁻¹ ksiloze pomoću kvasca *P. stipitis*, uz optimalnu pH vrijednost 4-7 te optimalnu temperaturu 34°C, postiže se prinos od 57 g L⁻¹. Optimiranjem sastava hranjive podloge te primjenom genetičkih modifikacija nastoji se postići veći prinos etanola te veća otpornost kvasca prema inhibitorima. Shodno tome, u mediju optimalnog sastava za dobivanje etanola, koji sadrži 150 g L⁻¹ ksiloze, moguće je postići prinos od 61 g L⁻¹ (Dufour i sur., 2011).

Za razliku od *P. stipitis*, kvasac *S. cerevisiae* ima veću toleranciju na etanol pa samim time može proizvesti i veću koncentraciju etanola, ali ne može koristiti ksilozu. Genetičkim inženjerstvom može se konstruirati soj kvasca *S. cerevisiae* koji ima sposobnost korištenja ksiloze, no u takvom slučaju bilježi se niska proizvedena koncentracija etanola. Kvasac *S. cerevisiae* podnosi širi interval pH vrijednosti (3-8) te veće temperature (do 44°C) za razliku od kvasca *P. stipitis*. Kvasac *P. stipitis* je Crabtree-negativan, što znači da ne proizvodi etanol u aerobnim uvjetima, čak ni u uvjetima suviška šećera, a metabolizam kvasca *P. stipitis* ovisi samo o opskrbi stanica kisikom. Kvasac *S. cerevisiae* je za razliku od *P. stipitis* Crabtree-pozitivan te on može proizvoditi etanol i u aerobnim uvjetima ako je prisutna velika koncentracija šećera (Gibbons i Hughes, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Polazni materijal korišten u ovome radu je čvrsta faza dobivena prethodnom obradom čipsa bukve koja potječe sa područja sjeverozapadne Hrvatske. Suha tvar čipsa bukva korištenog u ovom eksperimentu sadrži: 46,54 % (w/w) glukana, 14,72 % ksilana s primjesama manana i galaktana, 0,13 % arabinana, 4,35% octene kiseline, 28,28 % lignina netopljivog u kiselini te 1,85 % lignina topljivog u kiselini, 0,97% pepela i 5,64 % ekstraktivnih spojeva (Ilić, 2017). U navedenom radu provedena je blago kiselska hidroliza (0,5 % w/v H₂SO₄, 180 °C, 10 minuta). Prije enzimske hidrolize sirovina je raširena u tankom sloju radi sušenja te je ostavljena nekoliko dana u sušioniku pri 50 °C. Tijekom sušenja povremeno je provedeno prevrtanje sirovine.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 3. Popis kemikalija korištenih za izradu rada

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
natrijev acetat trihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
octena kiselina	za upotrebu u biotehnologiji	Alkaloid, Skopje
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
D(+)-glukoza (bezvodna)	p.a.	Kemika, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	-	Merck, Njemačka
pepton	-	Merck, Njemačka
diamonijev sulfat	p.a.	Kemika, Zagreb
diamonijev fostat	p.a.	Kemika, Zagreb
magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Zagreb
kalijev heksacijanoferat trihidrat	p.a.	Kemika, Zagreb
natrijev hidroksid	p.a.	Kemika, Zagreb
sumporna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
demineralizirana voda	p.a.	PBF, Zagreb

3.1.2.1. Priprema acetatnog pufera

Za pripremu pola litre 0,01 M acetatnog pufera pH 5 korišteno je 0,276 g natrijeva acetata te 93,3 µL octene kiseline (0,2 M) u tikvici od 1 L, te je tikvica nadopunjena demineraliziranom vodom. Za pripremu pola litre 0,05 M acetatnog pufera pH 5 korišteno je 1,381 grama natrijeva acetata te 467,2 µL octene kiseline (0,2 M) u tikvici od 1 L te je tikvica nadopunjena demineraliziranom vodom.

3.1.3. Enzimi

Za enzimsku hidrolizu čvrstog dijela hidrolizata bukve korišteni su komercijalni pripravci enzima:

Viscozyme L (Novozyme, Danska) – mješavina celulolitičkih enzima, sinonim: lizirajući enzimi iz *Aspergillus* sp.

Cellulase enzyme blend (Sigma-Aldrich, Njemačka) – mješavina celulolitičkih enzima, sinonim: Cellic CTec 2.

3.1.4. Radni mikroorganizam

U ovom radu, kao radni mikroorganizam, korišten je divlji soj kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t (t – type strain) iz japanske kolekcije mikroorganizama (*Japanese Collection of Microorganisms*, JCM).

3.2. APARATURA I PRIBOR

3.2.1. Laboratorijski pribor

- Erlenmayerove tikvice 300 – 3000 mL
- staklene i plastične menzure

- staklene i plastične čaše
- staklene epruvete od 10 do 15 mL
- filter papir, veličina pore 0,45 mm
- filteri, veličina pore 0,45 μm
- staklene pipete različitih volumena
- staklene odmjerne tikvice različitih volumena
- eppendorf kivete
- najlonski filteri promjera pora 0,2 μm
- Büchnerov lijevak
- mikrobiološka ušica
- plastične kivete

3.2.2. Uređaji i instrumenti

- termostat, *Instrumentaria* ST-50, Zagreb, Hrvatska
- autoklav, *Sutjeska*, Beograd, Jugoslavija
- centrifuga SL 8R *ThermoScientific*, Waltham, Massachusetts, SAD
- analitička vaga *Acculab* ALC210.4, Njemačka
- magnetska mješalica Cimarec iTM Poly15, *Thermo Scientific*, Waltham, MA, SAD
- rotacijska tresilica Certomat IS, *Braun*, Velika Britanija
- laminar s UV lampom (30 W), *Klimaoprema*, Hrvatska
- autoklav, *Instrumentaria*, Hrvatska
- sušionik ST-01/02, *Instrumentaria*, Hrvatska
- UV-VIS Spektrofotometar UNICAM, *HELIOS β* , Velika Britanija

- laboratorijska centrifuga Rotofix 32, *Hettich*, Njemačka
- analitička vaga, *Sartorius*, Velika Britanija

3.3.METODE

3.3.1. Enzimska hidroliza čvrstog dijela blagokiselog hidrolizata bukve u Erlenmeyerovim tikvicama

Enzimska hidroliza usitnjenog i predobrađenog čvrstog dijela blagokiselog hidrolizata bukve provedena je pomoću komercijalnih enzima *Viscozyme L* i *Cellulase enzyme blend*. Postupak enzimske hidrolize prvo je proveden u volumenu od 100 mL. U dvije Erlenmeyer tikvice stavljeno je po 100 mL acetatnog pufera (0,01 M pufer u prvu tikvicu te 0,05 M pufer u drugu tikvicu) te u treću 100 mL demineralizirane vode. U svaku tikvicu je dodano 4 grama čvrstog dijela hidrolizata bukve te su tikvice zatvorene vatenim čepom i sterilizirane. Nakon hlađenja dodano je 2 % (v/v) enzima *Cellulase enzyme blend* te 5 % (v/v) enzima *Viscozyme L* na ukupni volumen tikvice. Dodatak enzima u sterilnu suspenziju čvrstog dijela hidrolizata bukve proveden je u sterilnim uvjetima. Hidroliza je provedena pri temperaturi od 50°C na magnetskoj miješalici tijekom 96 h. Izuzimani su uzorci od 2 mL nakon dodatka enzima (0 h), nakon 24 h i 96 h. Izuzeti su uzorci i pripremljeni za UPLC analizu.

Nakon provedene enzimske hidrolize u različitim medijima (0,01 M acetatnom puferu, 0,05 M acetatnom puferu te demineraliziranoj vodi) te provedene UPLC analize utvrđeno je da je najbolji medij za hidrolizu kolača bukve 0.01 M acetatni pufer, koji je potom korišten za provođenje eksperimenta u većem mjerilu. Pripremljeno je 3 L 0,01 M acetatnog pufera te je u pufer dodano 223 g čvrstog dijela kiselinskog hidrolizata bukve. Enzimska hidroliza je provedena dodatkom 2 % (v/v) enzima *Cellulase enzyme blend* te 5 % (v/v) *Viscozyme L* tijekom 48 h pri 50°C na magnetskoj miješalici. Nakon završene enzimske hidrolize, dobiveni hidrolizat je steriliziran te profiltriran kroz Büchnerov lijevak. Izuzeti su uzorci od 2 mL prije i nakon završetka enzimske hidrolize i pripremljeni za UPLC analizu.

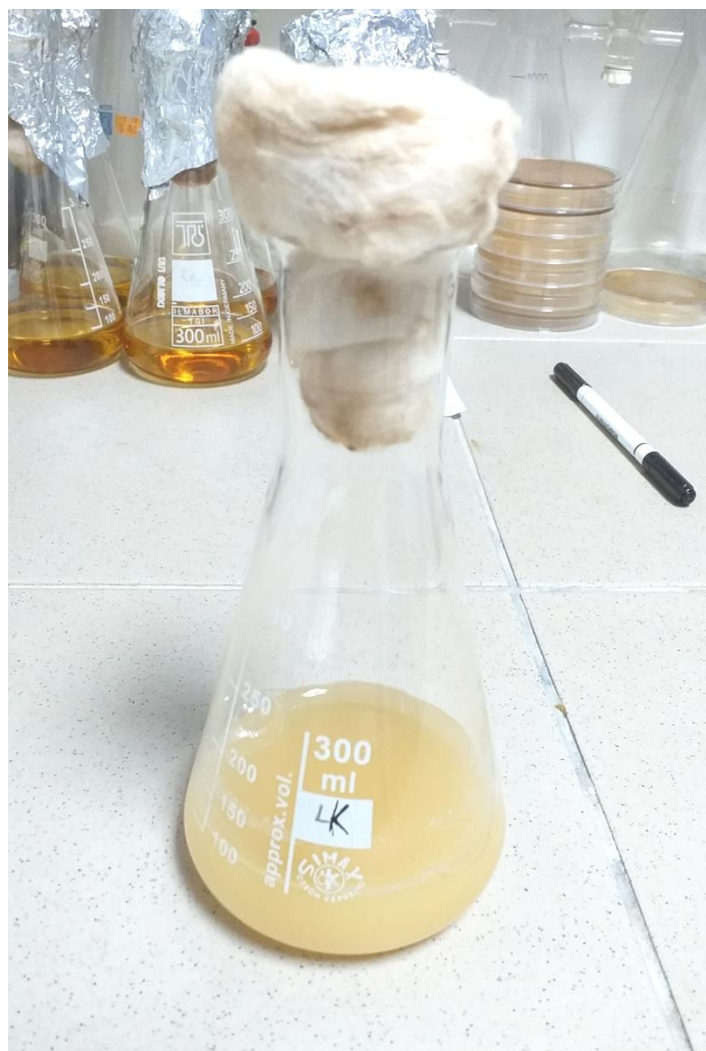
3.3.2. Priprema uzoraka i analiza monosaharida i inhibitora UPLC metodom

U izuzetim uzorcima najprije je zaustavljena enzimska reakcija zagrijavanjem u Thermo-shakeru na 95°C, 10 min te su zatim uzorci centrifugirani 10 minuta. Uzeto je 750 µL supernatanta te dodano 750 µL cinkovog sulfata (100 g L⁻¹) kako bi se istaložili proteini. Smjesa je promiješana pomoću vrtložne miješalice i ostavljena da stoji 5 minuta pri sobnoj temperaturi te nakon toga centrifugirana 6 minuta (10000 o min⁻¹) kako bi se izdvojili istaloženi proteini. Dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice s najlonskim filterom promjera pora 0,2 µm. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su UPLC metodom.

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) korištena je za određivanje koncentracija šećera i inhibitora. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline uz protok 0,6 mL min⁻¹. Analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) s pretkolonom zagrijavana je na 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID), a obrada kromatograma napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Koncentracije u uzorcima izračunate su iz odgovarajućih baždarnih pravaca.

3.3.3. Priprema inokuluma kvasca *Pichia stipitis*

Prije uzgoja inokuluma pripremljeno je 100 mL YPD (eng. Yeast Extract-Peptone-Dextrose Broth) podloge za inokulum sljedećeg sastava: 20 g L⁻¹ glukoze, 10 g L⁻¹ peptona, 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta te demineralizirana voda. Kvasac je naciepljen pomoću mikrobiološke ušice, sa čvrste podloge iz epruvete, u 10 mL YPD tekuće podloge u epruveti te je uzgajan u laboratorijskoj tresilici pri 100 o min⁻¹ tijekom 48 h, pri 29 °C te . Ovakou uzgojen inokulum u volumenu je naciepljen u 100 mL YPD hranjive podloge (u Erlenmeyerovoj tikvici od 300 mL). Inokulum je dalje uzgajan na laboratorijskoj tresilici, pri 29°C, 100 o min⁻¹, tijekom 24 sata.



Slika 3. Pripremljeni inokulum kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t (Vlastita fotografija)

3.3.4. Uzgoj divljeg soja kvasca *Pichia stipitis* na hranjivim podlogama sa enzimskim hidrolizatom bukve

Divlji soj kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t uzgajan je na enzimskom hidrolizatu u različitim uvjetima (sastav podloge, pH, temperatura, intenzitet aeracije) kako bi se odredili optimalni uvjeti uzgoja za selekcionirani soj kvasca.

3.3.5. Utjecaj sastava podloge na rast divljeg soja kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t

Uzgoj biomase kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t proveden je pri različitom sastavu podloge kako bi se utvrdilo u kojem sastavu podloge kvasac najbolje raste. Sastavi korištenih hranjivih podloga i pripadajuće oznake navedeni su u tablici 3. Prije uzgoja, sadržaj tikvica bez inokuluma je steriliziran. Nakon sterilizacije dodan je inokulum te je uzgoj proveden na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ 29 °C/ 24 h). Za svaki sastav hranjive podloge rađena je jedna paralela. Tijekom uzgoja porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica u nultom satu, tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase određena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge za uzgoj divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t s pripadajućim oznakama

Oznaka	a	b	c	d	e
Sastav	90 mL enzimskog hidrolizata, 10 mL YPD podloge	90 mL enzimskog hidrolizata, 10 mL YPD podloge, 2 gL ⁻¹ DAF, 2 gL ⁻¹ DAS	90 mL enzimskog hidrolizata, 10 mL YPD podloge, 2 gL ⁻¹ DAF, 2 gL ⁻¹ DAS, 0,5 gL ⁻¹ MgSO ₄	90 mL enzimskog hidrolizata, 10 mL YPD podloge, 2 gL ⁻¹ DAF, 2 gL ⁻¹ DAS, 5 gL ⁻¹ kvašćevog ekstrakta	90 mL enzimskog hidrolizata, 10 mL YPD podloge, 2 gL ⁻¹ DAF, 2 gL ⁻¹ DAS, 5 gL ⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 10 gL ⁻¹ HAc
Enzimski hidrolizat predobrađenog čvrstog dijela drveta bukve DAF – diamonijev fosfat DAS – diamonijev sulfat MgSO ₄ – magnezijev sulfat HAc – octena kiselina					

3.3.6. Utjecaj različite vrijednosti pH na rast divljeg soja kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t

U tri tikvice pripremljena je hranjiva podloga koja se sastojala od 10 mL YPD podloge te 90 mL enzimskog hidrolizata bukve (tablica 3, oznaka a) te je proveden uzgoj kvasca u uvjetima različitih pH vrijednosti, za svaku pH vrijednost rađena je jedna paralela. Odgovarajuće pH vrijednosti (3,7, 4,4, 5,1) su podešene pomoću 10 %-tne otopine amonijaka i 20%-tne otopine sumporne kiseline. Uzgoj je proveden u laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹, 33°C, 24 h). Tijekom uzgoja porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica u nultom satu, tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase određena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.

3.3.7. Utjecaj intenziteta aeracije na rast divljeg soja kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t

Pripremljena je podloga pod oznakom a (tablica 4), u tri različite tikvice, čija pH vrijednost je iznosila 4,4. Različit intenzitet aeracije osiguran je uzgojem divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t u različitim volumenima podloge (60, 90 i 120 mL), za svaki volumen postavljena je jedna paralela, u kojima udio YPD podloge iznosi 10 % (v/v). Uzgoj kvasca proveden je semiaerobno na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ 33°C/ 24 h). Također je paralelno proveden i anaerobni uzgoj u termostatu u volumenu od 90mL, u pripremljenoj podlozi (oznaka a – tablica 4), pri 33°C te pH vrijednosti 4,4. Tijekom uzgoja porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica u nultom satu, tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase određena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.

3.3.8. Utjecaj temperature na rast divljeg soja kvasca *Pichia stipitis* JCM 10742^t

Pripremljena je hranjiva podloga koja se sastojala od 10 mL YPD podloge te 90 mL enzimskog hidrolizata bukve (tablica 3, oznaka a) te je proveden uzgoj kvasca u uvjetima različitih vrijednosti temperature (25°C, 29°C, 33°C) u laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ pH 4,4/ 24 h). Tijekom uzgoja porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz

tikvica u nultom satu, tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase određena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.

3.4. ANALITIČKE METODE

3.4.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase

Koncentracija biomase na kraju uzgoja određivana je gravimetrijski. U prethodno izvagane kivete uzeto je po 5 mL uzorka kvašćeve suspenzije nakon provedenog uzgoja. Kvašćeva suspenzija je centrifugirana pri 4000 o min^{-1} , 10 minuta. Supernatant je odliven, a kivete s talogom biomase stavljene su na sušenje do konstantne mase pri 105°C . Nakon sušenja kivete su izvagane te je iz razlike mase pune i prazne kivete određena koncentracija biomase prema formuli:

$$X[g L^{-1}] = \frac{\text{odvaga kivete sa biomasom} - \text{odvaga prazne kivete}}{\text{volumen uzorka}}$$

3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije biomase

Koncentracija biomase određivana je spektrofotometrijski na način da je tijekom uzgoja (tijekom prvih deset sati te nakon 24 sata) sterilno uzet 1 mL uzorka iz tikvica. Uzorak je prenesen u kivetu te mu izmjerena apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm.

3.4.3. Priprema uzoraka nakon uzgoja kvasca za HPLC analizu nastalih produkata i potrošnje glukoze

Nakon provedenog uzgoja potrebno je pripremiti uzorke za HPLC analizu. 25 mL supernatanta odvojenog centrifugiranjem je prebačeno u odmjernu tikvicu od 50 mL (razrjeđenje 2 puta). U odmjernu tikvicu je zatim dodano 5 mL otopine Carrez I (kalij-heksacijanoferat trihidrat, $\gamma=36 \text{ g L}^{-1}$) i 5 mL otopine Carrez II (cinkov sulfat heptahidrat, $\gamma=300 \text{ g L}^{-1}$) da bi se istaložili proteini. Podešena je pH vrijednost pomoću 2 M NaOH $8,0 \pm 0,5$. Destiliranom vodom je dopunjen volumen tikvice do 50 mL, a onda je cijeli sadržaj profiltriran kroz filter papir veličine pora 0,45 mm te potom kroz najlonski filter veličine pora 0,22 μm .

3.4.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije nastalih produkata u uzorcima nakon provedenog uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis*. Za analizu je injektirano 20 μL uzorka u sustav uz protok mobilne faze od $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Ionsko – izmjenjivačka analitička kolona (Supelcogel™ C610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm) zagrijavana je na 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. Refractive Indeks Detector). Obrada dobivenih kromatograma napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPREMA HIDROLIZATA BUKVE

Materijal, koji je prethodno dobiven kiselinskom predobradom čipsa bukve u blagim uvjetima pomoću razrijeđene sulfatne kiseline, hidroliziran je smjesom dvaju komercijalnih enzima u acetatnom puferu koncentracija 0,01 M te 0,05 M te u vodi, kako bi se utvrdilo u kojem mediju provedena hidroliza rezultira s najmanjom koncentracijom inhibitora te najvećom koncentracijom šećera. Hidroliza je provedena u sterilnim uvjetima, u termostatu pri 50 °C, pH vrijednosti 5 tijekom 96 sati. Uzorci iz tikvica analizirani su UPLC analizom, a uzimani su prije hidrolize (0 h), nakon 24 sata te nakon 96 sati. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati UPLC analize provedene enzimске hidrolize čvrstog dijela blagokiselog hidrolizata bukve, uzoraka uzetih na početku procesa hidrolize (0 h), nakon 24 sata te nakon 96 sati

Koncentracija pojedinih spojeva (g L ⁻¹)	Glukoza	Ksiloza	Octena kiselina
0 h			
0,01 M	5,48	4,33	0,44
0,05 M	4,83	3,37	1,65
voda	4,66	3,25	0,08
24 h			
0,01 M	10,32	4,81	0,37
0,05 M	9,91	3,88	1,61
voda	9,20	3,97	0,05
96 h			
0,01 M	14,37	6,02	0,45
0,05 M	12,90	4,66	1,81
voda	12,83	4,95	0,09

Prema dobivenim rezultatima (tablica 5) utvrđeno je da je najpogodniji pufer za provedbu hidrolize 0,01 M acetatni pufer, budući da je u tim uvjetima dobivena najveća koncentracija glukoze i ksiloze te je on odabran za provođenje enzimske hidrolize u većem mjerilu. Nakon završetka hidrolize uzet je uzorak iz tikvice te je podvrgnut UPLC analizi, čime je dobivena početna koncentracija glukoze za uzgoj od 65,34 g L⁻¹ te koncentracija ksiloze 4,75 g L⁻¹.

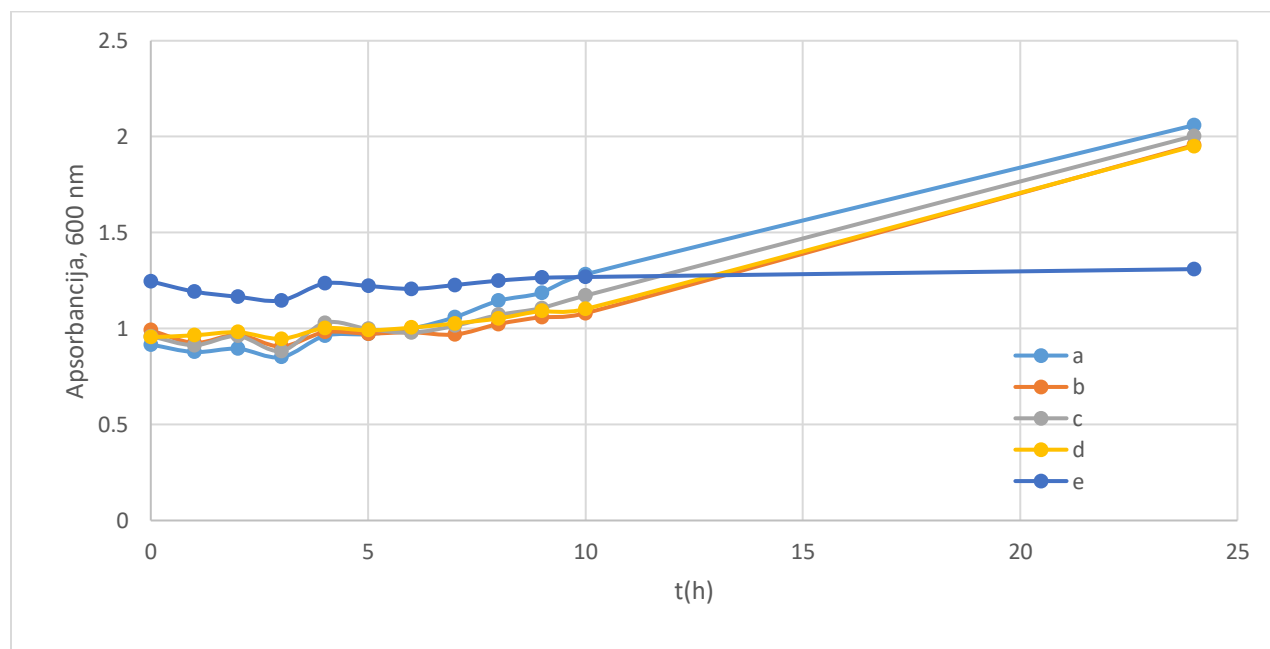
Enzimskoj hidrolizi je prethodio odabir odgovarajućeg pufera za provedbu procesa hidrolize, na način da se utvrdi u kojem mediju se, nakon hidrolize, dobije dovoljna količina šećera za kasniji uzgoj divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t. Sirovina, čvrsti dio hidrolizata bukve, prethodno je bila podvrgnuta kiselinskoj predobradi razrijeđenom sumpornom kiselinom, pri 180°C i vremenu zadržavanja od 10 minuta (Ilić, 2019). Predobrada lignoceluloznih materijala, kako bi se uklonili lignin i hemiceluloza, može značajno poboljšati enzimsku hidrolizu celuloze (Sun i Cheng, 2002). Enzimska hidroliza je provedena dodatkom komercijalnih pripravaka enzima, Viscozyme L i Cellulase enzyme blend. Raniji eksperimenti u kojima su kukuruzni oklasci tretirani istim enzimima, može se zaključiti da Viscozyme L ima veći utjecaj na hidrolizu ksilana, a Cellulase enzyme blend na hidrolizu glukana te da korištenje kombinacije navedenih enzima vodi do međudjelovanja enzima te poboljšane hidrolize u usporedbi s hidrolizom pomoću pojedinačnih enzima (Fičko, 2019). Ustanovljeno je da je najbolji medij za hidrolizu navedenim enzimima 0,01 M acetatni pufer (tablica 5) budući da je u konačnici kod te vrijednosti oslobođena najveća koncentracija glukoze nakon 96 h, 14.37 g L⁻¹, koja je veća za otprilike 10 % od vrijednosti dobivenih u 0,05 M acetatnom puferu te vodi te je on korišten za provođenje hidrolize u većem mjerilu. U 0.05 M puferu zabilježena je povišena koncentracija octene kiseline, 1,81 g L⁻¹ koja potječe iz acetatnog pufera, a octena kiselina može imati inhibitoran učinak na rast stanica kvasca (2-5 g L⁻¹). Za usporedbu, Buzala i sur. (2019) proveli su enzimsku hidrolizu čvrstog dijela hidrolizata bukve u 0.1 M acetatnom puferu, u malom mjerilu, te su dobili koncentracije glukoze u rasponu 24.49 – 30.74 mg mL⁻¹.

4.2. KINETIKA RASTA I FERMENTACIJE DIVLJEGA SOJA KVASCA *P. stipitis* JCM 10742^t

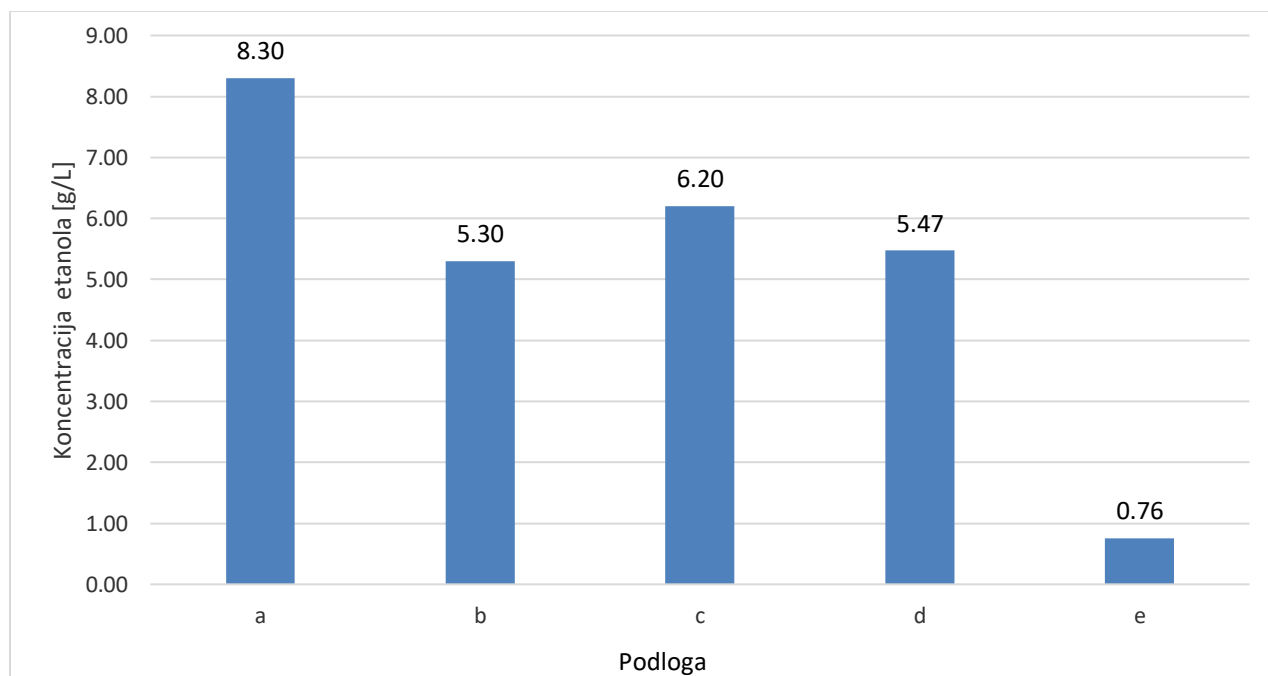
4.2.1. Utjecaj različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t

Kako bi se utvrdilo koji sastav podloge najbolje odgovara rastu divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t, u YPD podlogu su uz 90 mL enzimskog hidrolizata čvrstog dijela bukve dodavani izvori biogenih elemenata (kemijski spojevi – DAS, DAF, MgSO₄, octena kiselina; te kompleksni sastojci hranjive podloge – kvašćev ekstrakt, YPD podloga). Sastav hranjivih podloga i oznake prikazani su u tablici 4.

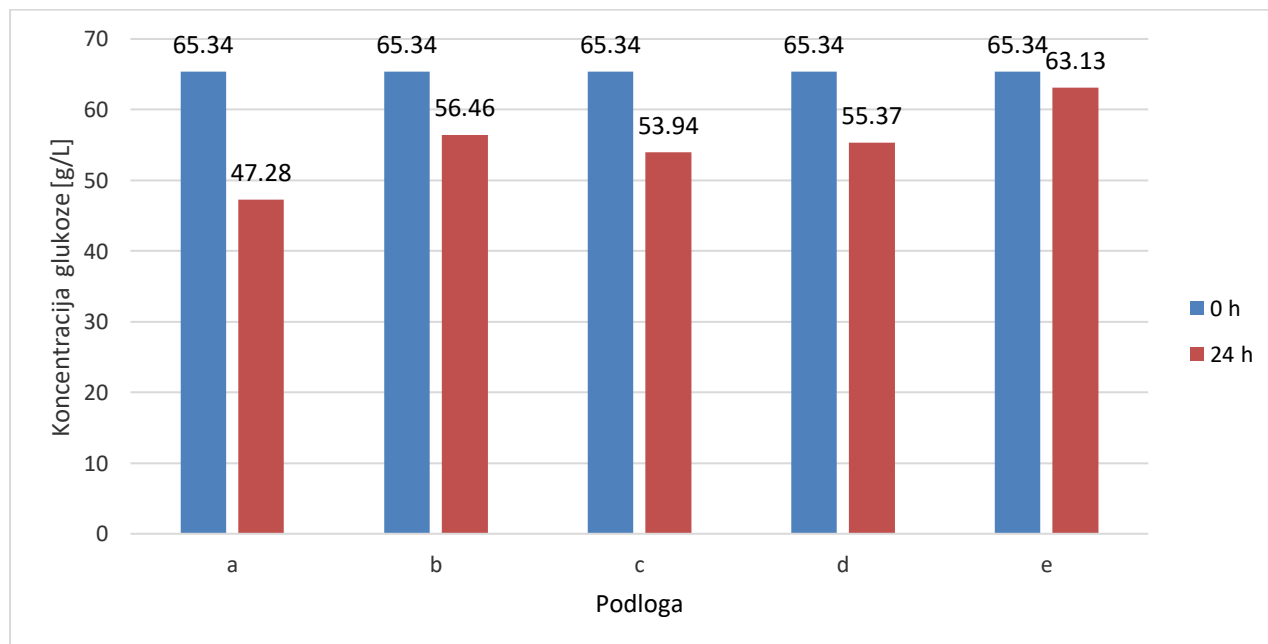
Uzgoj je proveden u malom mjerilu, na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min⁻¹, temperaturi 29 °C i pH vrijednosti 4,4 tijekom 24 sata. Rast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a potrošnja glukoze i nastali produkti praćeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 4-6, te u tablici 6.



Slika 4. Rast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^tu hranjivim podlogama različitog sastava (podloga a-e, tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ 29 °C/ pH 4,4/ 24 h)



Slika 5. Koncentracija proizvedenog etanola na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t u hranjivim podlogama različitog sastava (podloga a-e, tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ 29 °C/ pH 4,4/ 24 h).



Slika 6. Promjena koncentracije glukoze na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t u hranjivim podlogama različitog sastava (podloga a-e, tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ 29 °C/ pH 4,4/ 24 h), uz početnu koncentraciju glukoze 65,34 g L⁻¹.

Tablica 6. Koncentracija biomase, određena gravimetrijski, nakon uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t, pri različitom sastavu hranjive podloge navedenom u tablici 4

Uzorak	a	b	c	d	e
Koncentracija biomase (gL ⁻¹)	4,46	3,79	3,97	3,77	1,92

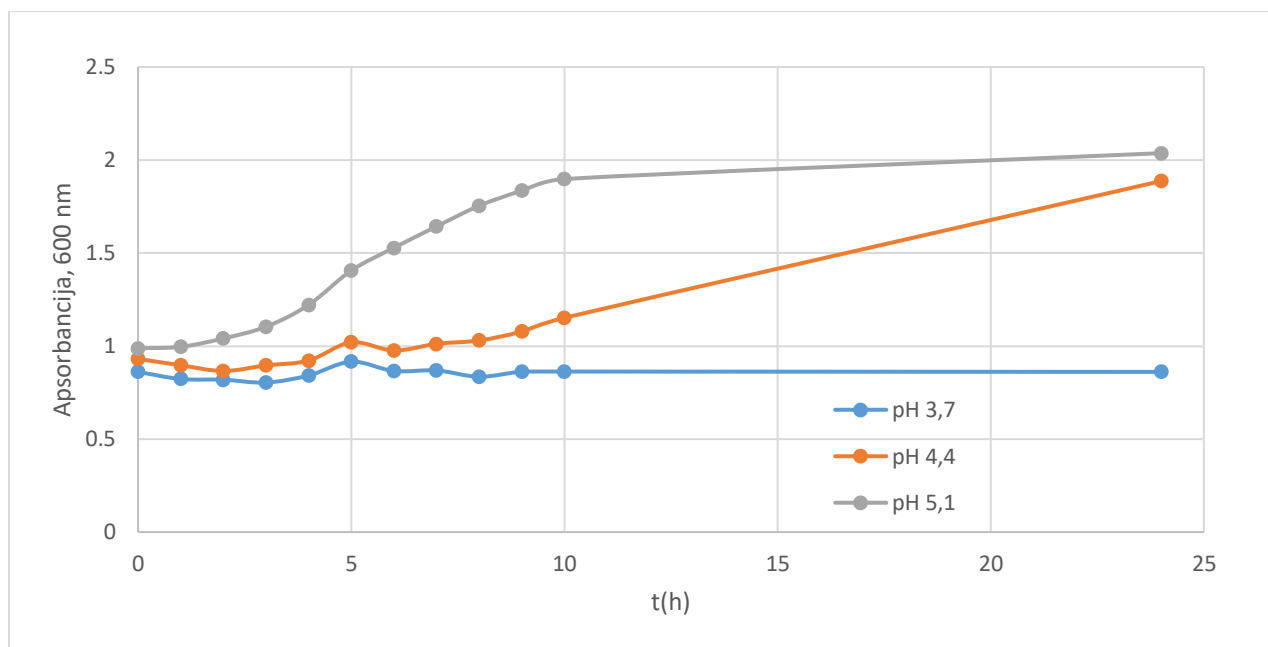
Kako bi se definirali optimalni uvjeti za rast divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t, praćeni su utjecaji različitog sastava podloge na rast divljeg soja, u laboratorijskoj tresilici tijekom 24 sata. Utjecaj različitog sastava podloge na rast divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t prikazan je na slici 4 i u tablici 6. Rast kvasca i koncentracija biomase praćeni su spektrofotometrijski i gravimetrijski tijekom uzgoja te je uočeno da je optimalan sastav podloge za uzgoj označen slovom a (tablica 4), tj. sastoji se od 90 mL enzimskog hidrolizata bukve te 10 mL YPD podloge, bez ikakvih dodatnih spojeva. U takvim uvjetima uzgoja postignuta je koncentracija biomase od 4,46 gL⁻¹ (tablica 6). Najmanji prirast biomase zabilježen je u slučaju dodatka octene kiseline (tablica 4 – oznaka e) gdje je postignuta koncentracija biomase od 1,92 g L⁻¹ (tablica 6). Octena kiselina ima inhibicijski učinak na kvasce, zabilježena koncentracija od 2-5 gL⁻¹ inhibira osmotolerantne kvasce: *C. utilis*, *P. stipitis* i *P. tannophilus*. Inhibirajući efekt se povećava sa smanjenjem pH vrijednosti, sa povećanjem broja nedisociranih molekula kod niže pH vrijednosti (Nigam, 2001). Velika koncentracija porasle biomase, od 3,97 g L⁻¹ zabilježena je u slučaju dodatka magnezijeva sulfata (tablica 4 – oznaka „c“), a smatra se da magnezij štiti stanice kvasca tijekom fermentacije, na način da se smanjuje propusnost plazmine membrane u stresnim uvjetima (Silva i sur., 2012). Kvašćev ekstrakt je mješavina aminokiselina, vitamina i magnezija te se smatra važnim nutritivnim izvorom za uzgoj raznih vrsta kvasaca. Prema nekim autorima kvašćev ekstrakt ima pozitivne utjecaje na rast, vijabilnost i fermentaciju (Silva i sur., 2012), no u ovom istraživanju dodatkom kvašćevog ekstrakta nisu postignute najveće vrijednosti prirasta biomase.

Nakon završenog uzgoja kvasca, potrošnja glukoze te dobiveni produkti određeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 5 i 6. Od nastalih produkata, uočena je značajna količina proizvedenog etanola, dok su vrijednosti ostalih produkata zanemarive. Najveća koncentracija proizvedenog etanola zabilježena je u hranjivoj podlozi pod oznakom a (tablica 4)

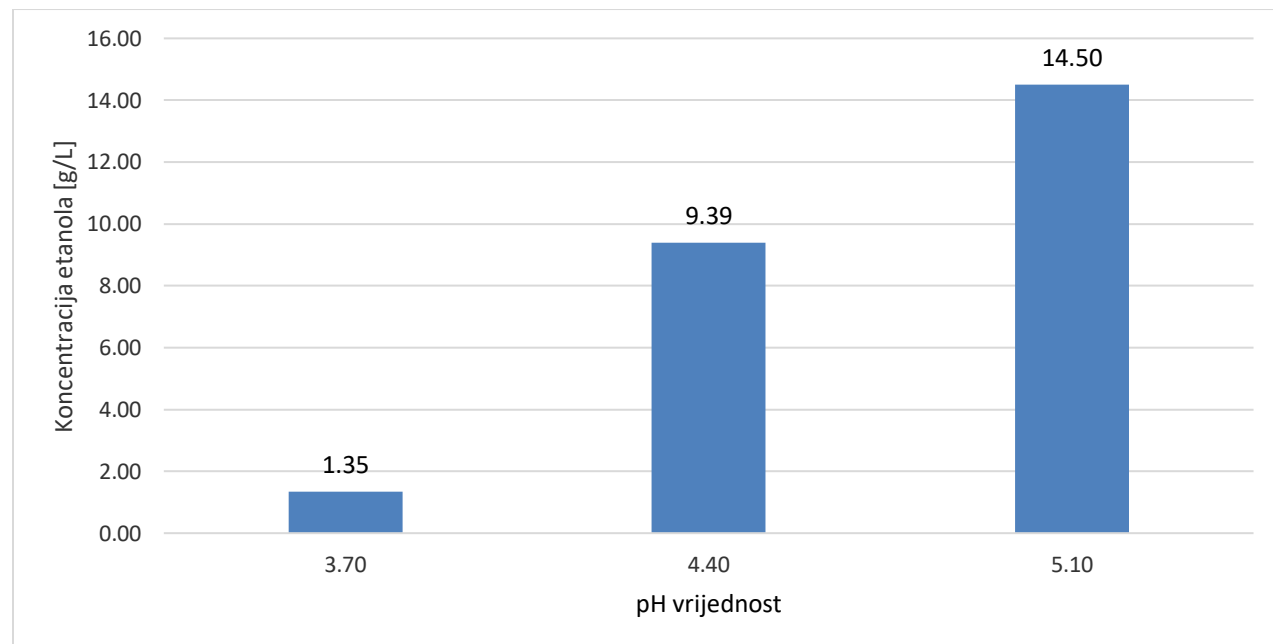
te iznosi 8,30 g L⁻¹. Cho i sur. (2011) proveli su fermentaciju hidrolizata različitih dijelova drvnog otpada, pomoću kvasca *P. stipitis*KCCM 12009 te se koncentracija proizvedenog etanola kretala u rasponu od 12.7 do 25.6 g L⁻¹. Najmanja koncentracija proizvedenog etanola zabilježena je u slučaju dodatka octene kiseline (podloga označena slovom e - tablica 4), te iznosi 0,76 g L⁻¹ što je otprilike 90 % manje od najviše postignute vrijednosti proizvedenog etanola u ovom radu. Određivanjem potrošnje glukoze tokom uzgoja divljeg soja kvasca *P.stipitis* može se uočiti da je najviše glukoze utrošeno u uvjetima uzgoja pod oznakom a (tablica 4), 18.06 g L⁻¹ glukoze, što iznosi otprilike 28 % od početne koncentracije glukoze. U istim uvjetima proizvedena je najveća koncentracija biomase te najveća koncentracija etanola.

4.2.2. Utjecaj pH vrijednosti na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t

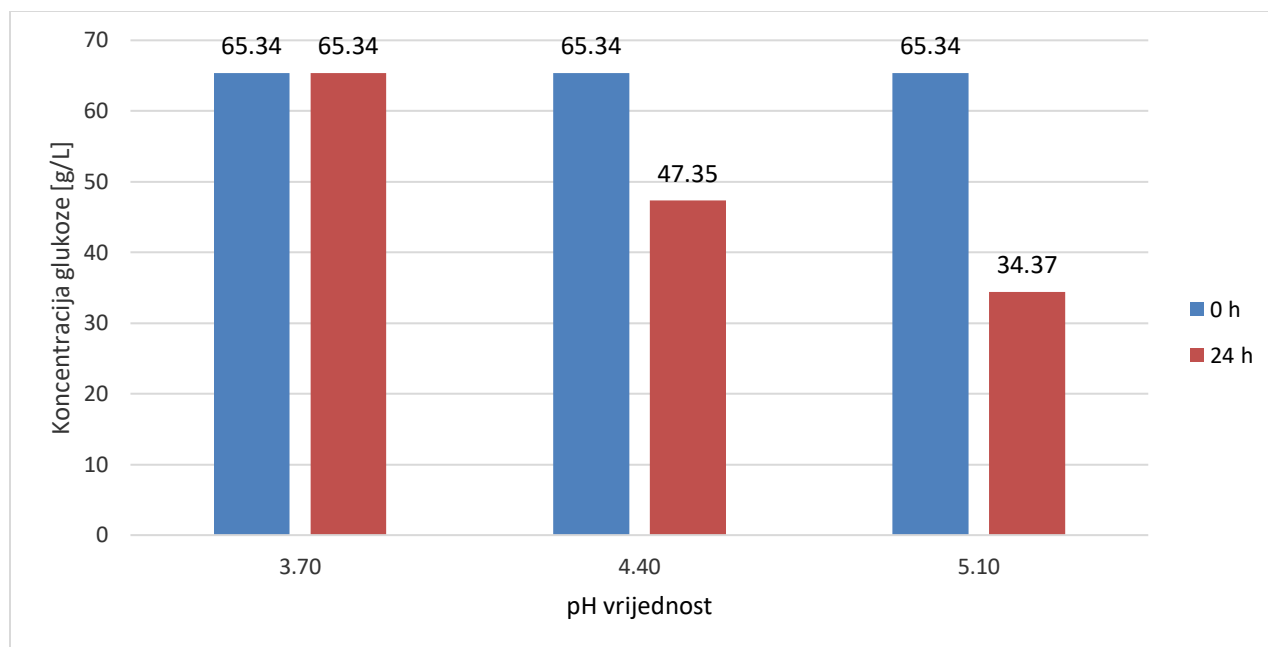
Kako bi se utvrdio utjecaj pH vrijednosti na rast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, kvasac je uzgajan u hranjivoj podlozi koja je sadržavala 10 % (v/v) YPD podloge te 90 % (v/v) enzimskog hidrolizata bukve (tablica 4 – oznaka a) . Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min⁻¹ i temperaturi 33°C kroz 24 sata. Prilikom uzgoja namještena je pH vrijednost tikvica na 3,7, 4,4 te 5,1. Porast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti i potrošnja glukoze praćeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 7-9, te u tablici 7.



Slika 7. Rast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, praćen spektrofotometrijski, na laboratorijskoj tresilici (100 omin⁻¹/ 33°C/ 24 h) sa sastavom podloge navedenim u tablici 4 pod oznakom a, pri različitim pH vrijednostima (3,7, 4,4, 5,1)



Slika 8. Koncentracija proizvedenog etanola, na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t; na laboratorijskoj tresilici (100 omin⁻¹/ 33°C/ 24 h), sa sastavom podloge navedenim u tablici 4 pod oznakom a, pri različitim pH vrijednostima (3,7, 4,4, 5,1)



Slika 9. Promjena koncentracije glukoze na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ 33°C/ 24 h), sa sastavom podloge navedenim u tablici 4 pod oznakom a, pri različitim pH vrijednostima (3,7, 4,4, 5,1).

Tablica 7. Koncentracija biomase, određena gravimetrijski, nakon provedenog uzgoja divljeg soja kvasca *P.stipitis*, pri različitim pH vrijednostima.

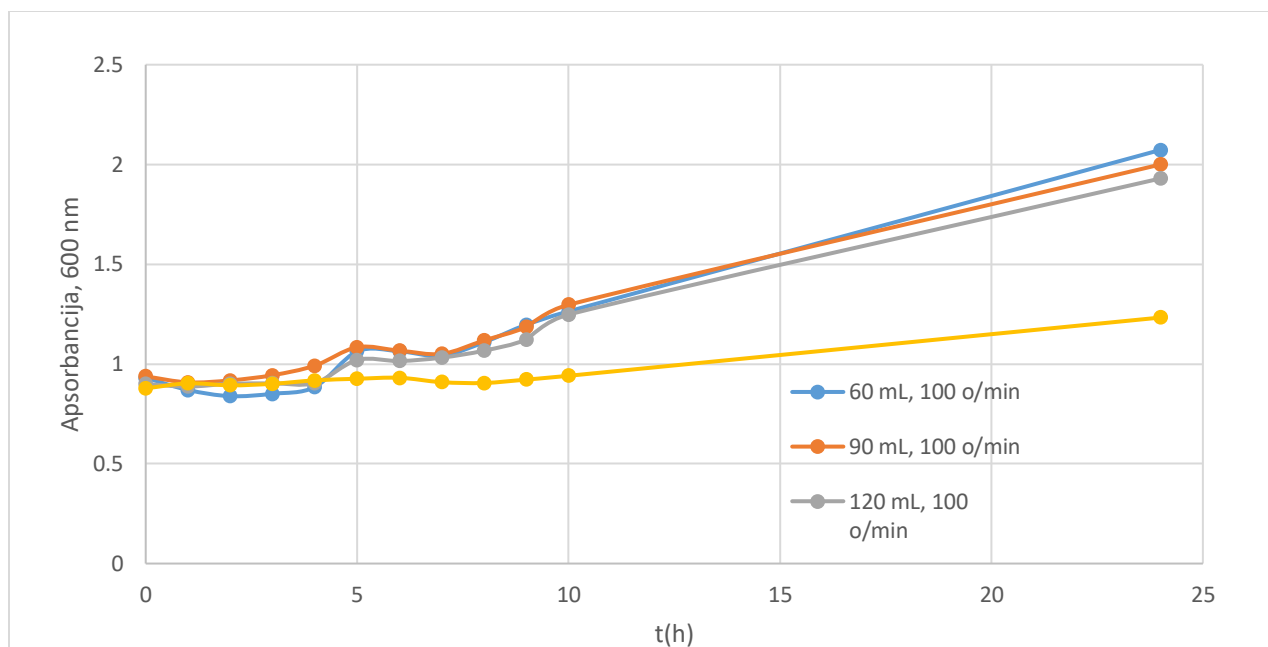
Uzorak	3,7	4,4	5,1
Koncentracija biomase (g L ⁻¹)	2,23	3,95	4,23

Kako bi se ustanovili optimalni uvjeti za rast divljeg soja kvasca *P. stipitis*, hranjiva podloga s optimalnim sastavom, u kojoj je postignuta najviša koncentracija porasle biomase (tablica 6 - oznaka a), podvrgnuta je daljnjem uzgoju u uvjetima različite pH vrijednosti. Kvasac je uzgajan u tri tikvice s različitim vrijednostima pH: 3,7, 4,4 te 5,1. Praćenjem uzgoja gravimetrijski (tablica 7) te spektrofotometrijski (slika 7) ustanovljeno je da je najveći prirast biomase postignut kod pH vrijednosti od 5,1 te iznosi 4,23 g L⁻¹. Smanjenjem pH vrijednosti pada i koncentracija proizvedene biomase pa je tako najniža koncentracija biomase od 2,23 g L⁻¹ zabilježena kod najmanje pH vrijednosti od 3,7. U nekim istraživanjima, optimalna pH vrijednost za kvasac *P.*

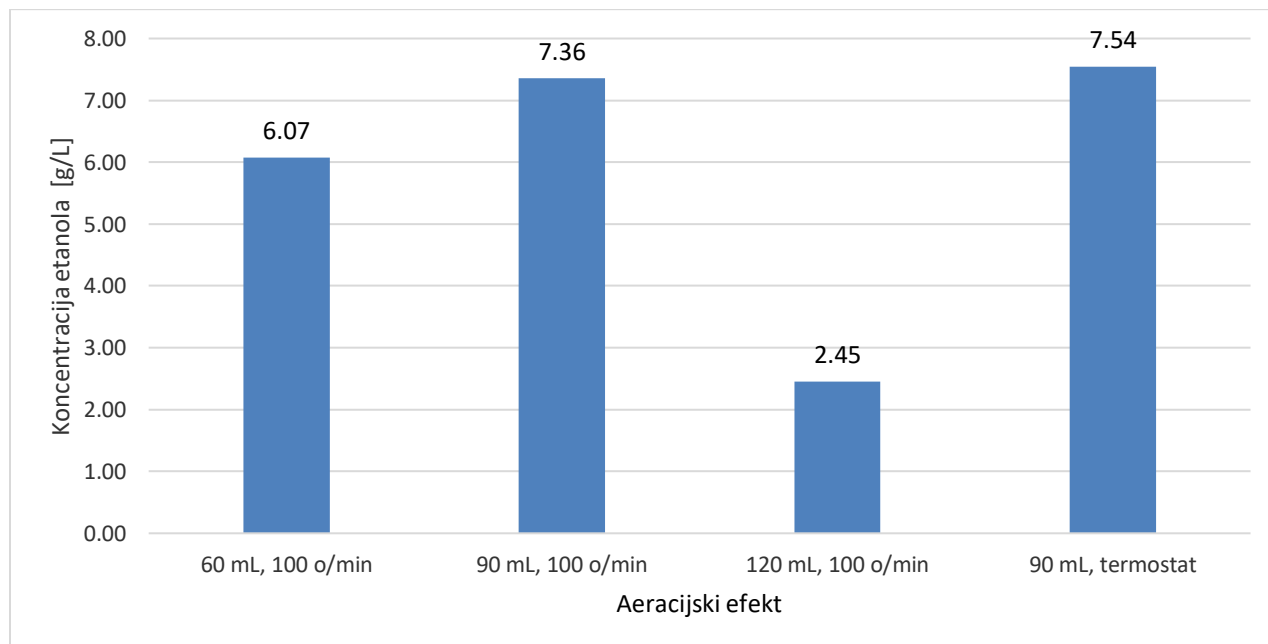
stipitis iznosi oko 4-5,5 (Du Preez i sur., 1986, Telli-Okur i Eken-Saraçoğlu, 2008) za proces alkoholne fermentacije. Poznato je da je pKa vrijednost octene kiseline 4,76 pri 25°C, a velika koncentracija nedisociranog oblika octene kiseline u enzimskom hidrolizatu inhibira rast stanica. Inhibicijski učinak može se smanjiti povišenjem pH vrijednosti medija za uzgoj kvasca na vrijednost višu od optimalne (Telli-Okur i Eken-Saraçoğlu, 2008). Porastom pH vrijednosti raste i koncentracija proizvedenog etanola te potrošnja glukoze. Do istog zaključka došao je i Nigam (2001) uzgojem dva različita soja kvasca na hidrolizatu drvnih ostataka.

4.2.3. Utjecaj intenziteta aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t

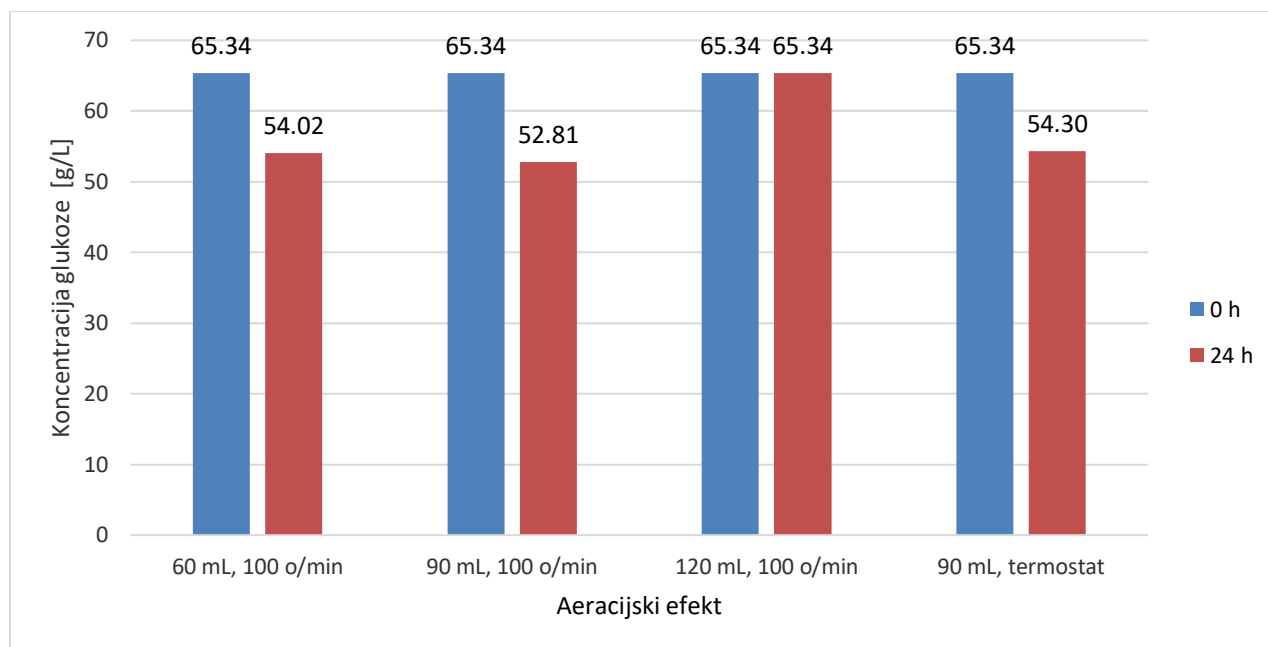
S ciljem utvrđivanja utjecaja intenziteta aeracije na prirast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, uzgoj kvasca proveden je aerobno na laboratorijskoj tresilici pri 100 o_{min}⁻¹, temperaturi 25°C te pH vrijednosti 4,4 tijekom 24 sata, također paralelno je proveden i anaerobni uzgoj u termostatu u volumenu od 100 mL pri istim uvjetima pH i temperature. Različit intenzitet aeracije osiguran je uzgojem divljeg soja kvasca *P. stipitis* u različitim volumenima podloge (60-120 mL), u kojima udio YPD podloge iznosi 10 % (v/v). Prirast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti i potrošnja glukoze praćeni su HPLC analizom. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 10-12 te u tablici 8.



Slika 10. Utjecaj intenziteta aeracije na prirast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, uzgojem na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL; 100 o/min⁻¹) te u termostatu (90 mL)(29°C/ pH 4,4/ 24 h) sastavu podloge pod oznakom a (tablica 4), praćen spektrofotometrijski



Slika 11. Koncentracija proizvedenog etanolanakon uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t; na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL; 100 o/min⁻¹) te u termostatu (90 mL) (29 °C/ pH 4,4/ 24 h) pri različitom intenzitetu aeracije i sastavu podloge pod oznakom a (tablica 4)



Slika 12. Promjena koncentracije glukoze nakon uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL; 100 o/min⁻¹) te u termostatu (90 mL) (29 °C/ pH 4,4/ 24 h) i sastavu podloge pod oznakom a (tablica 4) pri različitim vrijednostima intenziteta aeracije

Tablica 8. Koncentracija biomase, određena gravimetrijski, nakon provedenog uzgoja divljeg soja kvasca *P.stipitis*JCM 10742^t, pri različitom intenzitetu aeracije

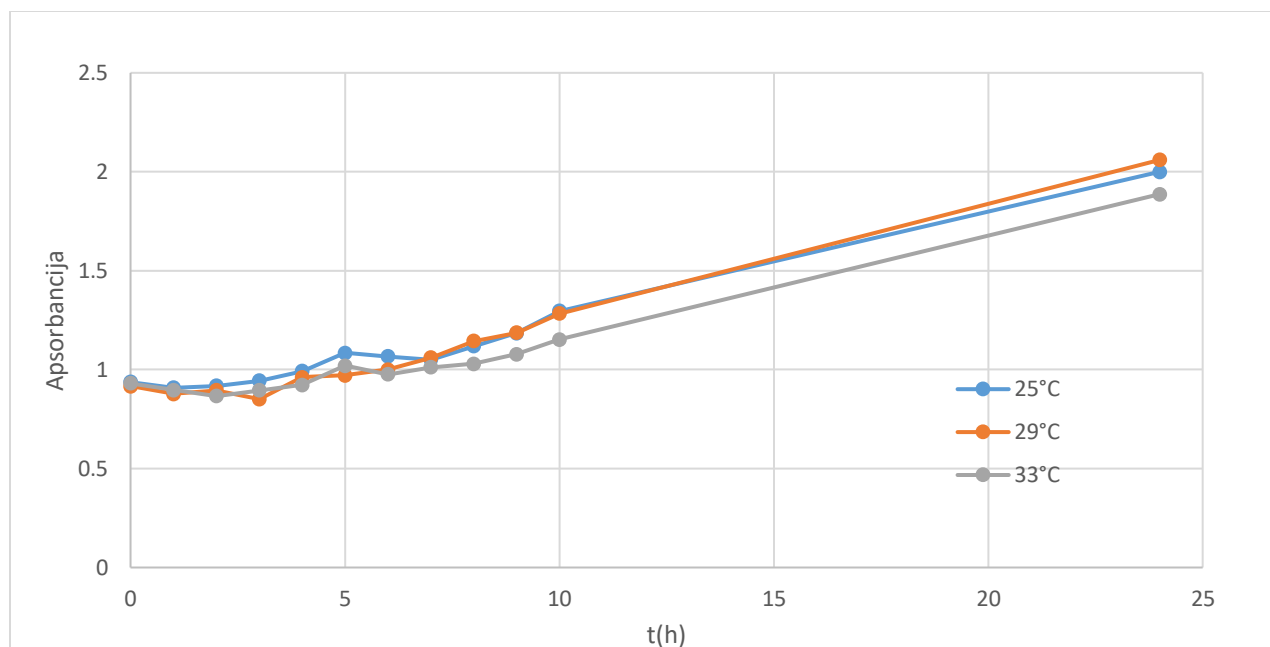
Uzorak	60 mL	90 mL	120 mL	90 mL- anaerobno
Koncentracija biomase (g L ⁻¹)	4,29	4,76	3,87	2,14

Kako bi se utvrdio utjecaj intenziteta aeracije na rast biomase divljeg soja kvasca *P. stipitis*, proveden je uzgoj kvasca u različitim volumenima tikvica, sa sastavom podloge pod oznakom a (tablica 4) u kojima je udio YPD podloge iznosio 10% (v/v). Također, proveden je anaeroban uzgoj kvasca u termostatu usporedno sa semiaerobnim uzgojem u tresilici. Praćenjem utjecaja volumena podloge, tj. intenziteta aeracije na rast biomase kvasca uočeno je da smanjenjem

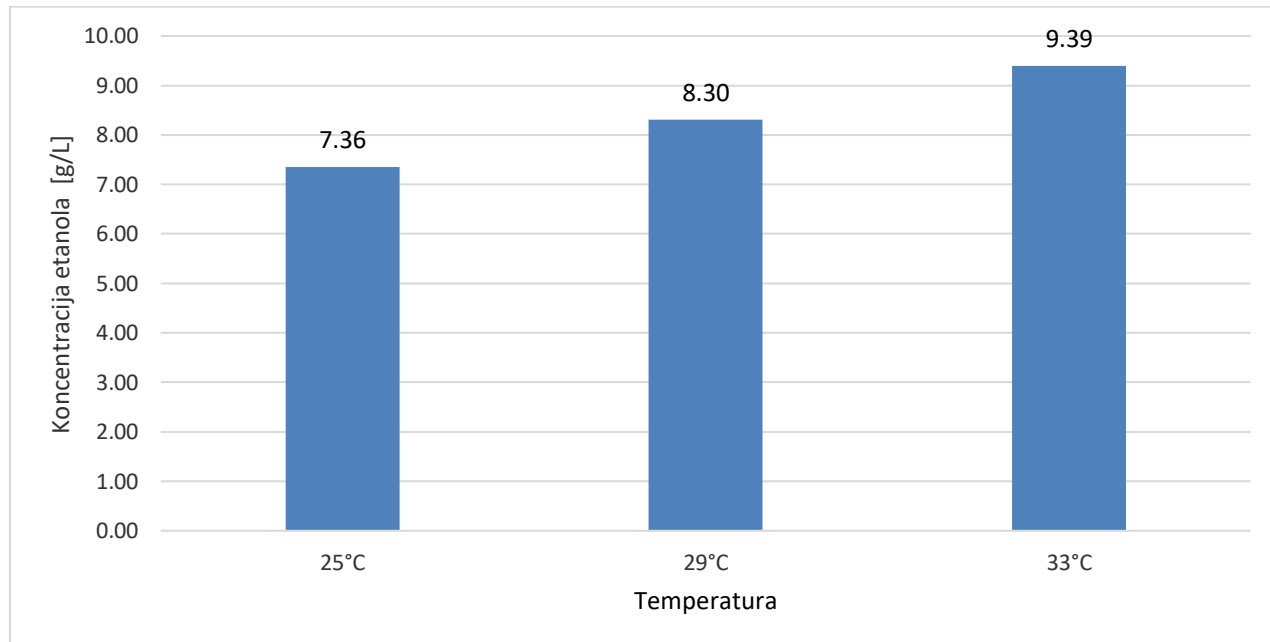
volumena, tj. povećanjem aeracije dolazi do porasta koncentracije biomase (tablica 8). Smanjenjem volumena sa 120 mL na 90 mL vidljiv je porast koncentracije biomase (tablica 8), dok daljnjim smanjenjem volumena, tj. povećanjem aeracije koncentracija biomase ne raste, već se postepeno smanjuje. U uvjetima smanjenja intenziteta aeracije potrošnja supstrata i proizvodnja produkata je otežana (Dominguez i sur., 2000). Najveća koncentracija proizvedenog etanola (slika 11) uočena je kod anaerobnog uzgoja te semiaerobnog uzgoja u volumenu od 90 mL, te je u tim uvjetima zabilježena i najveća potrošnja glukoze (slika 12). Nedovoljan intenzitet aeracije usporava potrošnju supstrata, dok preveliki intenzitet aeracije smanjuje prinos etanola zbog prelaska metabolizma kvasca na stanični rast ili oksidaciju produkata (Telli-Okur i Eken-Saraçoğlu, 2008).

4.2.4. Utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t

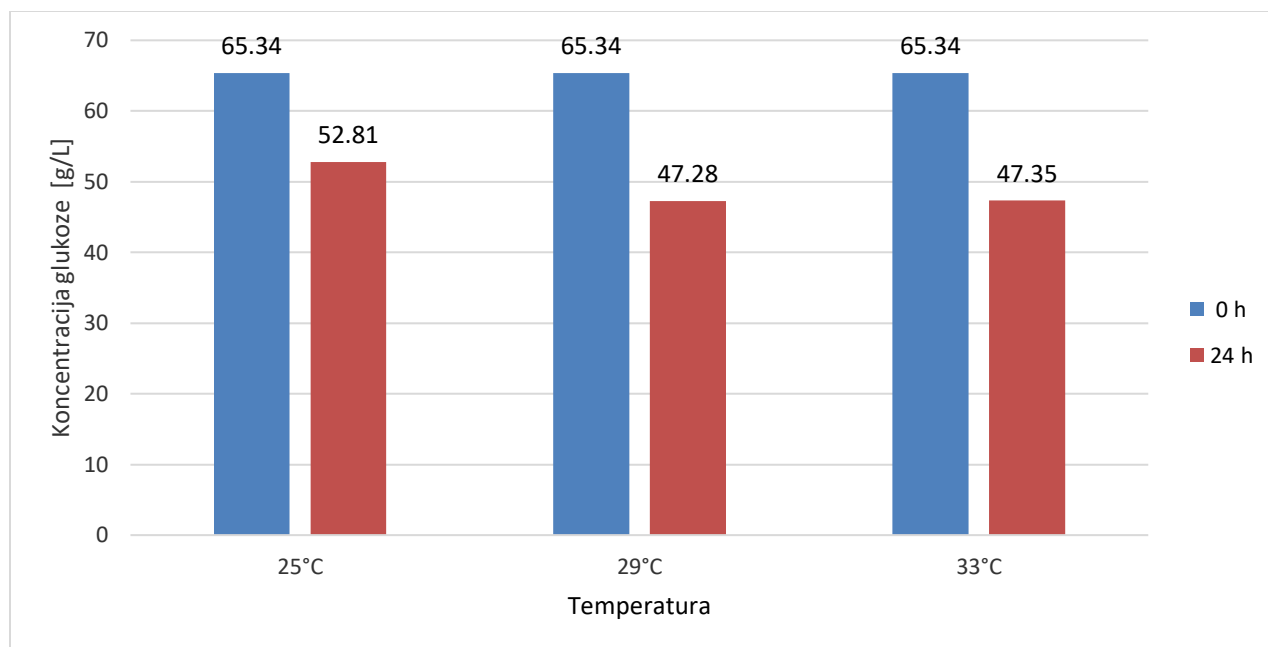
Kako bi se utvrdio utjecaj temperature na porast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, kvasac je uzgajan na laboratorijskoj tresilici pri 100 o_{min}⁻¹, u volumenu od 100 mL tijekom 24 sata, pri vrijednosti pH 4,4 i sastavu podloge pod oznakom a (tablica 4). Utjecaj temperature praćen je uzgojem pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33°C). Porast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti i potrošnja glukoze HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 13-15 i u tablici 9.



Slika 13. Utjecaj različitih vrijednosti temperatura (25 °C, 29 °C i 33 °C) na prirast divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t, uzgojem na laboratorijskoj tresilici (100 o_{min}⁻¹/ pH 4,4/ 24h)sastavu podloge pod oznakom a (tablica 4), praćen spektrofotometrijski



Slika 14. Koncentracija proizvedenog etanola, na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t; na laboratorijskoj tresilici (100 o_{min}⁻¹/ pH 4,4/ 24 h), sastavu podloge pod oznakom „a“ (tablica 4) pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33 °C)



Slika 15. Promjena koncentracije glukoze nakon uzgoja divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t, na laboratorijskoj tresilici (100 o min⁻¹/ pH 4,4/ 24 h) i sastavu podloge pod oznakom a (tablica 4) pri različitim vrijednostima temperature (25, 29 i 33 °C)

Tablica 9. Koncentracija biomase, određena gravimetrijski, nakon provedenog uzgoja divljeg soja kvasca *P.stipitis* JCM 10742^t, pri različitim temperaturama (25°C, 29°C, 33°C)

Uzorak	25°C	29°C	33°C
Koncentracija biomase (gL ⁻¹)	4.76	4.46	3.95

Kako bi se ustanovilo koja je optimalna temperatura za uzgoj divljeg soja kvasca *P. stipitis*, praćen je porast biomase kvasca pri različitim vrijednostima temperature (25, 29 i 33°C). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je najveći prirast biomase, praćen spektrofotometrijski, zabilježen pri temperaturi 29 °C (slika 13). Gravimetrijskim praćenjem biomase najveći prirast zabilježen je pri temperaturi od 25 °C (tablica 9). Kod temperature od 33°C zabilježena je najmanja koncentracija porasle biomase, praćena gravimetrijski i spektrofotometrijski (tablica 9, slika 13). Najveća zabilježena koncentracija proizvedenog

etanola od 9,39 g L⁻¹, zabilježena je kod temperature od 33°C (slika 13). Kod niskih temperatura pad proizvodnje etanola moguć je zbog inaktivacije staničnih aktivnosti, a kod viših temperatura dolazi do razaranja enzimskih reakcija u stanici. Optimalna temperatura za dobivanje maksimalnog prinosa etanola, uzgojem kvasca *P. stiptis* NCM3499, iznosi 30°C, koristeći ksilozu kao izvor ugljika (Chandel i sur., 2009).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Korištenjem 0,01 M acetatnog pufera u kombinaciji s komercijalnim enzimima (Viscozyme L i Cellulase enzyme blend) u hidrolizi čvrstog dijela blagokiselog hidrolizata bukve postiže se najveća koncentracija glukoze te najmanja koncentraciju inhibitora u nastalom enzimskom hidrolizatu.
2. Optimalni uvjeti za rast biomase divljeg soja kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t na hidrolizatu bukve su: aeroban uzgoj na tresilici sa hranjivom podlogom koja sadrži 90 % (v/v) enzimskog hidrolizata bukve te 10 % (v/v) YPD podloge, pri pH vrijednosti 5,1 te temperaturi do 30°C.
3. Enzimski hidrolizat bukve u kombinaciji sa divljim sojem kvasca *P. stipitis*JCM 10742^t nije pogodan medij za proizvodnju različitih biokemikalija, budući da je od nastalih produkata zabilježena samo značajnija koncentracija etanola.
4. Najveća koncentracija etanola, 14,50 g L⁻¹ zabilježena je u uvjetima sastava hranjive podloge sa 90 % (v/v) enzimskog hidrolizata te 10 % (v/v) YPD podloge, pH vrijednosti 5,1, temperaturi 33°C, uzgojem u laboratorijskoj tresilici pa se može zaključiti da su to optimalni uvjeti za uzgoj divljeg soja kvasca *P. stipitis* JCM 10742^t na enzimskom hidrolizatu predobrađenog drveta bukve.

6. LITERATURA

1. Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G. (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters* **30** (9), 1515-1524.
2. Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K. S. (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry* **41** (11), 2333-2336.
3. Alonso Bocchini Martins, D., Ferreira Alves do Prado, H., Simões Ribeiro Leite, R., Ferreira, H., de Souza Moretti, M. M., daSilva, R., Gomes, E. (2011) Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. U: Integrated waste management - Volume II, Mr. Sunil Kumar (ur.), InTech, pp. 319-360.
4. Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **30**, 1 -11.
5. Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* **52**, 858 – 875.
6. Balat, M., Balat, H., Öz, C. (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* **34**, 551 – 573.
7. Belloch, C., Querol, A., Barrio, E. (2011) Yeasts and Molds – *Kluyveromyces* spp. U: Encyclopedia of Dairy Sciences, Fuquay, J. W. (ur.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 754 -764.
8. Burlacu, A., Cornea, C. P., Israel-Roming, F. (2016) Microbial xylanase: A review. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies* **20**, 335 – 342.
9. Bušić, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology & Biotechnology* **56**(3), 289 – 311.
10. Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., Sultan, M. T. (2008) Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Technology and Biotechnology* **46** (1), 22 – 31.

11. Buzala, K. P., Kalinowska, H., Malachowska, E., Boruszewski, P., Krajewski, K., Prybysz, P. (2019) The Effect of Lignin Content in Birch and Beech Kraft Cellulosic Pulp on Simple Sugar Yields from the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Energies* **12** (15), 1 – 11.
12. Chandel, A. K., Narasu, M. L., Rudravaram, R., Pogaku, R., Rao, L. V. (2009) Bioconversion of De-Oiled Rice Bran (DORB) Hemicellulosic Hydrolysate into Ethanol by *Pichia stipitis* NCM3499 under Optimized Conditions. *International Journal of Food Engineering* **5** (1), 1 – 15.
13. Chen, H. (2014) *Biotechnology of Lignocellulose : Theory and Practice*. Chemical Industry Press, Beijing and Springer, Dordrecht.
14. Cho, D. H., Shin, S. J., Bae, Y., Park, C., Kim, Y. H. (2011) Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichiastipitis*. *Bioresource Technology* **102**, 4439 – 4443.
15. Demiray, E., Karatay, S. E., Dönmez, G. (2019) Efficient bioethanol production from pomegranate peels by newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* **42** (6), 709 – 719.
16. Dominguez, J. M., Cao, N., Gong, C. S., Tsao, G. T. (2000) Ethanol production from xylose with the yeast *Pichia stipitis* and simultaneous product recovery by gas stripping using a gas-lift loop fermentor with attached side arm (GLSA). *Biotechnology and Bioengineering* **67** (3), 336 – 343.
17. Dufour, N., Swana J., Rao, R.P. (2011) Fermentation organisms for 5- and 6-carbon sugars. U: Plant Biomass Conversion, Hood, E.E., Nelson, P., Powell, R., (ur.), John Wiley & Sons Inc., Chichester, str. 157-197.
18. du Preez, J. C., Bosch, M., Prior, B. A. (1986) Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipites*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 1 – 5.
19. Fan, Z. (2014) Ethanol production. U: Biorefineries, Qureshi, N., Hodge, D. B., Vertès, A. A. (ur.), Elsevier B. V., Amsterdam, Nizozemska, str. 141 – 160.
20. Fičko, V. (2019) Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka I proizvodnja etanola pomoću plijesni *Mucor indicus*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

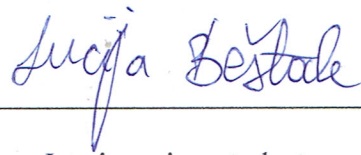
21. Fromanger, R., Guillouet, S. E., Uribe Larrea, J. L., Molina-Jouve, C., Cameleyre, X. (2010) Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37** (5), 437 – 445.
22. Gabiatti Junior, C., Dal Magro, L., Graebin, N. G., Rodrigues, E., Rodrigues, R. C., Prentice, C. (2020) Combination of Celluclast and Viscozyme improves enzymatic hydrolysis of residual cellulose casings: process optimization and scale-up. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **37**, 463 – 473.
23. Gibbons, W., Hughes, S. (2011) Integrated biorefineries with engineered microbes and highvalue co-products for profitable biofuels production. U: Biofuels, Tomes, D., Lakshmanan, P., Songstad, D., (ur.), Springer, New York, str. 265-283.
24. Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., Matsushika, A. (2013) Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass by a Novel *Kluyveromyces marxianus* Strain. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **77** (7), 1505 – 1510.
25. Gray, K. A., Zhao, L., Emptage, M. (2006) Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* **10** (2), 141 – 146.
26. Grootjen, D. R. J., Van der Lans, R. G. J. M., Luyben, K. C. A. (1990) Effects of the aeration rate on the fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis* CBS 5773. *Enzyme and Microbial Technology* **12** (1), 20-23.
27. Ilić, M. (2019) Predobrada čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
28. Iskigor, F. H., Becer, C. R. (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* **6**, 4497 – 4559.
29. Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u Industriji* **65** (1-2), 25 – 38.
30. Ivančić Šantek, M., Zvonar, I., Beluhan, S., Šantek, B. (2018) Proizvodnja bioetanola iz kukuruznih oklasaka. *Kemija u Industriji* **67** (7-8), 297 – 308.
31. Ivetić, D., Antov, M. (2014) Bioetanol iz lignoceluloznih sirovina: obnovljivi izvori i enzimsko tehnologija za održivu proizvodnju energije. *Zaštita materijala* **55**, 54 – 58.
32. Janušić, V., Ćurić, D., Krička, T., Voća, N., Matin, A. (2008). Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda*, **14** (1), 53-58.

33. Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y. S., Passoth, V., Richardson, P. M. (2007) Genome sequence of the lignocelluloses-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology* **25** (3), 319 – 326.
34. Leonel, L. V., Arruda, P. V., Chandel, A. K., Felipe, M. G. A., Sene, L. (2021) *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology* , doi: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1917505>
35. Maciel, G. M., de Souza Vandenberghe, L. P., Windson, C., Haminiuk, I., Fendrich, R. C., Bianca, B. E. D., da Silva Brandalize, T. Q., Pandey, A., Soccol, C. R. (2008) Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs. *Food Technology and Biotechnology* **46** (2), 183 – 189.
36. Marđetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **32**(4), 483 – 499.
37. Meyrial, V., Delgenes, J. P., Romieu, C., Moletta, R., Gounot, A. M. (1995) Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. *Enzyme and Microbial Technology* **17** (6), 535-540.
38. Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., Rodrigues, K. F. (2017) Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* **10**, 52 – 61.
39. Nigam, J. N. (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* **87**, 17 – 27.
40. Passoth, V., Zimmermann, M., Klinner, U. (1996) Peculiarities of the regulation of fermentation and respiration in the Crabtree-negative, xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57/58**, 201-212.
41. Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer, D., Mrvčić, J., Šantek, B. (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glasnik zaštite bilja* **40** (5), 24 – 33.

42. Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer, D., Mrvčić, J., Hanousek Čiča, K., Šantek, B. (2018) Potencijal bakterija za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. *Glasnik zaštite bilja***41** (4), 74 – 82.
43. Predojević, Z. J. (2010) Postupci pripreme lignocelulozne sirovine za dobijanje bioetanola, Stručni rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
44. Semenčenko, V. V., Mojović, L.J. V., Petrović, S. D., Očić, O. J. (2011) Novi trendovi u proizvodnji bioetanola. *Hemijska Industrija* **65** (2), 103 – 114.
45. Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., Teixeira, J. A. (2012) Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy* **37**, 259 – 265.
46. Skoog, K., Hahn-Hägerdal, B. (1990) Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology***56** (11), 3389-3394
47. Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **83** (1), 1 – 11.
48. Rezić, T., Ivančić Šantek, M., Andlar, M., Pavlečić, M., Šantek, B. (2016) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11** (1-2), 6 – 17.
49. Telli-Okur, M., Eken-Saraçoğlu, N. (2008) Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* **99** (7), 2162 – 2169.
50. U. S. Forest Service (2014)
<https://www.fs.fed.us/research/patents/biotechnology/ethanol_production.php>.
Pristupljeno 24. lipnja 2021.
51. Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., Calabrň, V. (2012) Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. U: Bioethanol, (Pinheiro Lima, M. A., ured.), In Tech, Rijeka, str. 95-122.
52. Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S. (2014) Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2** (1), 573–584.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink, reading "Lucija Brestak", written over a horizontal line.

Ime i prezime studenta