

# Određivanje fermentativne sposobnosti nekih ne-Saccharomyces kvasaca

---

**Vukoje, Kristina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*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:159:906441>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Kristina Vukoje**

**7396/BT**

**Određivanje fermentativne sposobnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca**

**ZAVRŠNI RAD**

**Znanstveno-istraživački projekt:** *"Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina"* (HRZZ-9717)

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

**Zagreb, 2019.**

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta „*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*“ (HRZZ-9717) pod mentorstvom doc. dr. sc. Antonije Trontel i uz pomoć Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

*Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Antoniji Trontel na uloženom trudu i vremenu tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i pomoći pri pisanju ovog rada.*

*Zahvaljujem Nenadu Marđetku, mag.ing. i tehničaru Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Igoru Livadi, na stručnoj pomoći.*

*Također, zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama na ukazanom strpljenju i podršci tijekom dosadašnjeg školovanja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## Određivanje fermentativne sposobnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca

Kristina Vukoje, 0058201504

### Sažetak:

U novije vrijeme istražuje se primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca u različitim biotehnološkim procesima kao što su proizvodnja poliola, enzima i dr. kemikalija. U ovom radu određivana je fermentacijska sposobnost dva ne-*Saccharomyces* kvasca, *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106 i *Schwaniomyces polymorphus* ZIM 2980 u podlozi s različitim koncentracijama glukoze (10 – 100 g L<sup>-1</sup>). Dobiveni prinosi i koeficijenti konverzije supstrata u etanol za ne-*Saccharomyces* kvasce uspoređeni su s odgovarajućim vrijednostima za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148. Određen je i utjecaj različitih koncentracija mliječne kiseline (1 – 80 g L<sup>-1</sup>) na fermentacijsku sposobnost navedenih kvasaca.

**Ključne riječi:** fermentativna sposobnost, *Schwaniomyces polymorphus* ZIM 2980, *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148, utjecaj mliječne kiseline na fermentacijsku sposobnost kvasaca

**Rad sadrži:** 29 stranica, 7 slika, 8 tablice, 22 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Datum obrane:** rujan 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

**Određivanje fermentativne sposobnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca**

**Kristina Vukoje, 0058201504**

**Abstract:**

Recently, the application of non-*Saccharomyces* yeasts has been investigated in various biotechnological processes, like poliol and enzyme production, etc. Therefore, in this study goal was to determine fermentation ability of two non-*Saccharomyces* yeasts, *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106 and *Schwanniomyces polymorphus* ZIM 2980 in medium with different concentrations of glucose (10 – 100 g L<sup>-1</sup>). Obtained yields and substrate to ethanol conversion coefficients were compared to data obtained for yeast *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148. Impact of various concentrations of lactic acid (1 – 80 g L<sup>-1</sup>) on fermentation ability of tested yeast was also determined.

**Keywords:** fermentation ability, *Schwanniomyces polymorphus* ZIM 2980, *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148, impact of lactic acid on fermentative ability of yeasts

**Thesis contains:** 29 pages, 7 figures, 8 tables, 22 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

**Defence date:** September 2019

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Kvasci</b> .....	2
<b>2.1.1. Ne-<i>Saccharomyces</i> kvasci</b> .....	2
<b>2.1.2. Fermentativna sposobnost ne-<i>Saccharomyces</i> kvasaca</b> .....	4
<b>2.2. Utjecaj inhibitora na rast i aktivnost kvasaca</b> .....	5
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	6
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	6
3.1.1. Mikroorganizam .....	6
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge .....	6
3.1.2.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskih kultura .....	6
3.1.3. Aparatura i pribor .....	7
3.1.3.1. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	7
3.1.3.2. Ostala oprema .....	7
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	8
3.2.1. Priprava hranjivih podloga .....	8
3.2.2. Određivanje fermentativne sposobnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca <i>P. kudriavzevii</i> ZIM 3106 i <i>S. polymorphus</i> ZIM 2980 i kvasca <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148 u YPD podlogama .....	10
3.2.3. Uzgoj ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca <i>P. kudriavzevii</i> ZIM 3106 i <i>S. polymorphus</i> ZIM 2980 i kvasca <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148 u YPD podlogama s visokom početnom koncentracijom glukoze .....	10
3.2.4. Određivanje utjecaja različite koncentracije mliječne kiseline na fermentativnu aktivnost ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca <i>P. kudriavzevii</i> ZIM 3106 i <i>S. polymorphus</i> ZIM 2980 i kvasca <i>S. cerevisiae</i> ZIM 3148 u standardnoj YPD podlozi .....	10
3.2.5. Analitičke metode .....	11
3.2.6. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge .....	11
3.2.7. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase gravimetrijskom metodom .....	11
3.2.8. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) .....	12
3.2.9. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom .....	12
3.2.10. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	12
3.2.11. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline .....	13
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	15
<b>4.1. Određivanje fermentativne sposobnosti kvasaca</b> .....	16
<b>4.2. Anaerobni uzgoj kvasaca u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze (<math>\gamma_{glc} \approx 90 \text{ g L}^{-1}</math>)</b> .....	20

<b>4.3. Određivanje utjecaja mliječne kiseline na fermentativnu sposobnost nekih kvasaca</b> .....	24
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	26
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	27



## 1. UVOD

U industrijskom mjerilu za proizvodnju etanola koristi se kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Oshoma i sur., 2015). Bioetanol se u industrijskom mjerilu proizvodi iz škrobnih (npr. kukuruz, pšenica) i šećernih sirovina (šećerna repa, šećerna trska). Korištenje lignoceluloznih obnovljivih sirovina kao što su nusproizvodi poljoprivredne (izluženi rezanci šećerne repe, pšenična slama i kukuruzovina; Koller i sur., 2013) i šumarske industrije, otpadni papir i dr. (Bušić, 2018) za proizvodnju bioetanola i drugih kemikalija ima veliki potencijal.

Glavni nedostatak kvasca *S. cerevisiae* za proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina je nemogućnost korištenja ksiloze i arabinoze (Narayanan i sur., 2016). Stoga je potrebno provesti istraživanja s drugim „nekonvencionalnim“ vrstama kvasaca koji, za sada, nemaju značajnu industrijsku primjenu (e.g. *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*). Prednost ovih vrsta kvasaca je korištenje većine ugljikohidrata prisutnih u lignoceluloznim sirovinama (Johnson, 2013a). Osim proizvodnje etanola, ne-*Saccharomyces* kvasci mogu proizvoditi različite sekundarne metabolite. Poznata je primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina jer se ovi kvasci prirodno nalaze na pokožici grožđa kao što su *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Metschnikowia*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus*. Specifični spojevi koje mogu proizvesti ne-*Saccharomyces* kvasci uključuju acetaldehid, octenu kiselinu, estere, glicerol, više alkohole, terpenoide i druge nusprodukte (du Plessis i sur., 2017).

U ovom radu određivana je fermentacijska sposobnost ne-*Saccharomyces* kvasaca *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106 i *Schwanniomyces polymorphus* ZIM 2980 u podlozi s glukozom. Određeni bioproceni parametri za ne-*Saccharomyces* kvasce uspoređeni su s odgovarajućim vrijednostima za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148. Određen je i utjecaj različitih koncentracija mliječne kiseline na fermentacijsku sposobnost navedenih kvasaca kako bi se pronašao kvasac koji može tolerirati relativno visoke koncentracije mliječne kiseline i biti potencijalan kandidat za ugradnju gena za proizvodnju L-laktata u bioprocusu vođenom bez regulacije pH vrijednosti podloge.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kvasci

Kvasci su organizmi koji pripadaju carstvu gljiva, a mogu se klasificirati ili u askomicete (*Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomices*, *Ogataea*, *Scheffersomyces*, *Yarrowia*, itd.) ili u bazidiomicete (*Filobasidiella*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium*, *Trichosporon*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Phaffia rhodozyma*), a razmnožavaju se pupanjem (Türker, 2015; Johnson, 2013). Kvasci mogu tolerirati širok raspon pH vrijednosti, a rastu i u relativno niskom pH području gdje većina bakterija ne može rasti. Obzirom na optimalnu temperaturu rasta, mikroorganizmi se mogu podijeliti u tri veće skupine: (1) termofilni mikroorganizmi su oni kojima je  $T_{max}$  mnogo iznad 50°C; (2) oni koji rastu na temperaturama između 25 i 50°C nazivaju se mezofilni; (3) psihofilni su oni koji rastu na temperaturama ispod 25°C. Prema tome, kvasci pripadaju uglavnom skupini mezofilnih mikroorganizama (Türker, 2015).

Tradicionalna industrijska primjena kvasca *S. cerevisiae* uključuje proizvodnju piva, jabukovača, vina, destiliranih alkoholnih pića, pekarskih proizvoda, fermentiranih mliječnih i mesnih proizvoda kao i druge fermentirane hrane. Ostali industrijski procesi u kojima se koristi kvasac *S. cerevisiae* je proizvodnja bioetanola, proteina, industrijskih enzima, krmiva i drugih biokemikalija (Johnson, 2013).

U novije vrijeme ne-*Saccharomyces* kvasci (nekonvencionalni kvasci) koriste se kao radni mikroorganizmi za različite biotehnološke procese. Ovi kvasci služe kao domaćini za ekspresiju različitih proteina, provođenje različitih biotransformacija, sintezu kemikalija i spojeva koji imaju medicinsku primjenu te se mogu koristiti kao dodatak prehrani. Uz navedeno, ne-*Saccharomyces* kvasci imaju važnu ulogu u bioremedijaciji tla te služe kao indikatori kvalitete okoliša (Johnson, 2013a).

#### 2.1.1. Ne-*Saccharomyces* kvasci

Ne-*Saccharomyces* kvasci koji pripadaju klasi askomiceta koriste se u proizvodnji hrane i etanola, proizvodnja proteina, hrane za životinje i stočne hrane, heterolognu proizvodnju proteina i enzima, te kao i modelni organizmi u genetičkim istraživanjima. Nasuprot tome, kvasci koji pripadaju klasi bazidomiceta imaju ograničenu upotrebu u

biotehnološkim procesima te se koriste uglavnom za proizvodnju enzima, određenih primarnih i sekundarnih metabolita (terpenoidi, karotenoidi) te bioremedijaciju okoliša (Johnson, 2013b; Tablica 1.).

**Tablica 1.** Neki primjene ne-*Sacharomyces* kvasaca u industrijskoj proizvodnji (Johnson, 2013a, Johnson, 2013b).

klasa	kvasac	Proizvod	Primjena
basidomicete	<i>Pseudozyma antarctica</i>	lipaze	industrija proizvodnje komponenti arome
	<i>Cryptococcus spp.</i>	ksilanaza	biološka razgradnja
	<i>Marziella spp.</i>	galakturonaza	biološka razgradnja, prehrambena industrija
	<i>Trichosporon asahii</i>	beta-glukozidaza	industrija proizvodnje komponenti arome
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	laktamaza/racemaza	farmaceutska industrija
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	astaksantin	farmaceutska industrija
	<i>Moniella spp.</i>	eritritol	zaslađivač
askomicete	<i>Ogataea polymorpha</i>	fitaza	prehrambena industrija
	<i>Candida boidinii</i>	fenilalanin dehidrogenaza	farmaceutska industrija
	<i>Geotrichum candidum</i>	lipaza	obrada otpadnih voda
	<i>Candida lipolytica</i>	lipaza	proizvodnja detergenata
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	L-glutaminaza	terapijka, analitika

### 2.1.2. Fermentativna sposobnost ne-*Saccharomyces* kvasaca

Kako bi proizvodnja etanola ili drugih kemikalija iz lignoceluloze bila ekonomski isplativa potrebno je pronaći robustan radni mikroorganizam koji može koristiti sve ugljikohidrate prisutne u lignoceluloznim sirovinama uz zadovoljavajući prinos i produktivnost procesa (Hou i Yao, 2012).

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najčešće je korišten mikroorganizam u postojećem procesu proizvodnje bioetanola, ali fermentira samo heksoze, ostavljajući velike količine pentoza, ksiloze i arabinoze nefermentirane. Većina kvasaca koji fermentiraju ksilozu, npr. kvasci iz roda *Pichia* ili *Candida* zahtijevaju pažljivu kontrolu određenih parametara bioprocasa (npr.  $pO_2$ ) kako bi preveli ksilozu u etanol, što dodatno poskupljuje proces i povećava složenost vođenja procesa (Hou i Yao, 2012a). Iako je najviše istražena primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina, sve više se istražuje primjena ovih kvasaca za proizvodnju etanola ili drugih biokemikalija (Hou i Yao, 2012; Jessica Lleixà, Maria Manzano, Albert Mas and Mariadel C. Portillo, 2016). U Tablici 2. prikazani su neki ne-*Saccharomyces* kvasci koji proizvode etanol i postignuti prinosi i koeficijenti konverzije određenih ugljikohidrata u etanol.

**Tablica 2.** Neki ne-*Saccharomyces* kvasci koji proizvode etanol.

izvor ugljika	kvasac	etanol	$Y_{EtOH/izvorC}$	referenca
		(g L <sup>-1</sup> )	(g g <sup>-1</sup> )	
fruktoza	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DU3	16,6	0,230	Segura-Garcia i sur., 2015
sok agave	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DU3	30,21	0,297	Segura-Garcia i sur., 2015
fruktoza	<i>Pichia kluyveri</i> GRO3	33,4	0,392	Segura-Garcia i sur., 2015
sok agave	<i>Pichia kluyveri</i> GRO3	30,0	0,308	Segura-Garcia i sur., 2015
hidrolizat drva javora	<i>Spathaspora passalidarum</i> NN245	39,0	0,370	Long et al., 2012

## 2.2. Utjecaj inhibitora na rast i aktivnost kvasaca

Tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina dolazi do stvaranja različitih inhibitora prisutnih u hidrolizatu koji mogu inhibirati rast radnog mikroorganizma kao i smanjiti prinos etanola i produktivnost procesa proizvodnje etanola. Ovi inhibitori svrstani su u tri skupine: furani (furfural i hidroksimetilfurfural), slabe kiseline (mravlja kiselina, levulinska kiselina, octena kiselina) i fenolni spojevi (vanilin, koniferil aldehid, 4-hidroksibenzojeva kiselina). Sastav i udio navedenih inhibitora u hidrolizatu lignoceluloznih sirovina ovisi o uvjetima predobrade i vrsti, starosti i vremenu berbe lignocelulozne sirovine (Narayanan i sur., 2016; Hou i Yao, 2012b). Kiseline koje se mogu pronaći u lignoceluloznim sirovinama (npr. otpadna trava), kao posljedica rasta bakterija mliječne kiseline, mogu biti octena i mliječna kiselina (Narendranath i sur., 2001).

Inhibitorni učinak slabih organskih kiselina na rast kvasca ovisi o pH vrijednosti podloge, konstanti disocijacije kiselina i koncentraciji kiselina (Narayanan i sur., 2016; Narendranath i sur., 2001a). Odnos nedisociranog i disociranog oblika slabe kiseline u otopini opisan je Henderson-Hasselbachovom jednadžbom (Casey i sur., 2010). Organske kiseline imaju jači inhibitorni učinak na mikroorganizme pri nižim pH vrijednostima pa se pretpostavlja da je inhibitorni učinak ovih kiselina rezultat nedisociranog oblika molekula ovih kiselina. Transport nedisociranog oblika ovih kiselina u stanicu odvija se pasivnom difuzijom dok se ne uspostavi ravnotežno stanje. Zbog više pH vrijednosti citoplazme dolazi do disocijacije molekula, a oslobođeni protoni se ili ispumpavanju iz stanice u zamjenu za katione ili se neutraliziraju „puferirajućim kapacitetom“ citoplazme. Smatra se da do inhibicije rasta mikroroganizama dolazi zbog sinergističkog učinka nekoliko faktora: slabe kiseline narušavaju strukturu membrane; inhibiraju osnovne metaboličke puteve kao posljedica snižene pH vrijednosti citoplazme zbog disocijacije kiseline ili izravne inhibicije određenih enzima, kao i nakupljanje toksičnih aniona. U kvascima je predloženo da slabe kiseline mogu uzrokovati indukciju energetski skupog odgovora na stres koji pokušava obnoviti homeostazu i rezultirati smanjenjem energije koja je dostupna za rast i druge metaboličke funkcije (Narendranath i sur., 2001b).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu, kao radni mikroorganizami, korišteni su kvasci iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Ljubljana Biotehniška fakulteta (Ljubljana, Slovenija):

1. *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148
2. *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106
3. *Schawaniomyces polymorphus* ZIM 2980.

##### 3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

**Tablica 3.** Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
D-(+)-glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
butan-1-ol	p.a.	Fisher Scientific, SAD
mliječna kiselina	85%	Sigma-Aldrich, Njemačka
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
apsolutni etanol	p.a.	Carlo Erba Reagents, Italija
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosfatna kiselina	p.a.	Fluka, Njemačka

##### 3.1.2.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskih kultura

Kulture kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418, *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106 i *Schawaniomyces polymorphus* ZIM 2980 čuvana su i održavane na čvrstoj YPD podlozi.

Tekuća YPD podloga korištena za pripremu inokuluma za uzgoj kvasaca. Sastav čvrste i tekuće YPD podloge prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Sastav čvrste i tekuće YPD podloge.

	tekuća YPD podloga	čvrsta YPD podloga
glukoza (g L <sup>-1</sup> )	20	20
kvašćev ekstrakt (g L <sup>-1</sup> )	20	20
pepton (g L <sup>-1</sup> )	10	10
agar (g L <sup>-1</sup> )	-	20

Početne pH vrijednosti priređenih YPD podloga bila su  $6,2 \pm 0,1$  jedinica.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

(eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10A<sup>VP</sup> (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10A<sup>VP</sup>), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 A<sup>VP</sup>), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A<sup>VP</sup>), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19A<sup>VP</sup>) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

#### 3.1.3.2. Ostala oprema

- analitička vaga Mettler Toledo (Columbus, Ohio, SAD);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumetarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);

- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- 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) ]
- ultrazvučna kupelj USC300T (VWR International, Leuven, Belgija)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- centrifuga Centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Priprava hranjivih podloga**

Kvasci korišteni u ovom radu uzgajani su u standardnoj tekućoj YPD podlozi (YPD<sub>20</sub>, Tablica 4) koja se sastoji od kvašćevog ekstrakta ( $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$ ), peptona ( $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$ ) i glukoze ( $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$ ). Osim u standardnoj YPD podlozi uzgoji ovih kvasaca provedeni su i u YPD podlogama u kojima je koncentracija glukoze iznosila od 10 do 100  $\text{g L}^{-1}$  (Tablica 5.). Svi sastojci podloge su odvagani i otopljeni u demineraliziranoj vodi nakon čega su sterilizirani u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta.

Za ispitivanje fermentativne sposobnosti kvasaca u prisutnosti različitih koncentracija mliječne kiseline, u standardnu YPD podlogu (YPD<sub>20</sub>) dodana je mliječna kiselina u koncentracijama prikazanim u Tablici 5.

Za održavanje kultura kvasaca korištenih u ovom radu priređene su YPD agar podloge ( $w_{\text{agar}} = 2 \%$ ), a za pripremu inokuluma za provođenje fermentacija korištena je standardna YPD podloga (YPD<sub>20</sub>).



**Tablica 5.** Podloge i uvjeti pri kojima je provedeni uzgoji kvasaca.

<b>podloga</b>	<b>V (mL)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>γ<sub>MK</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>γ<sub>glc<sub>0</sub></sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 3418	<i>P. kudriavzevii</i> ZIM 3106	<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980
YPD <sub>10</sub>	10	28	-	10	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	-	20	+	+	+
YPD <sub>50</sub>	10	28	-	50	+	+	+
YPD <sub>70</sub>	10	28	-	70	+	+	+
YPD <sub>100</sub>	10	28	-	100	+	+	+
YPD <sub>100</sub>	400	28	-	100	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	0,8	20	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	4	20	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	8	20	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	16	20	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	40	20	+	+	+
YPD <sub>20</sub>	10	28	80	20	+	+	+

### **3.2.2. Određivanje fermentativne sposobnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 i *S. polymorphus* ZIM 2980 i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlogama**

Kulture kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 porasle na Petrijevim pločama s čvrstom YPD podlogom korištene su za pripremu inokuluma za provedene bioprocese. Mikrobiološkom ušicom kultura kvasaca je precijepljena u tekuću YPD podlogu u staklenoj epruveti ( $V_k = 10$  mL). Ove kulture kvasaca su inkubirane kroz 18 sati pri temperaturi od 28 °C. Ovako porasle kulture korištene su kao inokulum za provođenje uzgoja u svim YPD podlogama (Tablica 5.). Sterilne YPD podloge naciepljivane su u aseptičnim uvjetima s po 5% vol/vol inokuluma (0,5 mL).

Uzgoji su provedeni pri 28 °C statično bez podešavanja pH vrijednosti u mikroaerofilnim uvjetima.

### **3.2.3. Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 i *S. polymorphus* ZIM 2980 i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlogama s visokom početnom koncentracijom glukoze**

Priprava inokuluma za uzgoje kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 provedena je kako je to opisano u poglavlju 3.2.2.

Sterilne YPD<sub>100</sub> podloge (300 mL;  $\gamma_{\text{glukoza}} = 100$  g L<sup>-1</sup>) naciepljene su u aseptičnim uvjetima s po 5% vol/vol inokuluma i zatvorene s vreljnačom. Uzgoj je proveden uz miješanje ( $n = 150$  min<sup>-1</sup>) pri 28°C bez regulacije pH vrijednosti.

### **3.2.4. Određivanje utjecaja različite koncentracije mliječne kiseline na fermentativnu aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 i *S. polymorphus* ZIM 2980 i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u standardnoj YPD podlozi**

Za određivanje utjecaja mliječne kiseline na fermentativnu sposobnost kvasaca, provedeni su uzgoji u standardnim YPD<sub>20</sub> podlogama u koje je dodana mliječna kiselina u koncentracijama od 0,8 do 80 g L<sup>-1</sup> (Tablica 5.). Inokulum je pripremljen kako je to opisano u poglavlju 3.2.2. Sterilne YPD<sub>20</sub> podloge (koncentracijom glukoze od 20 g L<sup>-1</sup>) naciepljene su u aseptičnim uvjetima s po 5% vol/vol inokuluma i uzgoji su provedeni statično pri 28°C u mikroaerofilnim uvjetima bez podešavanja pH vrijednosti. Tijekom uzgoja u izuzetim

uzorcima određena je optička gustoća ( $OD_{600}$ ) pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm, te su uzorci centrifugirani i supernatant je spremljen za HPLC analizu.

### 3.2.5. Analitičke metode

Tijekom uzgoja kvasaca u različitim YPD podlogama (Tablica 5.) praćena je optička gustoća izuzetih uzoraka ( $OD_{600}$ ) (Poglavlje 3.2.6.). Nakon izdvajanja biomase centrifugiranjem određena je koncentracija suhe tvari biomase gravimetrijskom metodom ( $\gamma_x$ ) (Poglavlje 3.2.7.), a u supernatantima YPD podloga određena je koncentracija: glukoze ( $\gamma_{glc}$ ), mliječne ( $\gamma_{MK}$ ), i octene kiseline ( $\gamma_{OK}$ ), glicerola ( $\gamma_{glicerol}$ ), i etanola ( $\gamma_{EtOH}$ ). (Poglavlje 3.2.10.).

### 3.2.6. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge

Optička gustoća uzoraka određena je iz prvog decimalnog razrijeđenja uzoraka izuzetih tijekom uzgoja kvasca u različitim YPD podlogama. Određeni volumen svakog razrijeđenja ( $V \approx 4$  mL) prenesen je u kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) i pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 100 Uv-Vis (Agilent Technologies) određena je optička gustoća pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 600 nm ( $OD_{600}$ ).

### 3.2.7. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase gravimetrijskom metodom

U prethodno osušene i izvagane konusne kivete od 15 mL (Nunc, Nalge Nunc International, New York, SAD) pipetom je preneseno 3 mL izuzete suspenzije. Uzorak je centrifugiran (6000 rpm, 10 min, 4 °C, centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD) i nakon toga je supernatant otpipetiran iz kivete. Izdvojena biomasa je sušena pri 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja i vaganja kiveta s osušenom biomasom na analitičkoj vagi izračunata je koncentracija suhe tvari biomase ( $\gamma_x$ ) prema sljedećem izrazu:

$$\gamma_x = \frac{m - m_K}{V_{UZ}} \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [3-1]$$

$m$  - masa kivete s biomasom nakon sušenja [g],

$m_k$  - masa prazne kivete nakon sušenja [g],

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

### 3.2.8. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja kvasaca u YPD podlogama centrifugiranjem (6000 rpm, 10 min, 4 °C; SL 8R ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, SAD) je izdvojena biomasa. Iz dobivenih supernatanta taloženjem su izdvojeni proteini sa cinkovim sulfatom heptahidratom (Poglavlje 3.2.9.). Dobivena otopina je profiltrirana pomoću šprica kroz najlonski filter sa porama veličine 0,20  $\mu\text{m}$ . Filtrat je analiziran pomoću kromatografskog sustava.

### 3.2.9. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom

U supernatant uzorka volumena 700  $\mu\text{L}$  dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ( $\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$ ) u omjeru volumena 1:1 ( $V = 700 \mu\text{L}$ ). Dobivena otopina intenzivno je izmješana tijekom 20-ak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljena minimalno 20 minuta pri sobnoj temperaturi da se proteini istalože. Centrifugiranjem (10000  $g$ , 5 min, 4 °C; Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant profiltriran je pomoću šprice na koje je, kao nastavak, dodan najlonski filter s porama veličine 0,20  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A VP sustava (Poglavlje 3.2.10.).

### 3.2.10. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije ugljikohidrata (glukoze), glicerola, mliječne i octene kiseline te etanola u uzorcima izuzetim tijekom provedenih fermentacija. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20  $\mu\text{L}$  uzorka u sustav. Protok mobilne faze je 0,5 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone

(Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9  $\mu\text{m}$ ) s predkolumnom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9  $\mu\text{m}$ ) 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma.

Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 6).

**Tablica 6.** Retencijska vremena i baždarni pravci.

spoj	$t_{R^*}$ (min)	jednandžba baždarnog pravca	$R^2$ (-)
glukoza	13,012	$A = 377242,1858x - 4487,0600$	1.0000
mliječna kiselina	17.473	$A = 243473,97x + 2856,08$	0,9999
glicerol	18.183	$A = 298199,58x + 7203,53$	0,9999
octena kiselina	19,936	$A = 164952,58x + 2260,95$	0,9999
etanol	27,464	$A = 1163351,69x - 953,28$	1,0000

\* $t_{R^*}$  izraženo kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; A, površina

### 3.2.11. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline

#### 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 [ $\text{g L}^{-1}$ ]

#### 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 [ $\text{g L}^{-1}$ ]

**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).

**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).

$X, P$  - konačna koncentracija biomase, odnosno produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ],  
 (Marić i Šantek, 2009).

**Produktivnost ( $Pr$ )**

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}] \quad [3-6]$$

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

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

$t_U$  - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja fermentativne sposobnosti i otpornosti na mliječnu kiselinu ne-*Saccharomyces* kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148. Uzgoji su provedeni u YPD (eng. yeast extract, peptone, dextrose) podlogama u kojima je kao glavni izvor ugljika korištena glukoza u rasponu koncentracija od 10 – 100 g L<sup>-1</sup>. Određivanje utjecaja mliječne kiseline na fermentativnu sposobnost kvasaca provedeno je u YPD<sub>20</sub> podlozi uz dodatak mliječne kiseline u koncentracijama od 0,8 do 80 g L<sup>-1</sup>. Otpornost na mliječnu kiselinu utvrđivana je zbog pronalazjenja kvasca koji može biti potencijalni kandidat za konstruiranje transformanata koji umjesto etanola mogu proizvoditi L-mliječnu kiselinu u bioprocesu bez regulacije pH vrijednosti podloge. Bioprocesi proizvodnje mliječne kiseline u kojima se ne kontrolira pH vrijednost imaju jednostavniji i jeftiniji postupak izdvajanja i pročišćavanja mliječne kiseline iz fermentirane podloge čime se postiže konkurentnija cijena mliječne kiseline na tržištu.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- 4.1.** Određivanja fermentativne sposobnosti kvasaca
- 4.2.** Anaerobni uzgoj nekih kvasaca u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glc}} = 100 \text{ g L}^{-1}$ )
- 4.3.** Određivanje utjecaja mliječne kiseline na fermentativnu sposobnost nekih kvasaca

#### 4.1. Određivanje fermentativne sposobnosti kvasaca

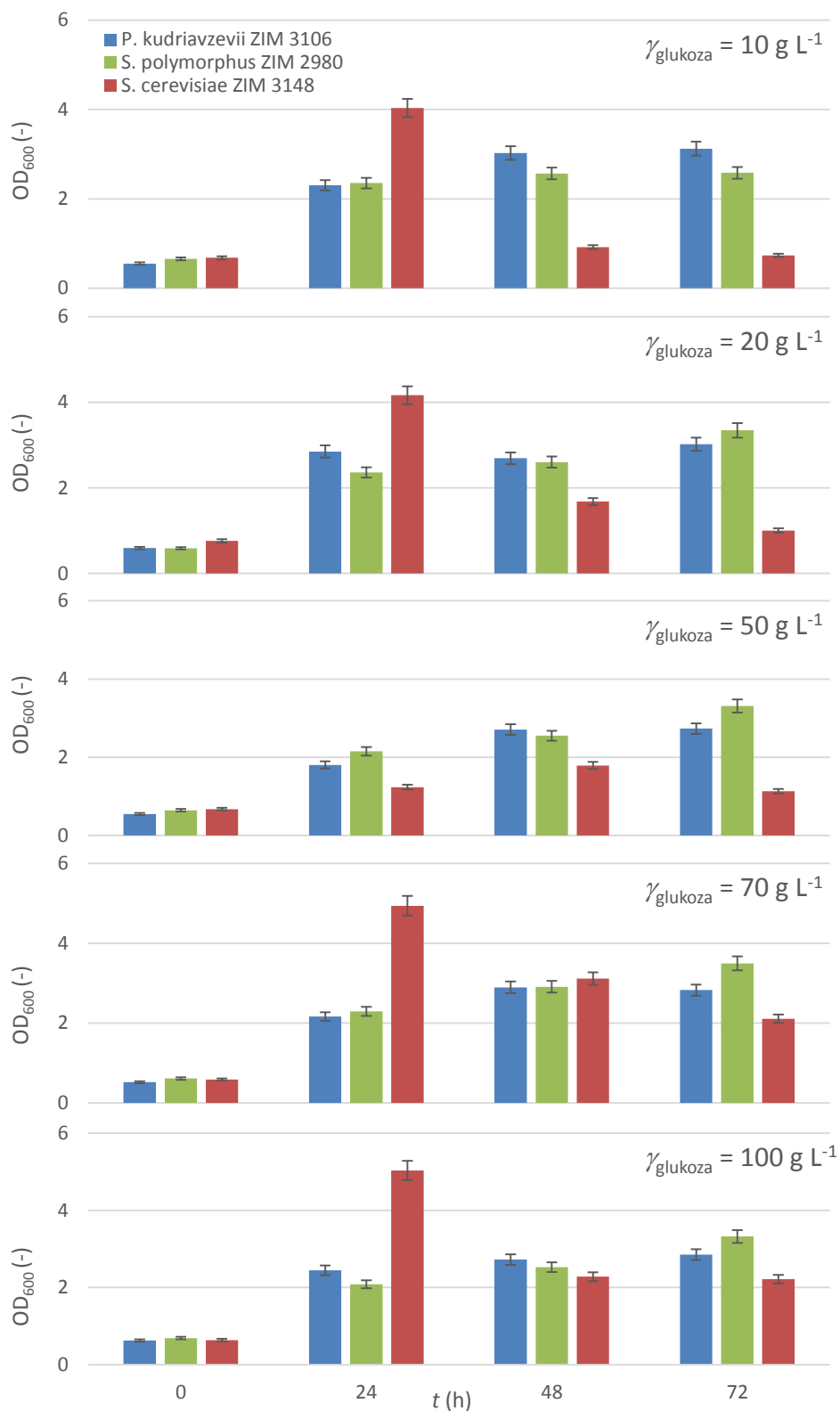
Uzgoj kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 proveden je u YPD podlozi s različitim početnim koncentracijama glukoze od 10 do 100 g L<sup>-1</sup> (Slika 2., Tablica 5., poglavlje 3.2.1.) statično u mikroaerofilnim uvjetima.

Promjenom optičke gustoće praćen je rast istraživanih kvasaca tijekom 72 h uzgoja (Slika 2.). Nakon 72 h uzgoja izdvojen je supernatant u kojem su određene koncentracije supstrata i produkata fermentacije (etanol, glicerol, octena kiselina; Tablica 7.). Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 2. i 3.

Ne-*Saccharomyces* kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 utroši sav supstrat tijekom 48 h iz YPD podloga u koje je dodana glukoza u rasponu koncentracija od 10 do 50 g L<sup>-1</sup>, dok je u podlozi sa 70 odnosno 100 g L<sup>-1</sup> glukoze utrošeno 97,40 odnosno 86,29% glavnog izvora ugljika. Kvasac *S. polymorphus* ZIM 2980 utroši sav supstrat tijekom 48 h iz YPD podloga u koje je dodana glukoza koncentracije 10 g L<sup>-1</sup>, dok je u podlogama u rasponu koncentracija od 20 do 100 g L<sup>-1</sup> glukoze utrošeno 98,73 odnosno 67,58% glavnog izvora ugljika.

Kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 tijekom 48 h utroši sav supstrat iz YPD podloga u koje je dodana glukoza u rasponu koncentracija od 10 do 70 g L<sup>-1</sup>, dok je u podlozi sa 100 g L<sup>-1</sup> glukoze utrošeno 94% glavnog izvora ugljika.



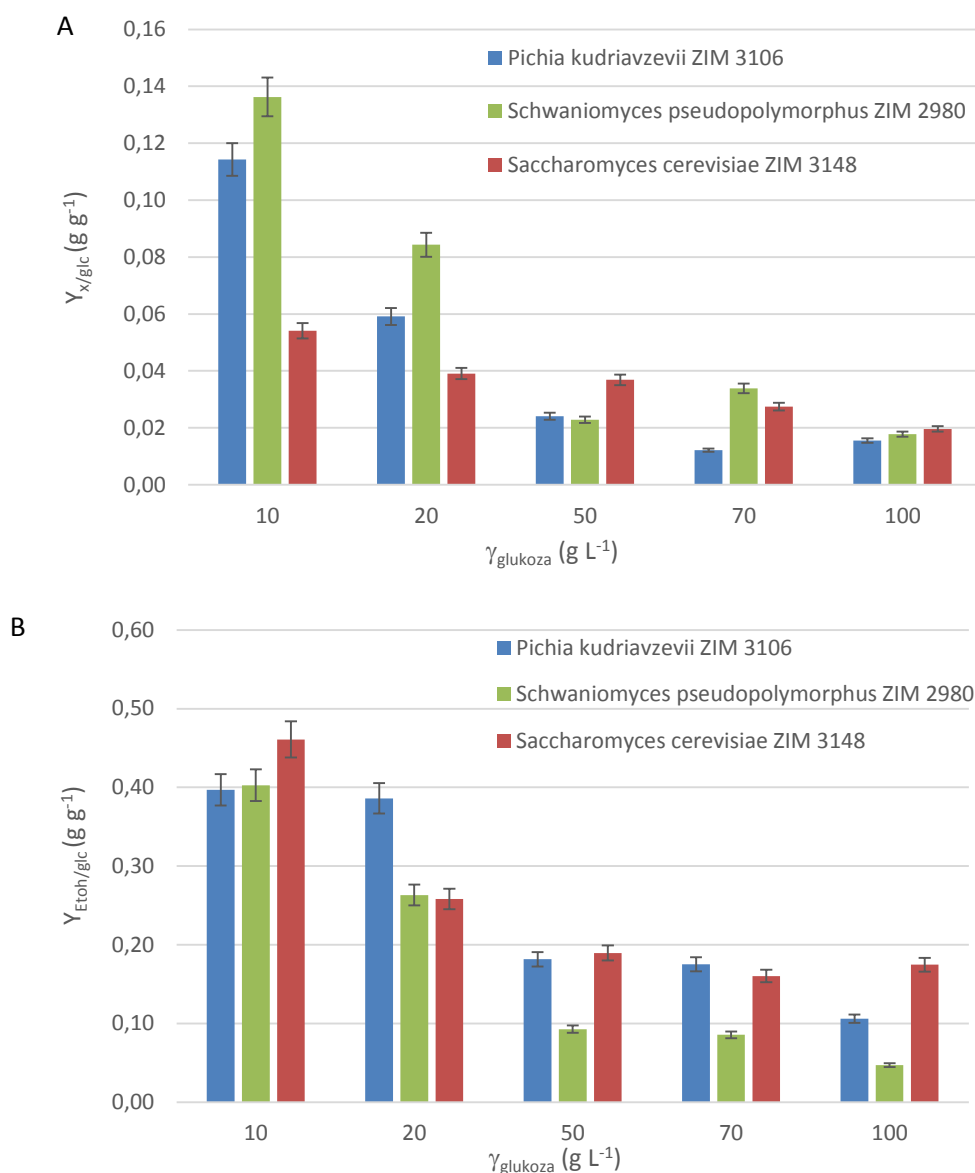


**Slika 2.** Promjena optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) tijekom uzgoja kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlozi pri različitim koncentracijama glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} = 10 - 100 \text{ g L}^{-1}$ ) u mikroaerofilnim uvjetima.

**Tablica 7.** Koncentracija biomase, etanola, octene kiseline i glicerola određene nakon uzgoja provedenih u YPD podlogama s različitom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glc}} = 10 - 100 \text{ g L}^{-1}$ ) s pomoću kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148.

<b>Kvasac</b>	$\gamma_{\text{glc}}$	$\gamma_{\text{glc},72\text{h}^*}$	$\gamma_{\text{X}}^*$	$\gamma_{\text{EtOH}}^*$	$\gamma_{\text{HAc}}^*$	$\gamma_{\text{glicerol}}^*$
	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )	(g L <sup>-1</sup> )
<i>Pichia kudriavzevii</i> ZIM 3106	10	0,02	1,14	3,96	0,21	0,77
	20	0,05	1,18	7,70	0,25	1,13
	50	0,17	1,20	9,05	0,02	0,87
	70	2,60	0,82	11,81	0,05	1,05
	100	13,71	1,34	9,15	0,00	0,84
<i>Schwaniomyces polymorphus</i> ZIM 2980	10	0,02	1,36	4,02	0,27	0,82
	20	1,27	1,58	2,47	0,09	0,82
	50	15,80	0,78	3,17	1,34	0,38
	70	32,23	1,28	3,23	0,00	0,43
	100	32,42	1,20	3,18	1,34	0,47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3148	10	0,02	0,54	4,60	0,14	0,49
	20	0,05	0,78	5,15	0,24	0,87
	50	0,14	1,62	8,33	0,00	0,44
	70	1,51	1,88	10,98	0,00	0,78
	100	6,07	1,96	17,44	0,03	1,18

\*određeno nakon 72 h fermentacije



**Slika 3.** (A) Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{x/glc}$ ) i (B) koeficijent konverzije supstrata u etanol ( $Y_{\text{EtOH/glc}}$ ) za kvasce *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 određen pri različitim početnim koncentracijama glukoze u YPD podlozi (10 - 100 g L<sup>-1</sup>).

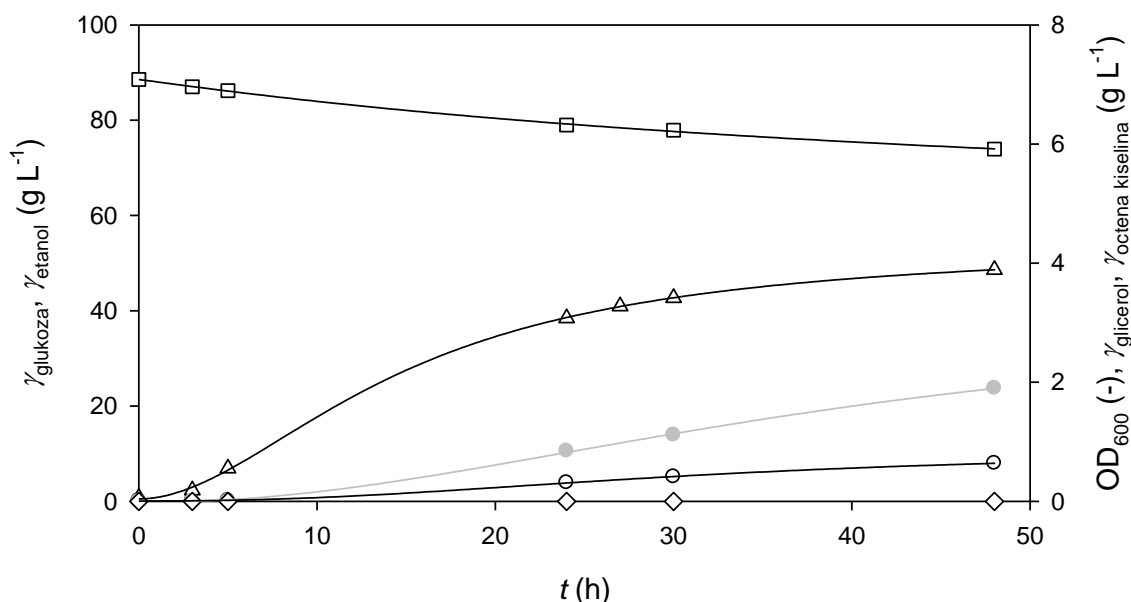
Koeficijenti konverzije glukoze u biomasu i glukoze u etanol smanjuju se s porastom koncentracije glukoze za fermentacije provedene sa sva tri kvasca (Slika 3.). Kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 i kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 imaju vrlo slične vrijednosti koeficijenta konverzije glukoze u etanol za fermentacije provedene u modificiranim YPD podlogama u kojima je koncentracija glukoze od 10 do 70 g L<sup>-1</sup>, dok je pri koncentraciji glukoze od 100 g L<sup>-1</sup> vrijednost koeficijenta konverzije glukoze u etanol za kvasac *P.*

*kudriavzevii* ZIM 3106 manja za oko 30 %. Koeficijent konverzije glukoze u etanol je kod kvasca *S. polymorphus* ZIM 2980 pri koncentracijama glukoze većim od  $50 \text{ g L}^{-1}$  dvostruko manji od istih vrijednosti određenih za kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 i *S. cerevisiae* ZIM 3148.

#### 4.2. Anaerobni uzgoj kvasaca u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glc}} \approx 90 \text{ g L}^{-1}$ )

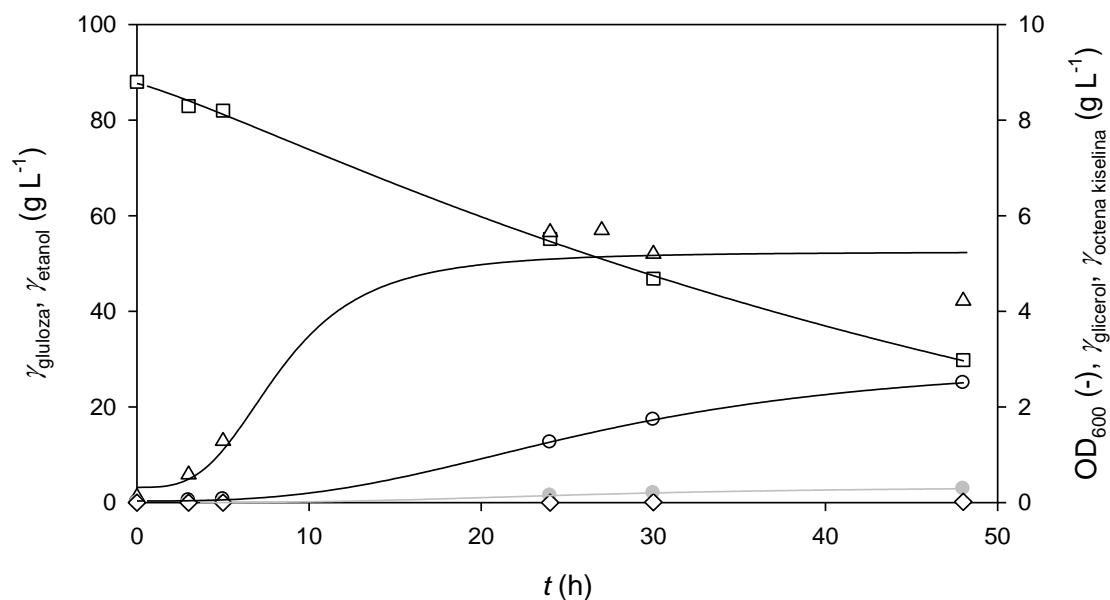
U ovom poglavlju prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca *S. polymorphus* ZIM 2980 (Slika 4.), *P. kudriavzevii* ZIM 3106 (Slika 5.) i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 (Slika 6.) u YPD podlozi s povišenom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} \approx 90 \text{ g L}^{-1}$ ) pri  $28^\circ\text{C}$  i  $n = 130 \text{ rpm}$ . Koncentracije glukoze i produkata fermentacije određene su HPLC metodom (poglavlje 3.2.10.), a vrijednosti za optičku gustoću određene su spektrofotometrijski (poglavlje 3.2.6.).

Osnovni biokinetički parametri i parametri uspješnosti bioprocasa proizvodnje etanola s pomoću ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} \approx 100 \text{ g L}^{-1}$ ) prikazani su u Tablici 8.

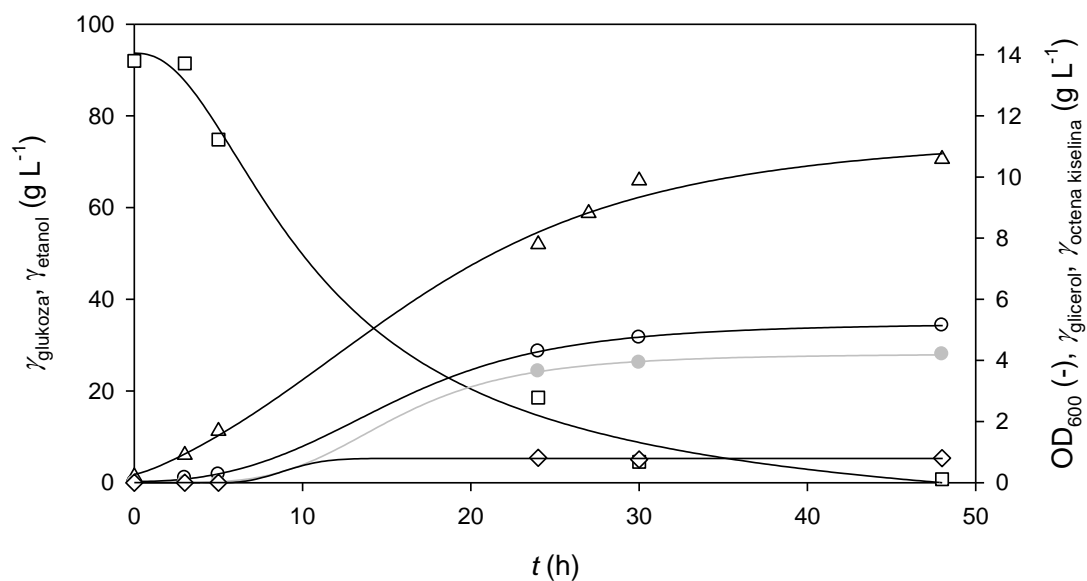


**Slika 4.** Promjena koncentracije glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}}$ ,  $\square$ ), optičke gustoće ( $\text{OD}_{600}$ ,  $\triangle$ ), etanola ( $\gamma_{\text{etanol}}$ ,  $\circ$ ), glicerola ( $\gamma_{\text{glicerol}}$ ,  $\bullet$ ) i octene kiseline ( $\gamma_{\text{octena kiselina}}$ ,  $\diamond$ ) tijekom anaerobnog uzgoja

kvasca *Schwanniomyces polymorphus* ZIM 2980 u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} \approx 100 \text{ g L}^{-1}$ ) pri 28°C.



**Slika 5.** Promjena koncentracije glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}}$ , □), optičke gustoće ( $OD_{600}$ , △), etanola ( $\gamma_{\text{etanol}}$ , ○), glicerola ( $\gamma_{\text{glicerol}}$ , ●) i octene kiseline ( $\gamma_{\text{octena kiselina}}$ , ◇) tijekom anaerobnog uzgoja kvasca *Pichia kudriavzevii* ZIM 3106 u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} \approx 100 \text{ g L}^{-1}$ ) pri 28°C.



**Slika 6.** Promjena koncentracije glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}}$ , □), optičke gustoće ( $OD_{600}$ , △), etanola ( $\gamma_{\text{etanol}}$ , ○), glicerola ( $\gamma_{\text{glicerol}}$ , ●) i octene kiseline ( $\gamma_{\text{octena kiselina}}$ , ◇) tijekom anaerobnog uzgoja

kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} \approx 100 \text{ g L}^{-1}$ ) pri 28°C.

**Tablica 8.** Osnovni biokinetički parametri i parametri uspješnosti bioprocesa proizvodnje etanola s pomoću ne-*Saccharomyces* kvasaca i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ( $\gamma_{\text{glukoza}} \approx 90 \text{ g L}^{-1}$ ) pri 28°C.

<b>Kvasac</b>	$Y_{P/S^*}$	<i>Utrošena glukoza</i>	$Pr_{\text{EtOH}}$
	(g g <sup>-1</sup> )	(%)	(g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>Pichia kudriavzevii</i> ZIM 3106	0,43	66,14	0,52
<i>Schwaniomyces polymorphus</i> ZIM 2980	0,54	16,49	0,17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 3148	0,38	99,17	0,72

\*na utrošeni supstrat

Proizvodnja etanola s pomoću kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD podlozi u kojoj je početna koncentracija glukoze iznosila oko 90 g L<sup>-1</sup> proveden je kako bi se utvrdili procesni parametri poput produktivnosti procesa proizvodnje etanola. Anaerobni šaržni uzgoj proveden je u trajanju od 48 sati u Erlenmeyer tikvici na magnetnoj mješalici ( $n = 130 \text{ min}^{-1}$ ) i pri temperaturi od 28°C bez kontrole pH vrijednosti podloge. Tijekom 48 h fermentacije, kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 utrošio je gotovo svu glukožu iz podloge dok su kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 i *S. polymorphus* ZIM 2980 utrošili 66,14 i 16,49 % glukoze iz podloge. Maksimalna koncentracija etanola postignuta nakon 48 h fermentacije za sva tri kvasca iznosila je redom, 7,98 g L<sup>-1</sup> (*S. polymorphus* ZIM 2980; Slika 4.), 25,04 g L<sup>-1</sup> (*P. kudriavzevii* ZIM 3106; Slika 5.) i 34,30 g L<sup>-1</sup> (*S. cerevisiae* ZIM 3148, Slika 6.). Tijekom anaerobnog uzgoja kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. pseudopolymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD<sub>90</sub> podlozi, najviša

produktivnost procesa proizvodnje etanola postignuta je za kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 ( $0,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Za proizvodnju etanola s pomoću uzgoja kvasca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 postignuta je 30 % manja produktivnost proizvodnje etanola ( $0,52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), dok je za proizvodnju etanola s pomoću kvasca *S. polymorphus* ZIM 2980 određena čak četiri puta manja vrijednost ( $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Segura-Garcia i sur. (2015) proizveli su oko  $30 \text{ g L}^{-1}$  etanola iz soka agave s pomoću kvasca *Pichia kluyveri* GRO3 uz koeficijent konverzije supstrata u etanol od  $0,31 \text{ g g}^{-1}$ , dok su Chamnipa i sur. (2018) tijekom uzgoja *P. kudriavzevii* proizveli  $35,51 \text{ g/L}$  etanola iz hidrolizata bagaze šećerne trske koji je sadržavao  $85 \text{ g L}^{-1}$  glukoze. Za ovaj uzgoj određen je koeficijent konverzije glukoze u etanol od  $0,42 \text{ g g}^{-1}$  i produktivnost procesa proizvodnje etanola od  $1,48 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Dobiveni rezultati za koeficijent konverzije glukoze u etanol odgovaraju vrijednostima određenim u ovom radu za *P. kudriavzevii* ZIM 3106 (Tablica 8.).

Proizvodnja etanola s ne-*Saccharomyces* kvascima korištenim u ovom radu ima smanjenu produktivnost u odnosu na fermentacije provedene s kvascem *S. cerevisiae* ZIM 3148. Povećanje produktivnosti procesa proizvodnje etanola u kojima se kao radni mikroorganizam koriste ne-*Saccharomyces* kvasci moglo bi biti u promjeni optimalne temperature fermentacije ili načinu vođenja procesa, npr. kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 je termotolerantni kvasac koji može rasti i pri temperaturi od  $45^\circ\text{C}$  (Pongcharoen i sur., 2018; Chamnipa i sur., 2018).

### 4.3. Određivanje utjecaja mliječne kiseline na fermentativnu sposobnost nekih kvasaca

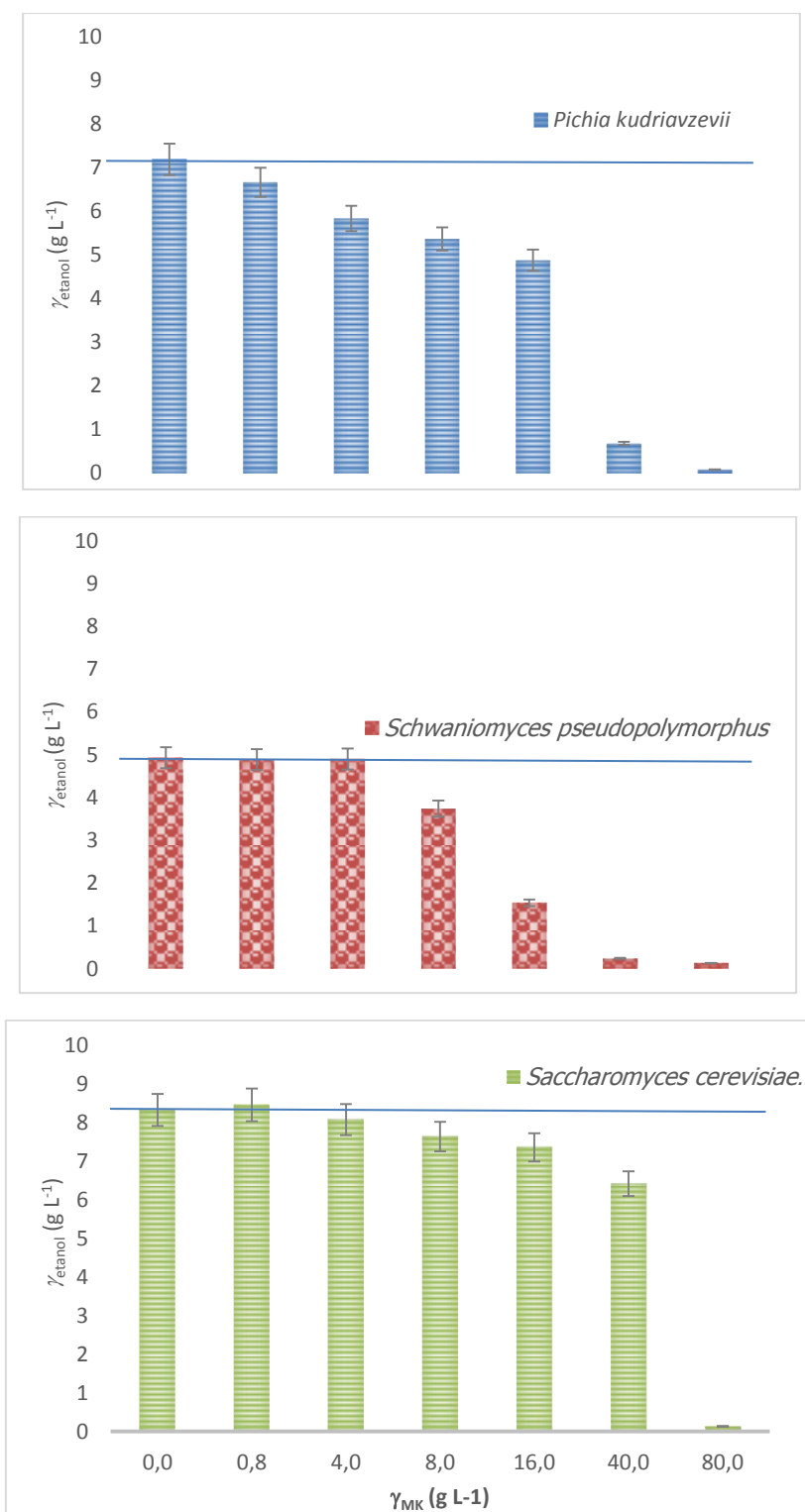
Uzgoj kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 proveden je u YPD<sub>20</sub> podlozi s različitim početnim koncentracijama mliječne kiseline (Tablica 5., poglavlje 3.2.1.) statično u mikroaerofilnim uvjetima. Tijekom provedenih bioprocasa praćena je promjena optičke gustoće (podaci nisu prikazani) te je HPLC metodom određena koncentracija glukoze i produkata fermentacije (etanol, glicerol, octena kiselina). Dobiveni rezultati prikazani na Slikama 4., 5. i 6.

Utjecaj slabe organske kiseline, kao što je mliječna kiselina, na fermentativnu sposobnost kvasaca određen je kako bi se pronašao kvasac koji može biti dobar kandidat za genetičke transformacije u soj producent mliječne kiseline te kako bi se taj soj koristio u bioprocesima bez regulacije pH vrijednosti, tj. u procesima u kojima se ne koriste sredstva za neutralizaciju.

U ovom radu određeno je da koncentracije mliječne kiseline od 0,8 g L<sup>-1</sup> do 4,0 g L<sup>-1</sup> nemaju utjecaj na konačni prinos etanola prilikom uzgoja kvasaca *S. polymorphus* ZIM 2980 i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD<sub>20</sub> podlozi, dok kod kvasca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 mliječna kiselina u koncentraciji od 0,8 g L<sup>-1</sup> do 4 g L<sup>-1</sup> smanjuje prinos etanola za oko 7 % do 19 % (Slika 7.).

Mliječna kiselina u koncentraciji od 40 g L<sup>-1</sup> inhibira rast i proizvodnju etanola kod kvasca *S. polymorphus* ZIM 2980, dok pri ovoj koncentraciji mliječne kiseline kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 postiže prinos etanola od 77 % u odnosu na kontrolu, a kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 postiže samo 8 % od prinosa etanola postignutog u kontrolnom uzgoju. Mliječna kiselina u koncentraciji od 80 g L<sup>-1</sup> inhibira rast i proizvodnju etanola kod sve tri navedene vrste kvasaca. Prema dobivenim rezultatima niti jedan od dva navedena ne-*Saccharomyces* kvasca ne može rasti u podlozi s dodanom mliječnom kiselinom uspješno kao kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148.





**Slika 7.** Utjecaj mliječne kiseline na proizvodnju etanola s pomoću kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. pseudopolymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3418 u YPD<sub>20</sub> podlozi u mikroaerofilnim uvjetima pri 28°C.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Za određivanje fermentativne sposobnosti kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. polymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 na glukozi je testiran raspon koncentracija od 10 do 100 g L<sup>-1</sup>. Kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 tijekom 48 h utroši sav supstrat iz YPD podloga u kojima je dodana glukoza u rasponu koncentracija od 10 do 70 g L<sup>-1</sup>, dok je u podlozi sa 100 g L<sup>-1</sup> glukoze utrošeno 94% glavnog izvora ugljika. Kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 utroši sav supstrat tijekom 48 h iz YPD podloga u koje je dodana glukoza u rasponu koncentracija od 10 do 50 g L<sup>-1</sup>, dok je u podlozi sa 70 odnosno 100 g L<sup>-1</sup> glukoze utrošeno 97,40 odnosno 86,29% glavnog izvora ugljika. Kvasac *S. polymorphus* ZIM 2980 utroši sav supstrat tijekom 48 h iz YPD podloga u koje je dodana glukoza koncentracije 10 g L<sup>-1</sup>, dok je u podlogama s 20 do 100 g L<sup>-1</sup> glukoze utrošeno 98,73 odnosno 67,58% glavnog izvora ugljika.
2. Tijekom anaerobnog uzgoja kvasaca *P. kudriavzevii* ZIM 3106, *S. pseudopolymorphus* ZIM 2980 i *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD<sub>90</sub> podlozi najviša produktivnost procesa proizvodnje etanola postignuta je za kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 (0,72 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Za proizvodnju etanola s pomoću kvasca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 postignuta je 30 % manja produktivnost proizvodnje etanola (0,52 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), dok je za proizvodnju etanola s pomoću kvasca *S. polymorphus* ZIM 2980 postignuta čak četiri puta manja vrijednost (0,17 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).
3. Koncentracije mliječne kiseline od 0,8 g L<sup>-1</sup> do 4,0 g L<sup>-1</sup> nemaju utjecaj na konačni prinos etanola prilikom uzgoja kvasaca *S. pseudopolymorphus* ZIM 2980 i kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3148 u YPD<sub>20</sub> podlozi, dok kod kvasca *P. kudriavzevii* ZIM 3106 mliječna kiselina u koncentraciji od 0,8 g L<sup>-1</sup> do 4 g L<sup>-1</sup> smanjuje prinos etanola za oko 7 % do 19 %.
4. Mliječna kiselina u koncentraciji od 40 g L<sup>-1</sup> inhibira rast i proizvodnju etanola kod kvasca *S. pseudopolymorphus* ZIM 2980, dok pri ovoj koncentraciji mliječne kiseline kvasac *S. cerevisiae* ZIM 3148 postiže 77 % od prinosa etanola u odnosu na kontrolu, a kvasac *P. kudriavzevii* ZIM 3106 postiže samo 8 % od prinosa etanola postignutog u kontrolnom uzgoju. Mliječna kiselina u koncentraciji od 80 g L<sup>-1</sup> inhibira rast i proizvodnju etanola kod sve tri navedene vrste kvasaca.

## 6. POPIS LITERATURE

- A. Contreras, C. Hidalgo, P. A. Henschke, P. J. Chambers, C. Curtin, C. Varela (2014) Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine, *Applied and Environmental Microbiology* : str. 1-2
- Arijana Bušić, Nenad Marđetko, Semjon Kundas, Galina Morzak, Halina Belskaya, Mirela Ivančić Šantek, Draženka Komes, Srđan Novak and Božidar Šantek (2018) Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review, *Food technology and biotechnology* : str. 3
- Casey E, Sedlak M, Ho NWY, Mosier NS (2010) Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Blackwell Publishing Ltd.*, str. 5
- Cyprian E. Oshoma, Darren Greetham, Edward J. Louis, Katherine A. Smart, Trevor G. Phister, Chris Powell, Chenyu Du (2015) Screening of Non-*Saccharomyces cerevisiae* Strains for Tolerance to Formic Acid in Bioethanol Fermentation, *PLOS One* : str. 2
- Eric A. Johnson (2013) Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes, *Appl Microbiol Biotechnol* : str. 2
- Guangsen Fan, Chao Teng, Dai Xu, Zhilei Fu, Pengxiao Liu, QihuaWu, Ran Yang, and Xiuting Li (2019) Improving Ethyl Acetate Production in Baijiu Manufacture by *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* Mixed Culture Fermentations, *BioMed Research International* : str. 1-2
- H.W. du Plessis, M. du Toit, J.W. Hoff, R.S. Hart, B.K. Ndimba, N.P. Jolly (2017) Characterisation of Non-Saccharomyces Yeasts Using Different Methodologies and Evaluation of their Compatibility with Malolactic Fermentation: str. 1-2
- Jessica Lleixà, Maria Manzano, AlbertMas and Mariadel C.Portillo (2016) *Saccharomyces* and non *Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions: str. 1-2
- Luis E. Segura-García, Patricia Taillandier, Cedric Brandam, Anne Gschaedler (2015) Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium, *LWT – Food Science and Technology*, 60 : str. 1-2, 5
- M.E. B. Whitener, J. Szanstrup, S. Carlin, B. Divol, M.Du Toit and U. Vrhovsek (2017) Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 23: str. 179-180
- Marić V., Šantek B. (2009) *Biokemijsko inženjerstvo*, str. 85

- Martin Koller, Daniel Sandholzer, Anna Salerno, Gerhart Braunegg, Michael Narodoslowsky (2013) Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey, *Elsevier B.V.* : str. 64-71
- Mustafa Türker (2014) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, *Advances in Science and Industrial Productionss of Baker's Yeast* : str. 1-2
- N.P. Jolly, O.P.H. Augustyn and I.S. Pretorius (2006) The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production, *S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 27, No. 1* : str. 1-2
- Narendranath N.V., Thomas KC, Ingledew WM (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* : str. 171-177
- Nuttaporn Chamnipa, Sudarat Thanonkeo, Preekamol Klanrit, Pornthap Thanonkeo (2018) The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production, *Brazilian journal of microbiology* : str. 7, 11
- Venkatachalam Narayanan, Violeta Sánchez i Nogué, Ed W. J. van Niel and Marie F. Gorwa-Grauslund (2016) Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* : str. 2
- Xiaoru Hou & Shuo Yao (2012) Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion, *Applied Microbiology and Biotechnology* : str. 1-10

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

## Izjava o izvornosti

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

Kristina Vukoje

ime i prezime studenta