

Selekcija određenih vrsta ne-Saccharomyces kvasaca za industrijsku proizvodnju biokemikalija

Mrak, Karla

Master's thesis / Diplomski 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:159:531570>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

Karla Mrak
1174/BPI

Selekcija određenih vrsta ne-
Saccharomyces **kvasaca za**
industrijsku proizvodnju
biokemikalija

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

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Antoniji Trontel na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, iznimnom strpljenju, uloženom trudu i susretljivosti tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na pruženoj ljubavi, potpori i razumijevanju za vrijeme pisanja ovog diplomskog rada i tijekom cjelokupnog studiranja.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama što su mi uljepšali studentske dane.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

SELEKCIJA ODREĐENIH VRSTA NE-*Saccharomyces* KVASACA ZA INDUSTRIJSKU PROIZVODNJU BIOKEMIKALIJA

Karla Mrak, 1174/BPI

Sažetak:

Ne-*Saccharomyces* kvasci mogu rasti na različitim ugljikohidratima prisutnim u lignoceluloznim sirovinama te mogu imati veću otpornost prema stresnim uvjetima pri kojima se provodi bioproces. Ova svojstva ne-*Saccharomyces* kvasaca omogućavaju njihovu primjenu u proizvodnji različitih enzima i biokemikalija. U ovom radu provedena je selekcija ne-*Saccharomyces* kvasaca iz rodova *Scheffersomyces* (*Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, *Scheffersomyces lignosum* JCM 9837, *Scheffersomyces shehatae* JCM 9840) i *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, *Kluyveromyces marxianus* CBS 712) te kvasaca *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 i *Schwaniomyces polymorphus* ZIM 2980. Odabir je proveden na temelju mogućnosti rasta na ugljikohidratima prisutnim u lignoceluloznim sirovinama, glavnim produktima metabolizma i otpornosti ovih kvasaca na visoke koncentracije mliječne kiseline. Za uzgoj u većem mjerilu odabran je kvasac koji može tolerirati visoke koncentracije mliječne kiseline i rasti na svim ugljikohidratima prisutnim u lignoceluloznim sirovinama. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 proveden je u hranjivim YPD podlogama s i bez mliječne kiseline. Dinamika rasta kvasca i proizvodnje etanola u navedenim podlogama okarakterizirana je osnovnim biokinetičkim parametrima (YPD, $\mu_{\max} = 0,40 \text{ h}^{-1}$, $Y_{\text{etanol/S}} = 0,46 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{etanol/S}} = 0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; YPD + mliječna kiselina, $\mu_{\max} = 0,10 \text{ h}^{-1}$, $Y_{\text{etanol/S}} = 0,42 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{etanol/S}} = 0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Ključne riječi: ne-*Saccharomyces* kvasci, ugljikohidrati prisutni u lignocelulozi, otpornost na mliječnu kiselinu, selekcija kvasaca

Rad sadrži: 55 stranica, 19 slika, 14 tablica, 44 literaturnih referenci, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Antonija Trontel

Pomoć pri izradi: Nenad Mardetko, mag. ing. bioproc.

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Datum obrane: 23. listopad, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

SCREENING OF NON-*Saccharomyces* YEAST FOR INDUSTRIAL PRODUCTION OF BIOCHEMICALS

Karla Mrak, 1174/BPI

Abstract:

Non-*Saccharomyces* yeasts can grow on carbohydrates that are constituents of lignocellulosic biomass and have greater resistance to the stress conditions under which the bioprocess is carried out. These properties of non-*Saccharomyces* yeasts allow their application in the production of various enzymes and biochemicals. In this paper, selection of non-*Saccharomyces* yeasts from genera *Scheffersomyces* (*Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, *Scheffersomyces lignosum* JCM 9837, *Scheffersomyces shehatae* JCM 9840) and *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, *Kluyveromyces marxianus* CBS 712), as well as yeasts *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 and *Schwaniomyces polymorphus* ZIM 2980 was performed. Selection was made based on the growth potential on the carbohydrates present in the lignocellulosic biomass, the main products of metabolism, and the resistance of these yeasts to high concentrations of lactic acid. Based on the experiments performed, the yeast with the highest resistance to elevated lactic acid concentrations and ability of growth on all carbohydrates was selected for cultivation on a larger scale. Cultivation of yeast *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 in nutrient YPD media with and without lactic acid was performed in order to determine the dynamics of yeast growth in these conditions. The growth and ethanol production is characterized by basic biokinetic parameters (YPD, $\mu_{\max} = 0,40 \text{ h}^{-1}$, $Y_{\text{ethanol/S}} = 0,46 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{ethanol/S}} = 0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; YPD + lactic acid, $\mu_{\max} = 0,10 \text{ h}^{-1}$, $Y_{\text{ethanol/S}} = 0,42 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{ethanol/S}} = 0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Keywords: non-*Saccharomyces* yeasts, carbohydrates present in lignocellulose, lactic acid resistance, yeast selection

Thesis contains: 55 pages, 19 figures, 14 tables, 44 references, 2 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Antonija Trontel, Assistant professor

Technical support and assistance: Nenad Mardetko, mag. ing. bioproc.

Reviewers:

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

Paper defended: 23rd October 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Primjena kvasca u biotehnologiji za proizvodnju biokemikalija i biogoriva	2
2.2. Primjena lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biokemikalija i biogoriva	3
2.3. Ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci i njihova primjena	5
2.4. Utjecaj slabih organskih kiselina na rast i aktivnost kvasca	9
2.5. Mliječna kiselina	10
2.5.1. Primjena mliječne kiseline	10
2.5.2. Proizvodnja mliječne kiseline	11
2.5.3. Mikroorganizmi primijenjeni u biotehnoškoj proizvodnji mliječne kiseline	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Radni mikroorganizmi	13
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Hranjive podloge	14
3.1.4. Aparatura i pribor	15
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	17
3.2.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na različitim ugljikohidratima	18
3.2.3. Određivanje inhibitornog utjecaja mliječne kiselina na rast i aktivnost ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca	18
3.2.4. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777	19
3.3. Analitičke metode	19
3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka	19
3.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca	20
3.3.3. Priprema uzoraka za HPLC i UPLC analizu	20
3.4. Određivanje parametara uspješnosti	21
3.4.1. Prinos biomase (Y_X)	21
3.4.2. Prinos produkta (Y_P)	21
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)	21
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)	21
3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_S)	22
3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_P)	22

3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)	22
3.4.8. Produktivnost (Pr)	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na različitim ugljikohidratima.....	24
4.1.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na celobiozi.....	24
4.1.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca u podlogama s glukozom, galaktozom ili manozom	27
4.1.3. Određivanje rasta i aktivnosti ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na podlogama sa ksilozom ili arabinozom .	35
4.2. Određivanje inhibitornog utjecaja mliječne kiseline na rast ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca.....	41
4.3. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777	43
4.3.1. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 u YPD podlozi.....	43
4.3.2. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 u YPD podlozi s visokom koncentracijom mliječne kiseline.....	45
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA.....	50
7. PRILOZI
7.1. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda HPLC i UPLC analizom
7.2. Popis kratica

1. UVOD

Povećan interes za mikrobnom proizvodnjom biokemikalija i biogoriva rezultat je ograničenih rezerva nafte, klimatskih promjena, političkih nestabilnosti i ubrzanog rasta svjetske populacije koji dovodi do povećane potražnje za hranom, gorivom i energijom. Upravo mikrobnom proizvodnjom biokemikalija i biogoriva iz različitih lignoceluloznih sirovina, poput biomase iz komunalnog otpada, poljoprivrednog otpada, biljnih ostataka i industrijskog otpada, predstavlja prihvatljiviju alternativu proizvodima dobivenim iz (Lobs i sur., 2017; Wu i sur., 2017; Johnson i Echavarri-Erasum 2011). Za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina nužna je njihova predobrada, koja se najčešće provodi primjenom kiselina ili lužina. Zbog toga je uz upotrebljive šećere prisutan i veliki broj inhibitora dobivenih iz biomase, uz to, biogoriva i biokemikalije su često sami toksični za radne sojeve (Chen i Dou, 2016).

Ne-Saccharomyces kvasci predstavljaju veliki, ali slabo iskorišten izvor bioraznolikosti. Mnogi *ne-Saccharomyces* kvasci pokazuju svojstva bitna za industrijsku primjenu, poput rasta na kompleksnim supstratima, veću otpornost prema stresnim uvjetima pri kojima se provodi proces kao i prema prisutnim inhibitorima (Mukherjee i sur. 2017; Radecka i sur., 2015). Upravo zbog navedenih razloga neke vrste *ne-Saccharomyces* kvasaca imaju potencijal za primjenu u proizvodnji bioetanola druge generacije i biokemikalija. Osim primjene *ne-Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji bioetanola, važno je ispitati njihov potencijal za proizvodnju mliječne kiseline. Porast proizvodnje mliječne kiseline posljedica je njene primjene u industriji proizvodnje biorazgradljive plastike - polimera mliječne kiseline (eng. Poly lactic acid; PLA; Wang i sur., 2015).

Cilj ovog rada bio je:

- Odrediti rast i aktivnosti odabranih *ne-Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima prisutnim u lignoceluloznim sirovinama,
- Odrediti inhibitorski utjecaj mliječne kiseline na rast odabranih *ne-Saccharomyces* kvasaca s ciljem selekcije kvasca s najvećom rezistencijom prema mliječnoj kiselini,
- Provesti uzgoj odabrane vrste *ne-Saccharomyces* kvasca u većem mjerilu u hranjivim podlogama s i bez mliječne kiseline, odrediti glavne bioprocesne parametre i odrediti inhibitorski učinak mliječne kiseline.

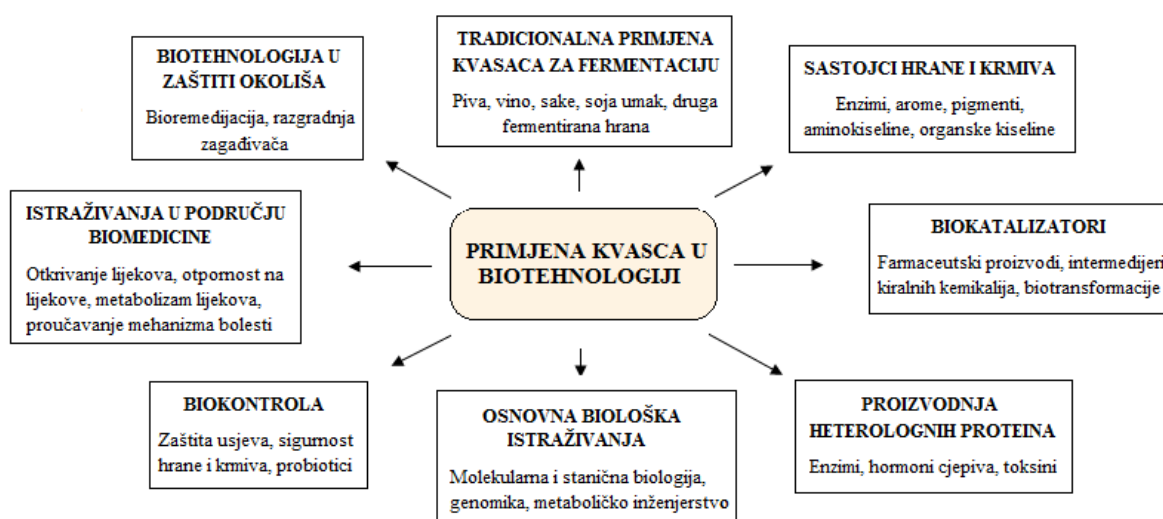
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Primjena kvasca u biotehnologiji za proizvodnju biokemikalija i biogoriva

Kvasci su jedna od najbolje proučenih skupina mikroorganizma u prirodi. Opisano je više od tisuću različitih vrsta, od kojih su mnoge kroz tisuće godina povezane s ljudskom aktivnošću (Radecka i sur., 2015).

U biotehnologiji kvasci, njihovi enzimi i metaboliti, primjenjuju se u velikom broju procesa. Njihova primjena uključuje proizvodnju fermentirane hrane, pića, goriva, kemikalija i farmaceutskih proizvoda. Tradicionalno su se primjenjivali u procesima fermentacije. Dobro je poznata i iskorištena primjena kvasca *Saccharomyces cerevisiae* za proizvodnju etanola, uglavnom u proizvodnji alkoholnih pića (Cadete i sur., 2014).

Razvojem proizvodnje rekombinantnih proteina, metaboličkog inženjerstva i biološke sinteze te rastom potražnje za proizvodima koje kvasci mogu sintetizirati, dolazi do razvoja mnoštva novih područja primjena kvasaca. Tri su glavna područja primjene kvasca u modernoj biotehnologiji: proizvodnja metabolita, proizvodnja rekombinantnih proteina i *in vivo* biotransformacije (Mattanovich i sur., 2014). Na Slici 1. navedena su različita područja primjene kvasaca u biotehnologiji.



Slika 1. Različita područja primjene kvasaca u biotehnologiji (Johnson i sur., 2011).

2.2. Primjena lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biokemikalija i biogoriva

Sve veći interes za proizvodnjom ekološki prihvatljivih i održivih izvora energije javlja se zbog ograničenih rezervi nafte, klimatskih promjena, političkih nestabilnosti i ubrzanog rasta svjetske populacije koje dovode do povećane potražnje za hranom, gorivom i energijom (Johnson i sur., 2011).

Mikrobna proizvodnja biokemikalija i biogoriva iz različitih lignoceluloznih sirovina poput biomase iz komunalnog otpada, poljoprivrednog otpada, biljnih ostataka i industrijskog otpada predstavlja prihvatljiviju alternativu proizvodima dobivenim iz nafte (Lobs i sur., 2017; Wu i sur., 2017). Američko Ministarstvo energetike (*eng.* US Department of Energy, DOE) objavilo je listu kemikalija od značajnije važnosti koje se mogu proizvesti iz biomase, a koja uključuje etanol, arabitol, sukcinu kiselinu, mliječnu kiselinu i levulinsku kiselinu (Wu i sur., 2017).

Lignocelulozne sirovine obnovljive su sirovine i relativno lako dostupne u većim količinama, no jedan su od supstrata kojeg mikroorganizmi mogu najteže iskoristiti (Chen i Dou, 2016).

Lignoceluloza je heterogeni polimer s tri glavne komponente: celulozom, hemicelulozom i ligninom. Mikroorganizmi mogu koristiti monosaharide kao izvore ugljika i energije, ali ne mogu koristiti njihove polimerne oblike, celulozu ili hemicelulozu (Chen i Dou, 2016).

Primjena lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biokemikalija i biogoriva zahtjeva njihovu predobradu. Predobrada lignoceluloznih sirovina provodi se različitim postupcima, no najčešće se primjenjuju kiseline ili lužine. Takvom predobradom oslobađa se veliki broj inhibitora, poput slabih kiselina, furfurala i fenolnih spojeva. Također, biokemikalije i biogoriva mogu biti toksični za radne sojeve mikroorganizama (Mukherjee i sur., 2017; Chen i Dou, 2016). Poželjna svojstva radnih sojeva koji se primjenjuju u takvim procesima su sposobnost korištenja što većeg broja ugljikohidrata prisutnih u lignoceluloznim sirovinama, uz minimalnu obradu sirovina, visok prinos željenog proizvoda te otpornost prema inhibitorima i nepovoljnim uvjetima industrijskog procesa (Chen i Dou, 2016).

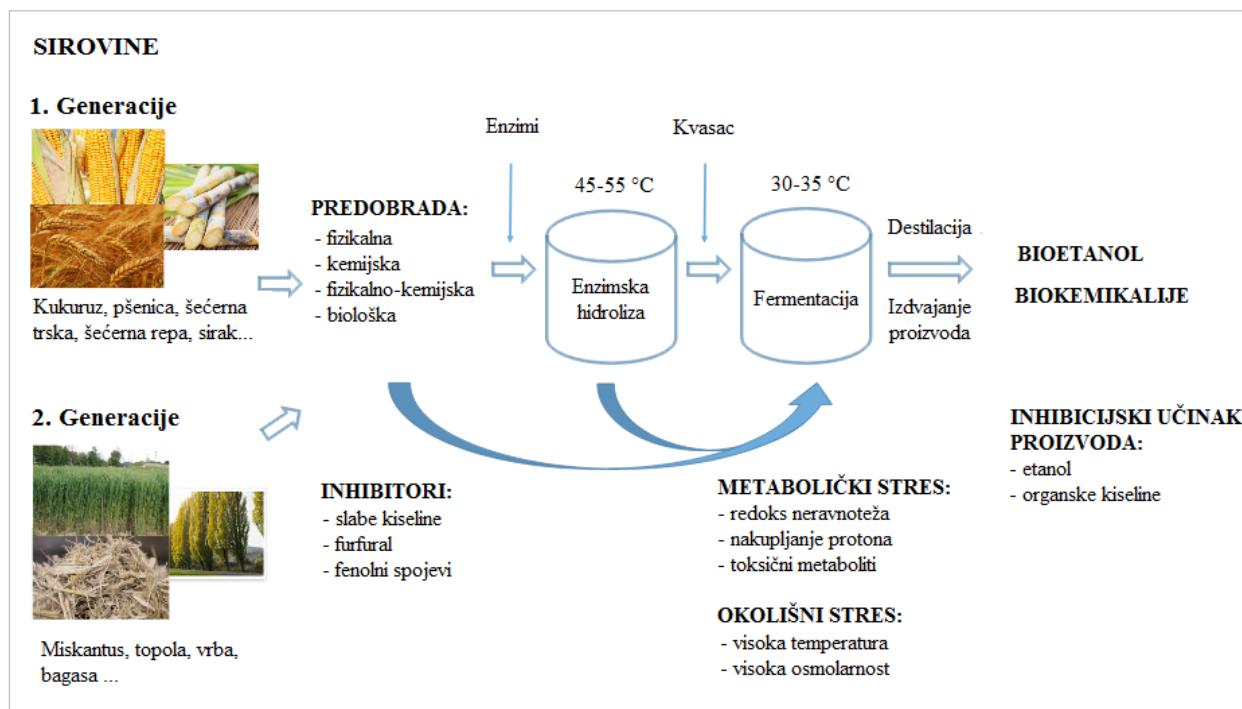
Sve veća pažnja usmjerava se prema bioetanolu kao vrijednoj alternativi benzinu jer bioetanol predstavlja obnovljiv i održiv izvor energije koji je učinkovit i siguran za okoliš

(Ferreira i sur., 2011). U proizvodnji bioetanola najčešće se primjenjuje kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Ovaj kvasac može rasti na jednostavnim šećerima poput glukoze ili disaharida saharoze, no ne može rasti na pentozama zbog čega nije pogodan za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina (Wu i sur., 2017; Ferreira i sur., 2011).

Mnogo je resursa uloženo u proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina. No, da bi takav proces postao kompetitivan procesu proizvodnje etanola iz kukuruznog škroba ili šećerne trske, nužno je postavljanje procesa koji je učinkovit, jeftin i u kojem dolazi do konverzije šećera iz celuloze i hemiceluloze u etanol. Konverzija šećera prisutnih u hemicelulozi predstavlja poseban izazov jer sadrži više različitih šećera, a to su L-arabinoza, D-galaktoza, D-glukoza, D-manoza i D-ksiloza. Upravo je zato nužno pronaći mikroorganizme koji će navedene ugljikohidrate konvertirati do etanola (Ferreira i sur., 2011).

Primjena kvasaca postaje sve važnija u procesu proizvodnje bioetanola druge generacije, zbog čega se javlja potreba za kvascima s visokom otpornošću prema stresnim uvjetima prisutnim u ovom procesu. Neka od poželjnih svojstava, osim fermentacije pentozama prisutnih u hemicelulozi (Ferreira i sur., 2011), su osmotolerantnost, otpornost na visoke temperature, visoke udjele etanola, otpornost na inhibitore prisutne u lignoceluloznom hidrolizatu, poput slabih kiselina, furfurala i fenolnih spojeva (Mukherjee i sur., 2017). Na Slici 2. shematski je prikaz postupka industrijske proizvodnje bioetanola i biokemikalija uz navedene potencijalne inhibitore procesa.

Također, postoji veliki broj kvasaca koji mogu uz etanol proizvesti, već i neke vrlo tražene kemikalije, poput 2,3-butandiola, octene kiseline, arabitola, limunske kiseline, glicerola, mliječne kiseline, pirogroždane kiseline, jantarne kiseline, etil acetata i jabučne kiseline. Dakle, razne vrste kvasaca proizvode različite metabolite te stoga imaju veliki potencijal u proizvodnji različitih bio-proizvoda fermentacijom različitih supstrata (Wu i sur., 2017).



Slika 2. Shematski prikaz postupaka industrijske proizvodnje bioetanol i biokemikalija iz sirovina 1. i 2. generacije primjenom kvasca uz navedene potencijalne inhibitore procesa. (Deparis i sur., 2017).

2.3. Ne-*Saccharomyces* kvasci i njihova primjena

Saccharomyces cerevisiae je jedna od najbolje poznatih vrsta kvasca s industrijskom primjenom. Proizvodnju bioetanol druge generacije karakteriziraju stresni uvjeti koji inhibiraju stanični metabolizam što dovodi do smanjenja prinosa etanola i brzine fermentacije. S druge strane, određene vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazuju veću otpornost prema navedenim stresnim uvjetima (Radecka i sur., 2015).

Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju veliki, ali slabo iskorišten izvor bioraznolikosti. Mnogi ne-*Saccharomyces* sojevi pokazuju svojstva bitna za industrijsku primjenu. Jedna od prednosti takvih kvasaca može biti to što su bolje prilagođeni stresnim uvjetima prisutnim u procesu proizvodnje bioetanol druge generacije (Mukherjee i sur., 2017), poput sposobnosti korištenja kompleksnih supstrata, veliku toleranciju prema stresnim uvjetima procesa i otpornost prema inhibitorima fermentacije (Radecka i sur., 2015).

U nepovoljnim uvjetima razvili su specifične mehanizme preživljavanja. Njihove evolucija tekla je neovisno o kvascu *S. cerevisiae* zbog čega se pretpostavlja da većina ne-*Saccharomyces* kvasaca ima nove i jedinstvene mehanizme koje *S. cerevisiae* ne posjeduje. Većina ne-*Saccharomyces* kvasaca u literaturi je opisana kao kvasci kvarenja jer su najčešće izolirani iz kontaminirane hrane i pića, no, napretkom tehnologije sekvencioniranja i molekularnog inženjerstva otvara se mogućnost otkrivanja molekularne osnove zbog koje ovi kvasci imaju superiornu otpornost prema tzv. nepovoljnim uvjetima (Radecka i sur., 2015). Do sada je opisano nekoliko tisuća vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca uz pretpostavku da veliki broj još nije otkriven. Geografski gledano, većina poznatih sojeva kvasca potječe iz područja zapadne Europe, Japana i Sjeverne Amerike, što još uvijek ostavlja mnoga prirodna staništa ovih vrsta u svijetu neistražena. Nekoliko ne-*Saccharomyces* vrsta kvasaca pokazalo je značajnu otpornost na stresne uvjete koja nije prisutna kod nijednog divljeg ili industrijskog *Saccharomyces* soja. Stresni uvjeti kojima su stanice kvasca izložene u različitim industrijskim procesima mogu biti visoke početne koncentracije šećera, visoke temperature, te prisutnost inhibitora poput octene kiseline i derivata furana. Veliku osmotolerantnost pokazao je kvasac *Zygosaccharomyces rouxii*, koji može rasti na koncentracijama šećera do 90 % (w/v). Kvasac *Kluyveromyces marxianus* značajan je soj zbog svoje velike termotolerantnosti. Zabilježeno je da raste na temperaturama od 47, 49 i 52 °C, te je proizvodio etanol na temperaturama iznad 40 °C. *Ogataea polymorpha* je još jedna vrsta kvasca koja može rasti na temperaturama višim od 50 °C. *Zygosaccharomyces bailii* vrsta je kvasca poznata po visokoj otpornosti na octenu kiselinu. Može rasti pri koncentraciji octene kiseline od 24 g L⁻¹, dok *S. cerevisiae* može rasti pri koncentraciji octene kiseline do 9 g L⁻¹ (Radecka i sur., 2015).

Glavni razlozi istraživanja raznolikosti ne-*Saccharomyces* sojeva kvasaca su otkrivanje molekularnih mehanizama odgovornih za otpornost na stresne uvjete i prijenos tih svojstva u industrijske sojeve kvasca *S. cerevisiae*. Ali i otkrivanje novih multitolerantnih sojeva koji mogu proizvoditi etanol zbog čega mogu imati potencijalnu primjenu u industriji (Mukherjee i sur., 2017).

Tablica 1. Uzgoj različitih ne-*Saccharomyces* kvasaca i proizvodnja etanola ili biokemikalija na jednostavnim ugljikohidratima i hidrolizatima lignoceluloznih sirovina.

Mikroorganizam	Sirovina/ supstrat	Način i uvjeti uzgoja	Proizvod	γ_P (g L ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	Pr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenca
<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS6054	Hidrolizat hemiceluloze divovske trske (lat. <i>Arundo donax</i> L.)	Uzgoj u tikvicama, mješanje 150 o/min, 30 °C, pH=6,0	Etanol	8,20	0,33	0,17	Scordia i sur., 2012
<i>Pachysolen tannophilus</i> DW06	Hidrolizat bagase šećerne trske (ksiloza 44,9, glukoza 16,1, arabinoza 4,6, celobioza 1,4 g L ⁻¹)	Bioreaktor s mješalom (V=1L), 150 o/min, 30 °C, pH=5	Etanol	21	0,35	0,59	Cheng i sur., 2007
<i>Pachysolen tannophilus</i> ATTC 32691	D-ksiloza (25 g L ⁻¹)	Šaržni uzgoj u reaktoru (V=2L), mješanje 500 o/min, 10-40 °C, pH=4,5	Etanol i ksilitol	-	Etanol: 0.39 Ksilitol: 0.14	Etanol: 0.06 kg/kg h Ksilitol: 0.0057 kg/kg h	Sanchez i sur., 2003
<i>Pachysolen tannophilus</i> MTTC 1077	Hidrolizat kukuruznog klipa	Uzgoj u tikvicama mješanje 200 o/min, 30 °C	Ksilitol	-	0,80	-	Ramesh i sur., 2013
<i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2	Hidrolizat bagase šećerne trske (16,4 g L ⁻¹ glukoze i ksiloze)	Bioreaktor s fluidiziranim slojem, 30 °C pH 5,5	Etanol	5,56	0,34	0,18	Antunes i sur., 2018

Tablica 1. Uzgoj različitih ne-*Saccharomyces* kvasaca i proizvodnja etanola ili biokemikalija na jednostavnim ugljikohidratima i hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (nastavak).

Mikroorganizam	Sirovina/ supstrat	Način i uvjeti uzgoja	Proizvod	γ_P (g L ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	Pr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenca
<i>Scheffersomyces shehatae</i> 20BM-3	L-arabinoza 17,5 g L ⁻¹	Uzgoj u tikvicama, mješanje 150 o/min, 32 °C, pH=4	Arabitol	6,2	0,35	0,064	Kordowska-Wiater i sur., 2017
<i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2	Hidrolizat bagase šećerne trske (30 g L ⁻¹ ksiloze)	Uzgoj u tikvicama sa stanicama imobiliziranim u kalcijevom alginatu, mješanje 150 o/min, 30°C	Etanol	-	0,31	0,12	Antunes i sur., 2016
<i>Kluyveromyces marxianus</i> MTCC 1288	Sirova sirutka (35 g L ⁻¹ laktoze)	Uzgoj u tikvicama, anaerobni mješač, 500 o/min, 34 °C, pH=4.5	Etanol	2,10	0,06	0,095	Zafar i Owais, 2006
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IPE453	Hidrolizat bagase šećerne trske (30 g L ⁻¹ ksiloze)	Šaržni uzgoj, aeracija, mješanje 200 o/min, 45 °C, pH= 4.5,	Ksilitol	11,1	0,315	0,193	Dasgupta i sur., 2017

* γ_P masena koncentracija produkta,

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

*Pr – produktivnost

2.4. Utjecaj slabih organskih kiselina na rast i aktivnost kvasca

Mikroorganizmi su prilagođeni optimalno funkcionirati u njihovom normalnom fiziološkom okruženju. Bilo kakva ekstremna promjena okolišnih uvjeta u odnosu na optimalne izazvat će stres organizmu. Raspon promjene odredit će hoće li mikroorganizam odumrijeti, prestati rasti ili imati produljeno vrijeme lag faze i smanjenu brzinu rasta (Beales i sur., 2004).

Slabe organske kiseline su prirodni spojevi koji se komercijalno koriste kao konzervansi u industriji hrane i pića. Postoji niz teorija koje objašnjavaju antimikrobna svojstva tih slabih kiselina, ali točan mehanizam još uvijek nije poznat (Ullah i sur., 2012).

Proučavan je utjecaj slabih organskih kiselina na rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Pokazalo se da slabe organske kiseline poput octene i mliječne inhibiraju rast kvasaca. Inhibicijski učinak ovisi o pH vrijednosti podloge, konstanti disocijacije kiseline (pK_a) i molarnoj koncentraciji kiseline. Inhibicijski učinak izraženiji je pri nižim pH vrijednostima (Narendranath i sur., 2001). Slabe kiseline mogu biti nabijene ili nenabijene ovisno jesu li u protoniranom ili disociranom obliku što ovisi o njihovoj pK_a vrijednosti i pH vrijednosti okoline (Hirshfield i sur., 2003). Pri nižem pH okoline povećan je udio nedisociranih molekula. Nedisocirane kiseline pasivnom difuzijom ulaze u stanice u kojima onda disociraju, pri višoj intracelularnoj pH vrijednosti. Oslobađaju se nabijeni anioni i protoni koji uzrokuju smanjenje pH citoplazme. Kod mliječne kiseline oslobađa se velika koncentracija aniona koja bi mogla utjecati na sveukupni metabolizam kvasca. Oslobodeni protoni izbacuju se iz stanice u zamjenu za katione ili se neutraliziraju djelovanjem puferskog kapaciteta citoplazme (Narendranath i sur., 2001).

Pretpostavlja se da slabe kiseline inhibiraju rast kvasca jer uzrokuju: disrupciju membrane; pad intracelularne pH vrijednosti zbog disocijacije kiselina, koja onda inhibira osnovne metaboličke reakcije ili direktno inhibira ključne stanične enzime, poput inhibicije enzima glikolize i NADH dehidrogenaze (Radecka i sur., 2015); stresno djelovanja intracelularnog pH na homeostazu; i akumulaciju toksičnih aniona (Narendranath i sur., 2001).

Također, pretpostavlja se da slabe kiseline kod kvasca induciraju energetske zahtjevne reakcije kojima se nastoji održati homeostaza, što smanjuje količinu energije (ATP-a)

dostupnog za rast i ostale metaboličke funkcije (Narendranath i sur., 2001). Posljedično, niski intracelularni pH inhibira rast kvasca, produžuje lag fazu i smanjuje proizvodnju etanola (Radecka i sur., 2015).

Otpornost na slabe kiseline ključna je osobina industrijskih sojeva kvasaca koji se primjenjuju za proizvodnju bioetanola druge generacije. Prilikom kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina, slaba kiselina koja se oslobađa u najvećim količinama je octena kiselina. Stoga je za industrijsku proizvodnju bioetanola nužan razvoj robusnih sojeva otpornih na slabe kiseline (Radecka i sur., 2015).

Postoje kvasci koji mogu rasti pri takvim nepovoljnim uvjetima, primjer je kvasac *Zygosaccharomyces bailii*. Osim što se može prilagoditi visokim temperaturama i viskom koncentracijama šećera, može rasti pri pH vrijednosti od 2 jedinice, pokazuje veću otpornost na octenu kiselinu u odnosu na kvasac *S. cerevisiae*. Visoka otpornost kvasca *Z. bailii* na octenu kiselinu povezana je s različitim mehanizmima, jedan od kojih je mogućnost simultane potrošnje octene kiseline i glukoze. Također, pretpostavlja se da *Z. bailii* u prisutnost octene kiseline ima mogućnost održavanja odgovarajućeg intracelularnog pH i ima sposobnost prerasporediti lipidni sastav. Zbog navedenih svojstva *Z. bailii* je predložena kao pogodan domaćin za proizvodnju heterolognih proteina i organskih kiselina (Radecka i sur., 2015).

2.5. Mliječna kiselina

2.5.1. Primjena mliječne kiseline

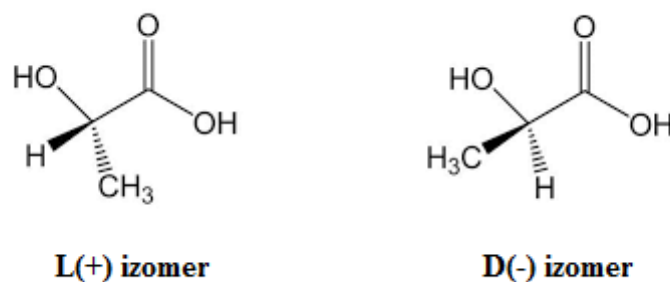
Mliječna kiselina (2-hidroksipropanska kiselina, $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-COOH}$) prirodna je organska kiselina sa širokom primjenom (Abdel-Rahman i sur., 2011). Važna je i svestrana kemikalija koja se koristiti kao sredstvo za zakiseljavanje, pojačivač okusa i konzervans u prehrambenoj, farmaceutskoj, kožnoj i tekstilnoj industriji, za proizvodnju baznih kemikalija i u mnogim drugim kemijskim industrijama (Wang i sur., 2015; Okano i sur., 2010).

U kozmetičkoj industriji, mliječna kiselina se zbog hidratantnog, antimikrobnog i pomlađujućeg učinka na kožu primjenjuje za proizvodnju higijenskih i estetskih proizvoda. Derivati mliječne kiseline poput estera laktata imaju široku primjenu zbog svojih

higroskopskih svojstva i sposobnosti stvaranja emulzija. U farmaceutskoj industriji primjenjuju se kao dodatak u sintezi dermatoloških lijekova i lijekova protiv osteoporoze. Otprilike 70 % proizvedene mliječne kiseline primjenjuje se u prehrambenoj industriji zbog svoje uloge u proizvodnji jogurta i sireva (Castillo Martinez i sur., 2013).

Također, proizvodnja mliječne kiseline privlači sve veću pažnju jer se može primijeniti kao sirovina za proizvodnju polimera mliječne kiseline (PLA) (Wang i sur., 2015), polimera s obećavajućom primjenom kao biorazgradiva, biokompatibilna i ekološki prihvatljiva alternativa polimerima iz petrokemijske industrije (Abdel-Rahman i sur., 2011).

Mliječna kiselina u prirodi pojavljuje se kao dva optička izomera, D-(-) i L-(+) mliječna kiselina (Slika 3.). U prehrambenoj i farmaceutskoj industriji koristi se L-(+) mliječna kiselina jer se u takvom obliku može asimilirati i razgraditi u ljudskom tijelu (Wang i sur., 2015).



Slika 3. Strukture D-(-) i L-(+) izomera mliječne kiseline (Anonymus 1.).

2.5.2. Proizvodnja mliječne kiseline

Mliječna kiselina može se proizvoditi kemijskom sintezom ili biotehnološki mikrobnom fermentacijom (Wang i sur., 2015). Kemijska sinteze iz petrokemijskih sirovina uvijek rezultira recemičnom smjesom D i L- mliječne kiseline, što je glavni nedostatak ovog procesa (Abdel-Rahman i sur., 2011). S druge strane, biotehnološkom proizvodnjom mikrobnom fermentacijom može se dobiti optički čista D ili L- mliječna kiselina (Wang i sur., 2015).

Glavne prednosti proizvodnje mliječne kiseline mikrobnom fermentacijom su mogućnost upotrebe obnovljivih sirovina i dostupnost širokog raspona jeftinih sirovina, niske temperature procesa, mali energetske zahtjevi i proizvodnja mliječne kiseline visoke optičke čistoće, ovisno o odabranom radnom mikroorganizmu (Juturu i Wu, 2016; Abdel-Rahman i sur., 2011). Trenutno, oko 90 % mliječne kiseline proizvodi se mikrobnom fermentacijom (Wang i sur., 2015).

2.5.3. Mikroorganizmi primijenjeni u biotehnoškoj proizvodnji mliječne kiseline

Mliječnu kiselinu mogu proizvoditi razne mikrobne vrste uključujući bakterije, plijesni, kvasce, mikroalge i cijanobakterije. Izbor mikroorganizma vrlo je bitan jer svaki od navedenih donosi određenu prednost poput šireg raspona supstrata koji se mogu koristiti, povećanog prinosa i produktivnosti, smanjenih nutritivnih zahtjeva ili povećane optičke čistoće mliječne kiseline (Juturu i Wu, 2016; Abdel-Rahman i sur., 2013) kao i otpornosti na visoke koncentracije mliječne kiseline što omogućuje vođenje procesa proizvodnje mliječne kiseline bez regulacije pH vrijednosti podloge. Vođenje procesa proizvodnje mliječne kiseline bez regulacije pH vrijednosti pridonosi manjem utrošku sredstva za regulaciju pH vrijednosti podloge, jednostavnijim postupcima izdvajanja i pročišćavanja konačnog proizvoda i u konačnici smanjenju troškova cjelokupnog procesa proizvodnje mliječne kiseline (Valli i sur., 2006).

Bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu uključuju divlje tipove i genetički modificirane sojeve. Mogu se podijeliti u 4 skupine, a to su: bakterije mliječne kiseline (BMK), *Bacillus* sojevi, *Escherichia coli* i *Corynebacterium glutamicum* (Abdel-Rahman i sur., 2013). Mliječnu kiselinu proizvode i filamentozne plijesni, poput *Rhizopus sp.*, *R. oryzae* (Juturu i Wu, 2016). Divlji kvasci ne posjeduju metabolički put za proizvodnju mliječne kiseline (Juturu i Wu, 2016). No, različiti rodovi kvasca, zbog mogućnosti rasta pri niskim pH vrijednostima i u prisutnosti povišenih koncentracija slabih organskih kiselina, podvrgnuti su genetičkom modifikacijama u svrhu proizvodnje sojeva producenata mliječne kiseline, a neki od primijenjenih rodova kvasaca su: *Saccharomyces*, *Zygosacchomyces*, *Candida*, *Pichia* i *Kluyveromyces* (Abdel-Rahman i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu, kao radni mikroorganizmi, korišteni su kvasci navedeni u Tablici 2. iz zbirka mikroorganizama: Japan Collection of Microorganisms (JCM, Japan), Centraalbureau voor Schimmelcultures, Filamentous fungi and Yeast Collection (CBS, Nizozemska), NBRC Culture Collection (NBRC, Japan), ZIM Collection of Industrial Microorganisms (ZIM, Slovenija) i Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University (DMKU, Tajland).

Tablica 2. Popis radnih mikroorganizama, uz navedeno mjesto izolacije svakog soja.

Mikroorganizam	Izoliran iz:	Referenca
<i>Scheffersomyces stipitis</i> JCM 10742	Ličinka insekta, Francuska	Anonymus 2
<i>Scheffersomyces lignosum</i> JCM 9837	Trulo drvo, Čile	Anonymus 3
<i>Scheffersomyces shehatae</i> JCM 9840	Trulo borovo drvo, Kalifornija, SAD	Anonymus 4
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777	Tlo, Japan	Anonymus 5
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042	Tlo, Tajland	Anonymus 6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712	Nije poznato	Anonymus 7
<i>Pachysolen tannophilus</i> JCM 31685	Ekstrakt kestena <i>Castanea vesca</i> , Francuska	Anonymus 8
<i>Schwaniomyces polymorphus</i> ZIM 2980	Tlo, Slovenija	-

3.1.2. Kemikalije

Popis, čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu za pripremu hranjivih podloga i otopina naveden je u Tablici 3.

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

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
Pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fisher BioReagents, SAD
YPD broth	za upotrebu u biotehnologiji	Fisher BioReagents, SAD
Agar	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
D-(+)-Celobioza	> 98 %	Molekula, UK
D-(+)-Ksiloz	99+ %	Acros Organics, SAD
L-(+)-Arabinoza	99 %	Acros Organics, SAD
D-(+)-Manoza	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD
D-(+)-Galaktoza	99+ %	Acros Organics, Kina
glukoza monohidrat	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov sulfat 7-hidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
DL-Mliječna kiselina	85 %	Sigma-Aldrich,SAD
Sumporna kiselina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka
Orto-fosforna kiselina	za HPLC, 85-90 %	Sigma-Aldrich,SAD

3.1.3. Hranjive podloge

Čiste kulture kvasca održavane su na čvrstim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Hranjive podloge za održavanje kultura sadržavale su 50 g L⁻¹ YPD podloge i 20 g L⁻¹ agra. YPD podloga sastoji se od kvašćevog ekstrakta, peptona i glukoze u omjeru 1:2:2.

Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma bila je YPD podloga standardnog sastava.

Hranjive podloge koje su se koristile za određivanje rasta i aktivnosti kvasaca na različitim ugljikohidratima sadržavale su 10 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta, 20 g L^{-1} peptona i 20 g L^{-1} odgovarajućeg ugljikohidrata. Ugljikohidrati koje smo koristili bili su celobioza, ksiloza, arabinoza, manoza, glukoza, galaktoza. Pripravljena je i hranjiva podloga bez glavnog izvora ugljika, a sastojala se od 10 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta, 20 g L^{-1} peptona.

Hranjive podloge koje su se koristile za određivanje inhibitornog utjecaja mliječne kiseline na rast i aktivnost kvasaca bila je standardna YPD agar podloga s dodatkom mliječne kiseline u koncentracijama od 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 g L^{-1} .

Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provodili smo u standardnoj YPD podlozi i YPD podlozi u koju je dodana mliječna kiselina u koncentraciji od 60 g L^{-1} .

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10AD_{VP}), otplinjača (DGU-14A), automatskog uzorkivača i injektora (SIL-10 AD_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A_{VP}), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (SupelcogelTM C-610H; $30 \text{ cm} \times 7,8 \text{ mm ID}$, $9 \mu\text{m}$) s predkolumnom (SupelcogelTM H; $5 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm ID}$, $9 \mu\text{m}$), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19A_{VP}) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je $20 \mu\text{L}$, a protok mobilne faze $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

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

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), sastoji se od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija $150 \times 7,8 \text{ mm}$ s odgovarajućim predkolumnama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za

kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL , a protok mobilne faze (0,0025 M H_2SO_4) 0,6 mL min^{-1} .

3.1.4.3. Ostala aparatura

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija);
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20 μm , 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- tresilica Certomat RM B.Braun Biotech International, Njemačka

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprava hranjivih podloga

Kvasci korišteni u ovom radu, navedeni u Tablica 2., čuvani su na čvrstim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Čvrste hranjive podloge pripremljene su tako što se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana masa YPD podloge (50 g L^{-1}) i agra (20 g L^{-1}). Zatim smo hranjivu podlogu sterilizirali u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta i prelili u Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima. Na ohlađenu hranjivu podlogu nacijepnjene su kulture kvasca pomoću mikrobiološke ušice.

Podloge za uzgoj inokuluma pripremljene su tako što se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana količina YPD podloge (50 g L^{-1}). Po 10 mL podloge prebačeno je u epruvete i sterilizirano u autoklavu ($121^\circ\text{C}/20 \text{ min}$). Tako pripremljena podloga služila je za uzgoj inokuluma prilikom određivanja rasta i aktivnosti kvasaca na različitim ugljikohidratima.

Hranjive podloge za uzgoj kvasca na različitim ugljikohidratima pripremljene su iz zajedničke koncentrirane otopine kvašćevog ekstrakta i peptona ($\gamma_{\text{KV. EKSTRAKT}} = 20 \text{ g L}^{-1}$ i $\gamma_{\text{PEPTON}} = 40 \text{ g L}^{-1}$) i koncentriranih otopina pojedinačnih ugljikohidrata ($\gamma_{\text{UH}} = 40 \text{ g L}^{-1}$). Po 7,5 mL pripremljene otopine kvašćevog ekstrakta i peptona i po 7,5 mL otopine ugljikohidrata preneseno je u Falcon kivetu od 50 mL u kojoj je konačna koncentracija kvašćevog ekstrakta iznosila 10 g L^{-1} , peptona 20 g L^{-1} i određenog ugljikohidrata 20 g L^{-1} . Za uzgoj odabranog kvasca pripremljeno je po 7 hranjivih podloga od kojih je svaka sadržavala kvašćev ekstrakt, pepton i određeni ugljikohidrat (celobiozu, glukozu, manozu, galaktozu, ksilozu ili arabinozu). Tako pripremljene podloge sterilizirane su na 121°C tijekom 20 minuta.

Inhibitorski utjecaj mliječne kiseline na rast i aktivnost kvasaca proveden je na standardnim YPD agar podlogama. Tako pripremljene podloge su zatim sterilizirane, a nakon što su se malo ohladile u njih je u sterilnim uvjetima dodan izračunati volumen mliječne kiseline kako bi se dobile podloge s različitim koncentracijama mliječne kiseline (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 g L^{-1}). Nakon toga podloge su u sterilnim uvjetima prelivene u Petrijeve zdjelice i ostavljene da se ohlade.

Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 proveden je u tekućim YPD podlogama. Podloge su prvo sterilizirane, a mliječna kiselina dodana je nakon hlađenja. Koncentracija mliječne kiseline iznosila je 60 g L^{-1} .

3.2.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima

Selekcija ne-*Saccharomyces* kvasaca provedena je određivanjem rasta i aktivnosti odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca (Tablica 2.) na različitim ugljikohidratima. Korišteni ugljikohidrati bili su celobioza, glukoza, manoza i galaktoza, te ksiloza i arabinoza. Uzgoj kvasaca proveden je u tekućim hranjivim podlogama pripremljenim kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.

Svaki kvasac uzgajan je na 7 različitih podloga koje su sadržavale prethodno navedene ugljikohidrate i u podlozi bez glavnog izvora ugljika. Sve hranjive podloge ($V = 15 \text{ mL}$) inokulirane su s 5 % vol/vol inokuluma. Inokulum je pripremljen nacjepljivanjem prethodno pripremljenih tekućih hranjivih podloga u epruvetama, koje su onda inkubirane pri 28 °C kroz 24 h.

Uzgoj kvasaca provedeni su u aerobnim i anaerobnim uvjetima kroz 48 h pri 28 °C . Aeroban uzgoji su provedeni na tresilici ($n = 200 \text{ min}^{-1}$), a anaerobni/mikroaerofilni uzgoji statično. U izuzetim uzorcima određivana je optička gustoća uzoraka, koncentracija biomase kvasca te su se supernatanti uzoraka pripremali za HPLC ili UPLC analizu.

3.2.3. Određivanje inhibitornog utjecaja mliječne kiseline na rast i aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca

Inhibicijski utjecaj mliječne kiseline na rast kvasca, navedenih u Tablici 2., ispitivan je na čvrstim hranjivim podlogama s različitim koncentracijama mliječne kiseline pripremljenima kao što je navedeno u poglavlju 3.2.1. Podloge su sadržavale 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 g L^{-1} mliječne kiseline, a podloga koje je služila kao kontrola nije sadržavala mliječnu kiselinu.

Na svaku od podloga naneseo je 5 μ L suspenzije stanica kvasca koju smo pripremili tako što smo u 500 μ L sterilne vode resuspendirali biomasu kvasca. Pratili smo rast kvasca u aerobnim i anaerobnim uvjetima pri 28 °C kroz 72 h.

3.2.4. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Inokulum za uzgoj *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 pripremljen je u YPD podlozi (V = 200 mL) pri 28 °C kroz 24 h.

Uzgoj kvasca proveden je u hranjivim podlogama s mliječnom (V = 300 mL) i bez mliječne kiseline (V = 300 mL) pripremljenima kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Tikvice su inokulirane s 5% vol/vol inokuluma. Uzgoj je proveden u anaerobnim uvjetima, u tikvicama s vreljnjačama na magnetnoj miješalici pri 28 °C. Uzorci za analizu uzimani su prije inokulacije te nakon inokulacija svaki sat uzgoja do 8 h uzgoja, a nakon toga svakih 24 h uzgoja. Uzgoj kvasca u hranjivim podlogama bez mliječne kiseline trajao je 49 h, a u hranjivim podlogama s mliječnom kiselinom 121 h. U izuzetim uzorcima određivana je optička gustoća pri 600 nm, koncentracija biomase kvasca te je UPLC analizom određena koncentracija supstrata i produkata fermentacije.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka

Optička gustoća uzoraka određivana je pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}). Mjerena je optička gustoća prvog decimalnog razrjeđenja uzorka. Prvo decimalno razrjeđenje pripremalo se tako da je 0,5 mL originalnog uzorka otpipetirano u 4,5 mL demineralizirane vode, te zatim dobro homogenizirano.

3.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca

Nakon izuzimanja uzorka, određen volumen uzoraka prenesen je u prethodno izvagano plastičnu kivetu s čepom te je zatim stavljen na centrifugiranje 5 minuta pri 6000 okretaja/min (centrifuga SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen, a talog je stavljen na sušenje u sušionik pri 100°C do konstantne mase. Nakon toga kivete su ohlađene u eksikatoru te im je izvagana masa. Koncentracije biomase kvasca X (g/L) određena je prema sljedećoj ovisnosti:

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad (g L^{-1}) \quad [3-1]$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom [g]

m_{pk} - masa prazne kivete [g]

V_{uz} - volumen uzorka [L]

3.3.3. Priprema uzoraka za HPLC i UPLC analizu

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (poglavlje 3.3.2.) korišten je za pripremu uzoraka za HPLC i UPLC analizu. Po 750 μ L supernatanta uzorka dodano je u 750 μ L otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g L⁻¹. Dobivena otopina zatim se intenzivno izmiješala 20 sekundi i ostavila na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10000 o/min. Centrifugiranjem su istaloženi proteini i nečistoće. Tako dobiven uzorak zatim je razrijeđen tako što smo 750 μ L uzorka dodali u 750 μ L demineralizirane vode. Uzorci izuzimani tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlogama s mliječnom kiselinom dodatno su razrjeđivani još 2 puta. Razrijeđeni uzorci su zatim profiltrirani kroz filter s porama veličine 0,20 μ m. Tako pripremljeni uzorci korišteni su za HPLC i UPLC analizu.

3.4. Određivanje parametara uspješnosti

3.4.1. Prinos biomase (Y_X)

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

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

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

3.4.2. Prinos produkta (Y_P)

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

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

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

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

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

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

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

(Marić i Šantek, 2009).

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

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

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

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

(Marić i Šantek, 2009).

3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_s)

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

3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_p)

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

3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)

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

3.4.8. Produktivnost (Pr)

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

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

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

t_U - ukupno vrijeme bioprocasa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je uzgoj 8 ne-*Saccharomyces* kvasaca u podlogama u kojima su kao glavni izvor ugljika korišteni različiti ugljikohidrati koji su prisutni u lignoceluloznim sirovinama te su određeni glavni produkti metabolizma ovih kvasaca. Za provođenje eksperimenata odabrani su kvasci iz roda *Scheffersomyces* (*Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, *Scheffersomyces lignosum* JCM 9837, *Scheffersomyces shehatae* JCM 9840), *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, *Kluyveromyces marxianus* CBS 712), kvasac *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 i kvasac *Schwaniomyces polymorphus* ZIM 2980. Ugljikohidrati na kojima je ispitivan rast i aktivnost ovih ne-*Saccharomyces* kvasaca bili su celobioza, glukoza, galaktoza, i manoza, te ksiloza i arabinoza. Određen je i inhibitorski učinak različitih koncentracija mliječne kiseline na rast i aktivnost istraživanih kvasaca. Kvasci koji mogu rasti i proizvoditi etanol u podlozi s visokom koncentracijom mliječne kiseline dobri su kandidati za genetičke transformacije u sojeve proizvođače mliječne kiseline. Na temelju provedenih eksperimenata kvasac s najvećom otpornošću prema povišenim koncentracijama mliječne kiseline odabran je za uzgoj u većem mjerilu. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provedli smo u hranjivim podlogama s i bez mliječne kiseline, radi usporedbe dinamike rasta na navedenim podlogama.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- a) Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima (poglavlje 4.1.)
- b) Određivanje inhibitorskog utjecaja mliječne kiseline na rast i aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca (poglavlje 4.2.)
- c) Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s i bez mliječne kiseline (poglavlje 4.3.)

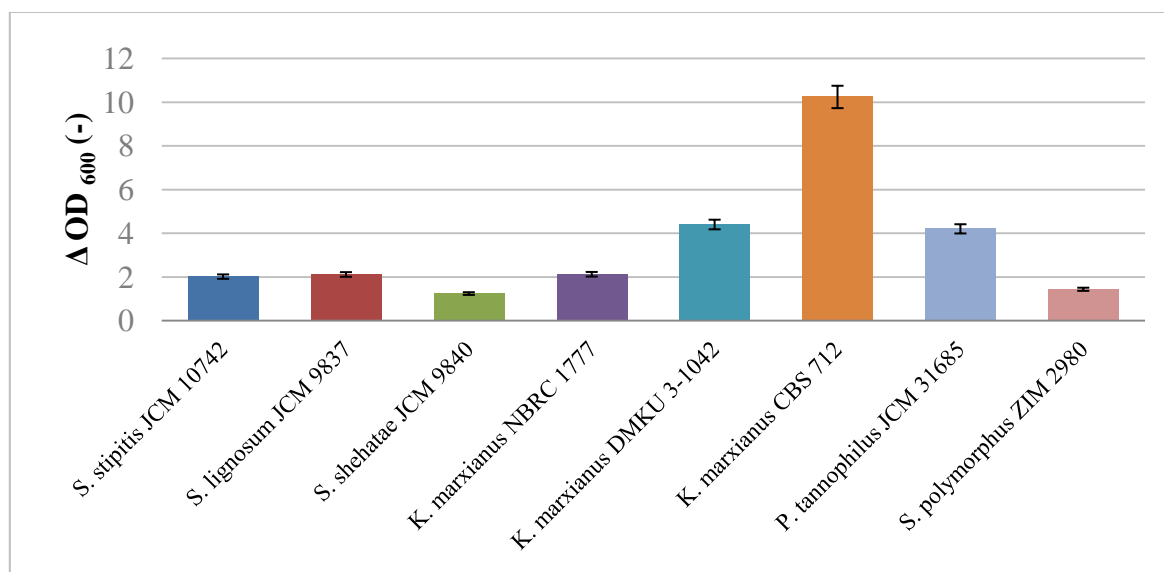
4.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na različitim ugljikohidratima

Određivanje rasta i aktivnost kvasaca provedeno je u različitim hranjivim podlogama (YP podloga) koje su, osim kvašćevog ekstrakta (10 g L^{-1}) i peptona (20 g L^{-1}), sadržavale jedan od sljedećih ugljikohidrata kao glavni izvor ugljika: celobiozu, glukozu, galaktozu, manozu, ksilozu ili arabinozu u koncentraciji od 20 g L^{-1} . Proveden je uzgoj ovih kvasaca i u podlozi bez glavnog izvora ugljika (YP podloga; kvašćev ekstrakt i pepton; podaci nisu prikazani), te je služio kao „negativna“ kontrola zbog visokog sadržaja kvašćevog ekstrakta koji može sadržavati od 6 do 16 % ugljikohidrata (Anonymus 9.). Naime, u YP podlozi dolazi do rasta kvasca na ugljikohidratima dostupnim u kvašćevom ekstraktu kao i na ugljikohidratima koje se nalaze u stanicama kvasca (glikogen i trehaloza; Francois i Parrou, 2001). Svi uzgoji su prevedeni u aerobnim i anaerobnim uvjetima pri $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 48 h. Rast biomase kvasca praćen je mjerenjem optičke gustoće uzoraka pri 600 nm (OD_{600} ; poglavlje 3.3.1.). Također, HPLC i UPLC analizom (poglavlje 3.3.3.) određene su koncentracije supstrata i produkata poput etanola, glicerola, ksilitola i arabitola. Rezultati ovog ispitivanja podijelili smo na određivanje metaboličke aktivnosti kvasaca na celobiozi (poglavlje 4.1.1.), na heksozama (poglavlje 4.1.2.) i na pentozama (poglavlje 4.1.3.)

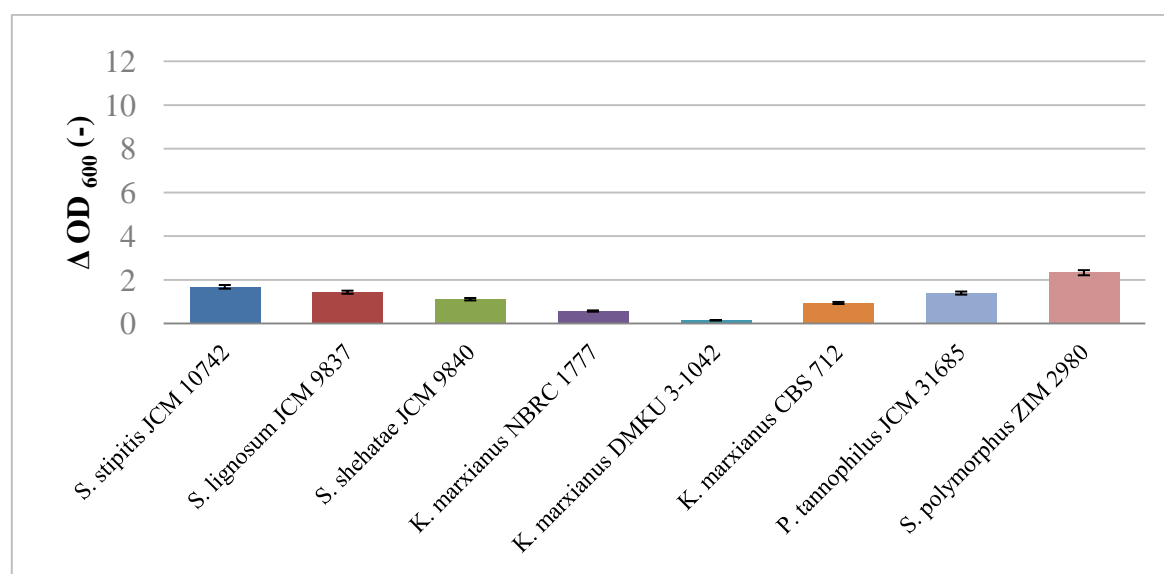
4.1.1. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na celobiozi

Celobioza je disaharid koji može nastati tijekom enzimske hidrolize lignoceluloznih sirovina, a ima inhibitorni učinak na celulolitičke enzime, te tako smanjuje uspješnost hidrolize (Ferchak i Pye, 1983). Rast kvasaca na ovom ugljikohidratu tijekom procesa simultane hidrolize lignocelulozne sirovine i fermentacije nastalih ugljikohidrata povećao bi iskorištenje cijelog procesa. Stoga je bilo potrebno odrediti rast i aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca na celobiozi.

Na Slikama 4. i 5. prikazana je promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s celobiozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim, odnosno anaerobnim uvjetima.



Slika 4. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s celobiozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima pri 28°C.



Slika 5. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s celobiozom nakon 48 h uzgoja u aneobnim uvjetima pri 28°C.

Tablica 4. Postotak utrošene celobioze i koncentracije proizvedenog etanola i glicerola nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlogama s celobiozom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima

Kvasac	Aerobno					Anaerobno				
	Utrošena celobioza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{Etanol/S} (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol/S} (g g ⁻¹)	Utrošena celobioza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{Etanol/S} (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol/S} (g g ⁻¹)
<i>S. stipitis</i> JCM 10742	7,65	0,25	0,16	n.o.	-	8,98	n.o.	-	0,30	0,17
<i>S. lignosum</i> JCM 9837	4,60	0,03	0,03	0,15	0,16	7,41	n.o.	-	0,27	0,18
<i>S. shehatae</i> JCM 9840	4,05	0,03	0,04	0,39	0,48	20,19	n.o.	-	0,27	0,07
<i>K. marxianus</i> NBRC 1777	2,80	0,03	0,05	0,16	0,29	10,28	0,03	0,01	0,36	0,18
<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	3,95	0,22	0,28	0	-	7,41	1,42	0,96	0,31	0,21
<i>K. marxianus</i> CBS 712	42,80	0,66	0,08	0,29	0,03	12,50	n.o.	-	0,34	0,14
<i>P. tannophilus</i> JCM 31685	4,60	0,03	0,03	0	-	n.o.	n.o.	-	0,12	-
<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980	10,20	0,03	0,01	0,02	0,01	13,38	n.o.	-	0,21	0,08

n.o.-nije određeno

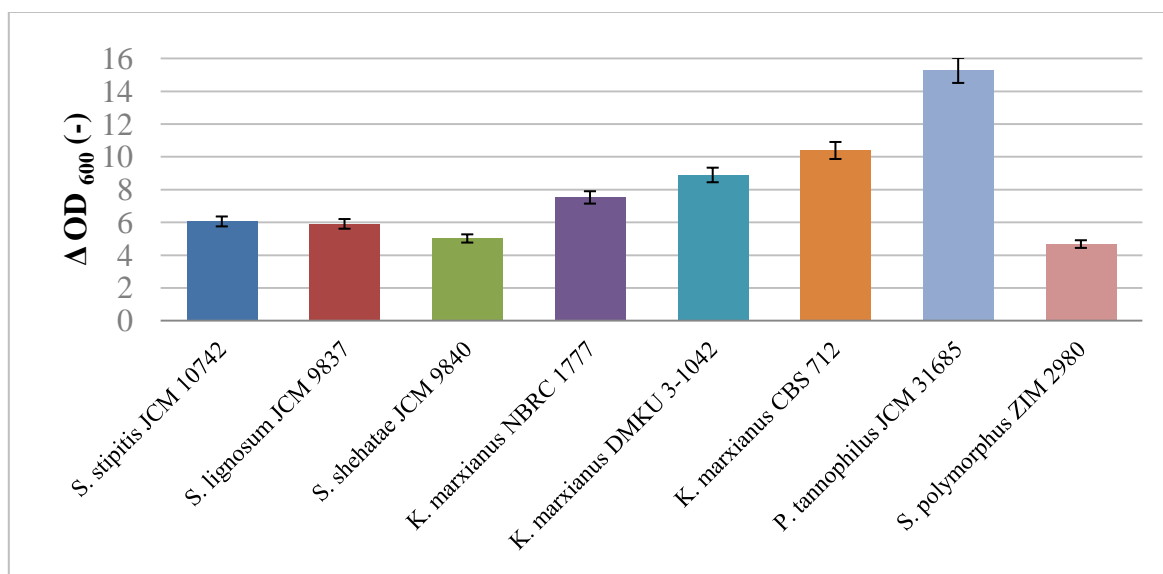
Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da svi navedeni kvasci mogu rasti na celobiozi u aerobnim uvjetima, ali da niti jedan od istraživanih kvasaca nije tijekom 48 h uzgoja utrošio svu celobiozu iz podloge. Kvasac koji je utrošio najviše celobioze, između testiranih kvasaca, iz YP podloge (42,80 %) u aerobnim uvjetima i proizveo najviše biomase je kvasac *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 (Slika 4.). Ostali testirani kvasci (Slika 4.) rastu vrlo sporo na celobiozi u navedenim uvjetima, te su utrošili od 2,80 do 10,20 % celobioze iz podloge. Svi testirani kvasci u anaerobnim uvjetima rastu vrlo sporo, te nisu utrošili svu celobiozu iz podloge (Tablica 4.). Glavni produkti nastali tijekom rasta u aerobnim i anaerobnim uvjetima bili su etanol i glicerol, čije su koncentracije navedene u Tablici 4. Tijekom uzgoja HPLC/UPLC metodama nije detektirana proizvodnja šećernih alkohola ili drugih biokemikalija.

4.1.2. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca u podlogama s glukozom, galaktozom ili manozom

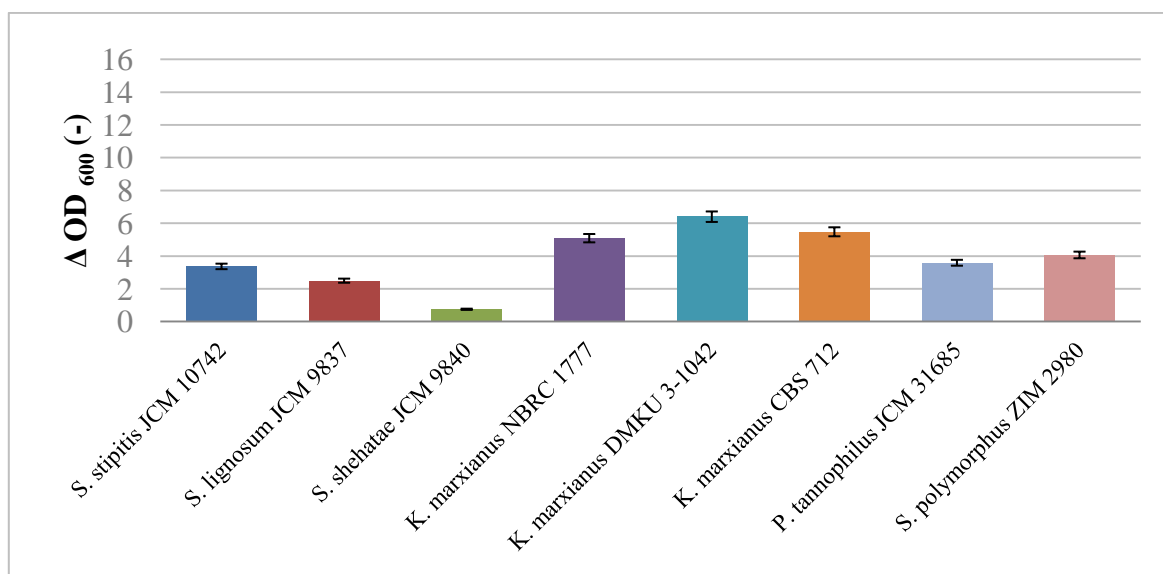
Rast i aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca određivana je i na glukozu, galaktozi i manozi kao glavnom izvoru ugljika u YP podlogama. Na slikama 6. i 7. prikazan je porast biomase kvasca kao promjena optičke gustoće podloge (ΔOD_{600}) nakon 48 h uzgoja kvasaca u podlozi s glukozom u aerobnim, odnosno anaerobnim uvjetima. Tijekom 48 h uzgoja svi testirani kvasci su iscrpili glukozu iz podloge (Tablica 5.). Najviše biomase tijekom uzgoja u YP podlozi s glukozom u aerobnim uvjetima određeno je za kvasac *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 i kvasac *K. marxianus* CBS 712 (Slika 6.).

Za razliku od aerobnog uzgoja tijekom anaerobnog uzgoja kvasci iz roda *Kluyveromyces* proizveli su veće količine biomase (Slika 7.) od kvasca *P. tannophilus* JCM 31685, te su utrošili svu glukozu iz podloge (Tablica 5.). Ostali testirani kvasci utrošili su od 40 do 70 % glukoze iz podloge tijekom 48 h uzgoja (Tablica 5.)

Tijekom uzgoja navedenih ne-*Saccharomyces* kvasaca na glukozu detektirani su etanol, glicerol i arabitol, čije su koncentracije navedene u Tablici 5.



Slika 6. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s glukozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima pri 28°C.



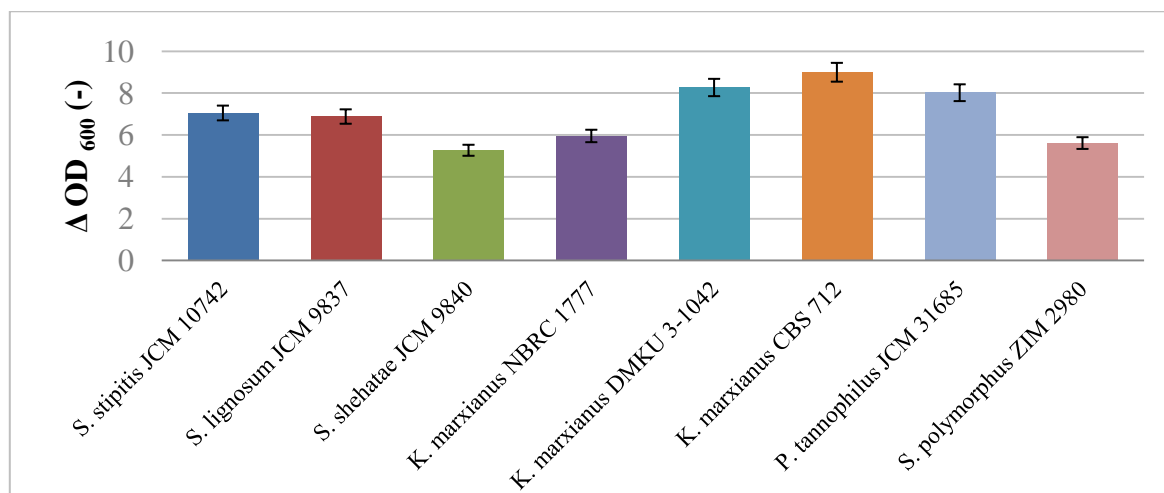
Slika 7. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s glukozom nakon 48 h uzgoja u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Tablica 5. Postotak utrošene glukoze i koncentracije proizvedenog etanola, glicerola i arabitola nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlogama s glukozom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima

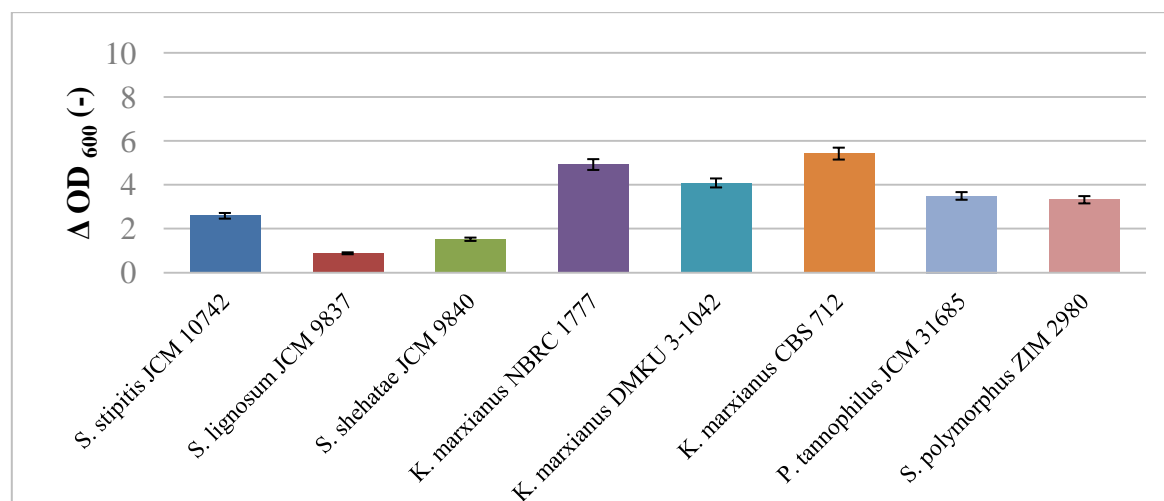
Kvasac	Aerobno					Anaerobno						
	Utrošena glukoza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Utrošena glukoza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)
<i>S. stipitis</i> JCM 10742	98,20	2,30	0,12	0,16	0,008	47,80	1,86	0,19	0,32	0,03	0,19	0,02
<i>S. lignosum</i> JCM 9837	100	0,03	0,002	0,10	0,005	71,00	4,26	0,30	0,62	0,04	0,35	0,02
<i>S. shehatae</i> JCM 9840	97,25	0,75	0,04	0,55	0,028	n.o.	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> NBRC 1777	99,75	3,60	0,18	0,04	0,002	100	10,55	0,53	1,07	0,05	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	98,20	0,89	0,05	n.o.	-	99,80	7,15	0,36	0,99	0,05	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> CBS 712	96,45	0,31	0,02	0,06	0,003	100	7,39	0,37	1,23	0,06	n.o.	-
<i>P. tannophilus</i> JCM 31685	100	0,92	0,05	0,02	0,001	100	11,65	0,52	0,36	0,04	0,15	0,02
<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980	97,80	4,29	0,22	1,02	0,052	50,30	4,41	0,44	0,72	0,07	0,26	0,03

n.o.-nije određeno

Na Slikama 8. i 9. prikazan je porast biomase kvasca kao promjena optičke gustoće podloge (OD_{600}) nakon 48 h uzgoja kvasaca u podlozi s galaktozom u aerobnim, odnosno anaerobnim uvjetima. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da kvasac *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 proizvodi najviše biomase u aerobnim uvjetima i anaerobnim uvjetima i utroši gotovo svu galaktozu iz podloge (96,05 %, odnosno 98,65 %; Tablica 6.). Ostali produkti nastali tijekom rasta kvasaca na podlogama s galaktozom u aerobnim i anaerobnim uvjetima bili su etanol, glicerol, arabitol i ksilitol, čije su koncentracije navedene u Tablici 6.



Slika 8. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s galaktozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima pri 28°C.

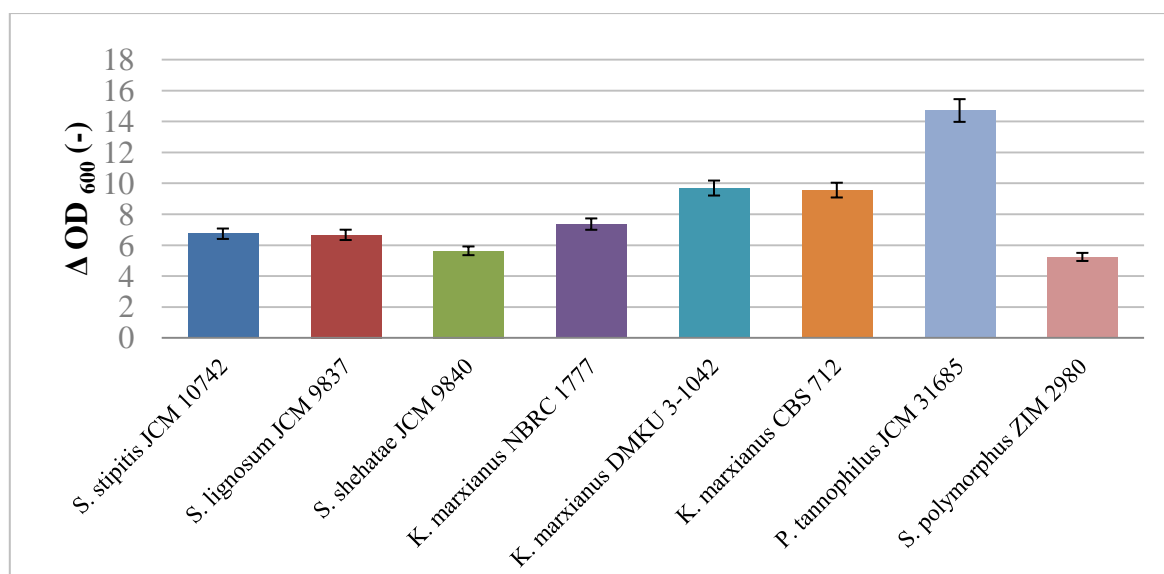


Slika 9. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s galaktozom nakon 48 h uzgoja u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

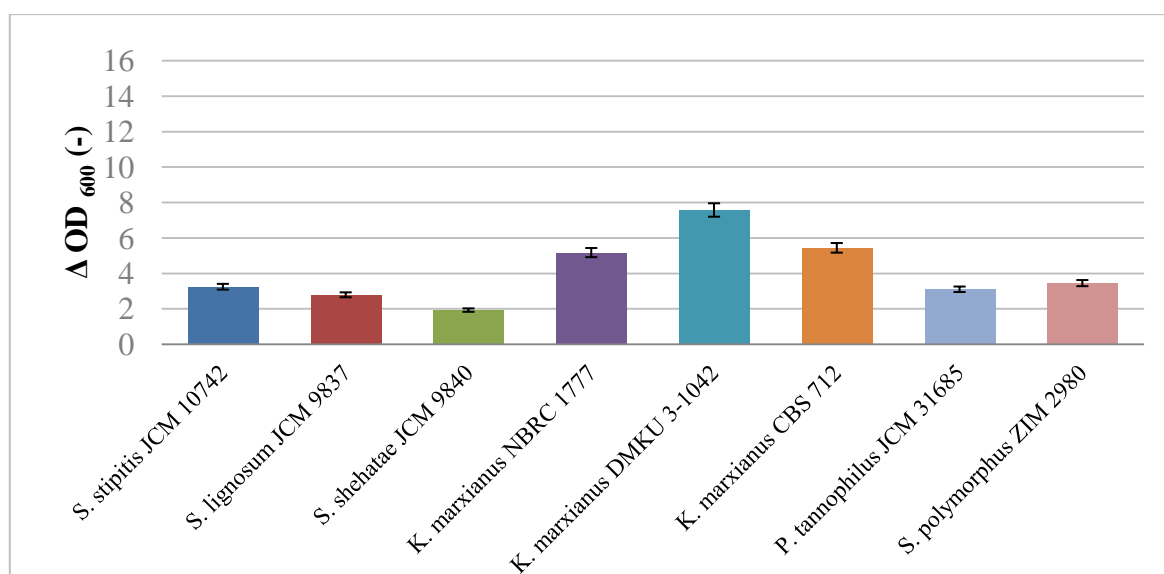
Tablica 6. Postotak utrošene galaktoze i koncentracije proizvedenog etanola, glicerola, arabitola i ksilitola nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlogama s galaktozom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Kvasac	Aerobno									Anaerobno						
	Utrošena galaktoza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)	Ksilitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Ksilitol/S}}$ (g g ⁻¹)	Utrošena galaktoza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)
<i>S. stipitis</i> JCM 10742	97,20	3,47	0,18	0,20	0,010	n.o.	-	n.o.	-	34,60	0,78	0,11	0,25	0,036	0,03	0,004
<i>S. lignosum</i> JCM 9837	95,70	3,56	0,19	0,11	0,006	n.o.	-	n.o.	-	23,10	0,42	0,09	0,25	0,054	n.o.	-
<i>S. shehatae</i> JCM 9840	95,70	2,40	0,13	0,07	0,004	n.o.	-	n.o.	-	19,30	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> NBRC 1777	96,10	3,58	0,19	0,31	0,016	n.o.	-	n.o.	-	97,80	9,59	0,49	1,08	0,055	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	98,55	1,99	0,10	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-	88,65	7,56	0,43	0,94	0,053	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> CBS 712	96,05	0,60	0,03	0,10	0,005	n.o.	-	n.o.	-	98,65	7,24	0,37	1,25	0,063	n.o.	-
<i>P. tannophilus</i> JCM 31685	95,70	0,03	0,02	0,05	0,003	n.o.	-	n.o.	-	17,15	n.o.	-	0,14	0,041	n.o.	-
<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980	95,05	4,70	0,25	0,10	0,005	0,05	0,003	0,17	0,009	22,10	0,13	0,03	0,24	0,054	n.o.	-

n.o.-nije određeno



Slika 10. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s manozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima pri 28°C.



Slika 11. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s manozom nakon 48 h uzgoja u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Na Slikama 10. i 11. prikazan je porast biomase kvasca kao promjena optičke gustoće podloge (ΔOD_{600}) nakon 48 h uzgoja kvasaca u podlozi s manozom u aerobnim, odnosno

anaerobnim uvjetima. Slično kao i kod uzgoja na glukozu, kvasac *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 proizveo je najviše biomase, u odnosu na testirane kvasce, u aerobnim uvjetima (Slika 6. i Slika 10.), uz potrošnju manoze od 98,15 %. U anaerobnim uvjetima kvasci iz roda *Kluyveromyces* (Slika 11.) proizveli su veće količine biomase u odnosu na testirane kvasce i utrošili gotovo svu manozu iz podloge (od 98,05 do 98,95 %; Tablica 7.). Dobiveni rezultati su o vrlo slični rezultatima dobivenim za rast ovih kvasaca na glukozu jer se sve heksoze transportiraju u stanice kvasca istim transportnim sustavom. Produkti nastali tijekom rasta kvasaca na podlogama s manozom u aerobnim i anaerobnim uvjetima bili su etanol, glicerol i arabitol, čije su koncentracije navedene u Tablici 7.

Tablica 7. Postotak utrošene manoze i koncentracije proizvedenog etanola, glicerola i arabitola nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlogama s manozom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima

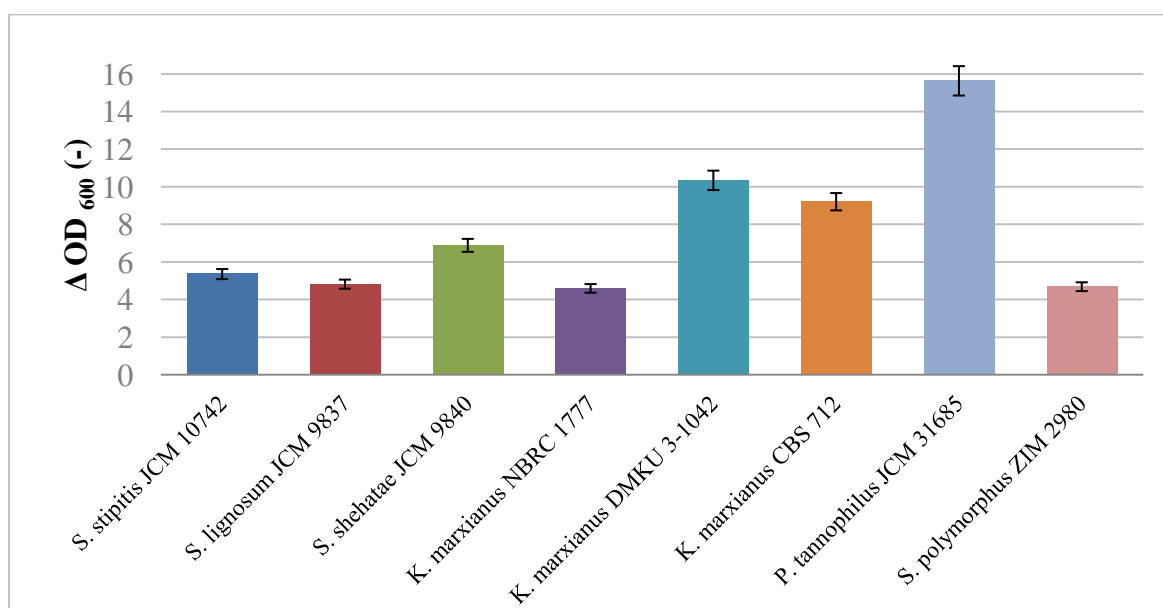
Kvasac	Aerobno					Anaerobno						
	Utrošena manozna (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{Etanol/S} (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol/S} (g g ⁻¹)	Utrošena manozna (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{Etanol/S} (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol/S} (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	Y _{Arabitol/S} (g g ⁻¹)
<i>S. stipitis</i> JCM 10742	99,35	2,88	0,14	0,25	0,013	55,25	2,67	0,24	0,36	0,033	0,32	0,029
<i>S. lignosum</i> JCM 9837	98,15	3,27	0,17	0,15	0,008	62,80	4,57	0,36	0,64	0,051	0,40	0,032
<i>S. shehatae</i> JCM 9840	98,45	3,27	0,17	1,13	0,057	75,00	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> NBRC 1777	98,75	3,36	0,17	0,03	0,002	98,05	10,06	0,51	1,18	0,060	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	99,45	1,74	0,09	0,35	0,018	98,95	8,44	0,43	1,00	0,051	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> CBS 712	99,40	1,93	0,10	n.o.	-	98,90	8,64	0,44	1,41	0,071	0,08	0,004
<i>P. tannophilus</i> JCM 31685	98,15	1,31	0,07	0,06	0,003	73,54	7,65	0,52	0,38	0,063	0,06	0,010
<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980	98,10	5,25	0,27	0,39	0,020	41,35	3,27	0,40	0,66	0,080	0,24	0,029

n.o.-nije određeno

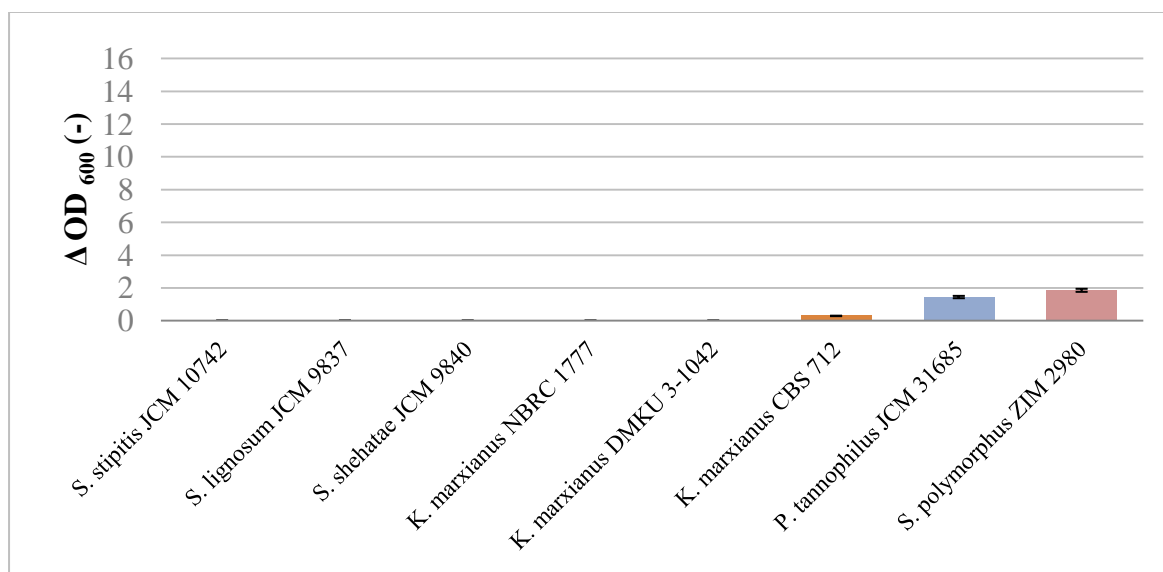
4.1.3. Određivanje rasta i aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca na podlogama sa ksilozom ili arabinozom

Ksiloza i arabinoza (i galaktoza) građevne su jedinice hemiceluloze, u različitim udjelima prisutne su u lignoceluloznom hidrolizatu (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000). Također, poznato je da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ne može koristiti pentoze. Upravo zbog navedenih razloga zanimljivo je ispitati da li koji od odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca raste na ksilozi i arabinozi kao jedinom izvoru ugljika.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca na ksilozi i arabinozi (Slike 12., 13., 14. i 15, i Tablice 8. i 9.) u aerobnim, odnosno anaerobnim uvjetima.



Slika 12. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi sa ksilozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima pri 28°C.



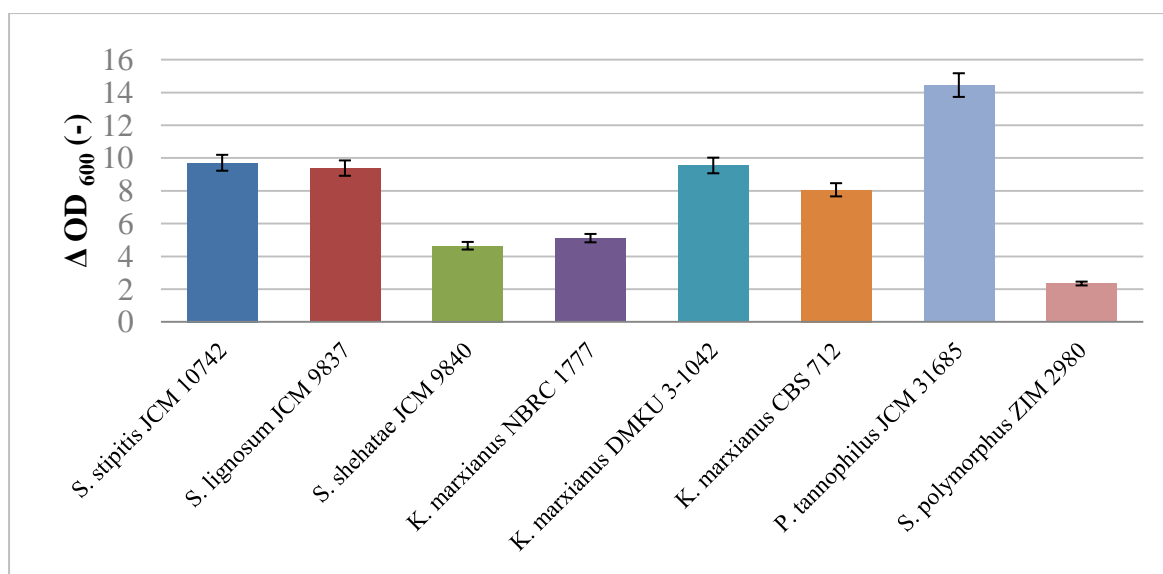
Slika 13. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi sa ksilozom nakon 48 h uzgoja u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Svi testirani kvasci rastu u YP podlozi sa ksilozom u aerobnim uvjetima, te je bitno istaknuti da niti jedan od odabranih kvasaca tijekom 48 h nije utrošio svu ksiloze iz podloge. Najviše ksiloze iz YP podloge tijekom 48 h utrošio je kvasac *S. shehatae* JCM 9840 (87,27 %), dok u aerobnim uvjetima najviše biomase proizvodi kvasac *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 (Slika 12.), uz potrošnju ksiloze od 46,42 %. U anaerobnim uvjetima samo tri ne-*Saccharomyces* kvasca mogu rasti na ksilozi, *K. marxianus* NBRC 1777, *P. tannophilus* JCM 31685 i *Schwaniomyces polymorphus* ZIM 2980, te u navedenim uvjetima kvasac *S. polymorphus* ZIM 2980 proizvede najveću količinu biomase (Slika 13.) i utroši najviše ksiloze (15,25 %, Tablica 8.). Tijekom rasta kvasca na podlozi sa ksilozom u aerobnim i anaerobnim uvjetima detektirani su slijedeći produkti: etanol, glicerol, arabitol i ksilitol, čije su koncentracije navedene u Tablici 8.

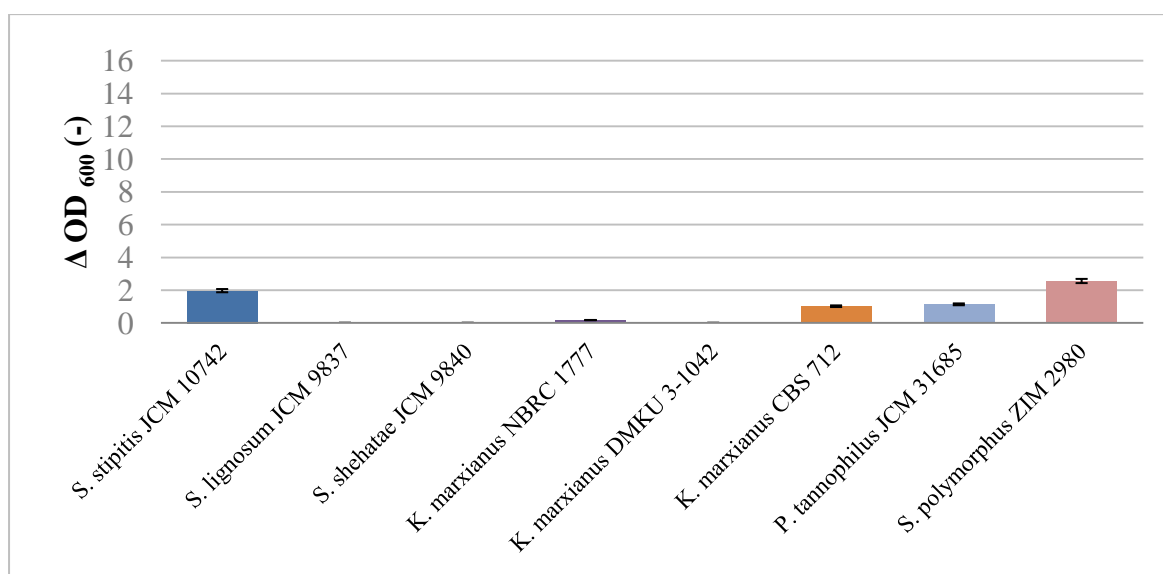
Tablica 8. Postotak utrošene ksiloze i koncentracije proizvedenog etanola, glicerola, arabitola i ksilitola nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlogama sa ksilozom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Kvasac	Aerobno									Anaerobno						
	Utrošena ksiloza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)	Ksilitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Ksilitol/S}}$ (g g ⁻¹)	Utrošena ksiloza (%)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	$Y_{\text{Arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)
<i>S. stipitis</i> JCM 10742	59,21	1,28	0,11	n.o.	-	0,15	0,013	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,25	-	0,05	-
<i>S. lignosum</i> JCM 9837	46,42	0,34	0,04	0,36	0,04	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,24	-	n.o.	-
<i>S. shehatae</i> JCM 9840	87,27	2,56	0,15	0,50	0,03	0,32	0,018	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,26	-	0,05	-
<i>K. marxianus</i> NBRC 1777	12,00	0,03	0,01	0,12	0,05	n.o.	-	n.o.	-	7,15	0,08	0,06	0,30	0,21	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	68,06	0,39	0,03	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,30	-	0,11	-
<i>K. marxianus</i> CBS 712	71,15	0,28	0,02	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,32	-	0,40	-
<i>P. tannophilus</i> JCM 31685	46,42	0,17	0,02	0,15	0,02	0,07	0,008	0,32	0,03	23,65	2,30	0,49	0,16	0,11	n.o.	-
<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980	36,55	1,51	0,21	0,13	0,02	0,15	0,021	0,73	0,10	15,45	n.o.	-	0,24	0,08	n.o.	-

n.o. nije određeno



Slika 14. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s arabinozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima pri 28°C.



Slika 15. Promjena optičke gustoće uzorka (ΔOD_{600}) u YP podlozi s arabinozom nakon 48 h uzgoja u anaerobnim uvjetima pri 28°C.

Na Slikama 14. i 15. prikazan je rast biomase ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlozi s arabinozom nakon 48 h uzgoja u aerobnim uvjetima, odnosno anaerobnim uvjetima.

Svi testirani ne-*Saccharomyces* kvasci rastu na arabinozi (Slika 14.) u aerobnim uvjetima, ali niti jedan od navedenih kvasaca ne iscrpljuje ovaj supstrat iz podloge nakon 48 h procesa.

U podlozi s arabinozom u aerobnim uvjetima, kao i u podlozi sa ksilozom kvasac *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 (Slika 14.) producira najveće količine biomase uz potrošnju arabinoze od 43,1 %. Isto tako u anaerobnim uvjetima kvasac *Schwanniomyces polymorphus* ZIM 2980 (Slika 15.) proizvede najveću količinu biomase uz potrošnju arabinoze od 24,1 %. U anaerobnim uvjetima na arabinozi mogu rasti kvasci *P. tannophilus* JCM 31685, *S. polymorphus* ZIM 2980, *K. marxianus* NBRC 1777, *K. marxianus* CBS 712 i *S. stipitis* JCM 10742.

Ostali produkti nastali tijekom rasta kvasaca na arabinozi u aerobnim i anaerobnim uvjetima bili su etanol, glicerol, arabitol i ksilitol, čije su koncentracije navedene u Tablici 9.

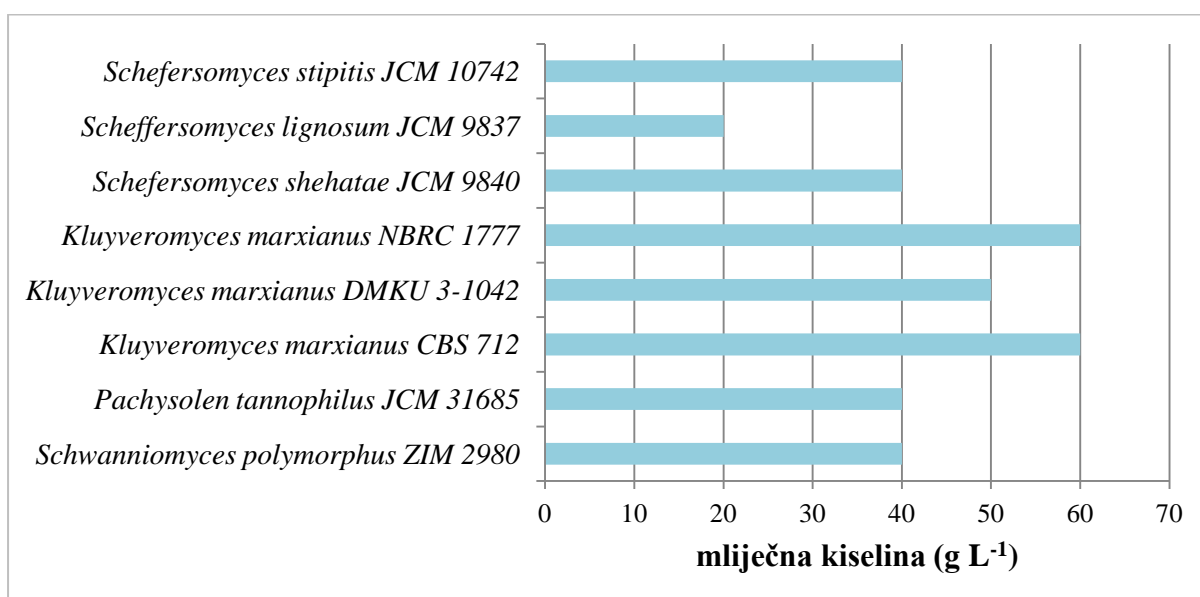
Tablica 9. Postotak utrošene arabinoze i koncentracije proizvedenog etanola, glicerola, arabitola i ksilitola nakon 48 h uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca u YP podlogama s arabinozom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Kvasac	Aerobno									Anaerobno						
	Utrošena arabinaza	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{Etanol/S} (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol/S} (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	Y _{Arabitol/S} (g g ⁻¹)	Ksilitol (g L ⁻¹)	Y _{Ksilitol/S} (g g ⁻¹)	Utrošena arabinaza	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{Etanol/S} (g g ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol/S} (g g ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)	Y _{Arabitol/S} (g g ⁻¹)
<i>S. stipitis</i> JCM 10742	25,10	0,20	0,040	n.o.	-	0,74	0,15	n.o.	-	1,00	n.o.	-	0,22	1,10	n.o.	-
<i>S. lignosum</i> JCM 9837	87,85	0,03	0,002	0,14	0,01	1,01	0,06	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,22	-	n.o.	-
<i>S. shehatae</i> JCM 9840	43,65	0,03	0,003	0,55	0,06	1,32	0,15	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,12	-	0,04	-
<i>K. marxianus</i> NBRC 1777	36,50	0,03	0,004	0,16	0,02	1,22	0,17	n.o.	-	12,06	0,51	0,21	0,29	0,12	n.o.	-
<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	78,75	0,14	0,009	n.o.	-	2,10	0,13	n.o.	-	n.o.	n.o.	-	0,26	-	0,09	-
<i>K. marxianus</i> CBS 712	73,15	0,52	0,036	0,14	0,01	3,76	0,26	n.o.	-	0,20	n.o.	-	0,32	8,00	n.o.	-
<i>P. tannophilus</i> JCM 31685	43,10	0,14	0,016	n.o.	-	3,43	0,40	0,09	0,01	13,21	n.o.	-	0,12	0,05	n.o.	-
<i>S. polymorphus</i> ZIM 2980	20,45	0,03	0,007	0,12	0,03	1,05	0,26	n.o.	-	8,00	n.o.	-	0,21	0,13	n.o.	-

n.o.-nije određeno

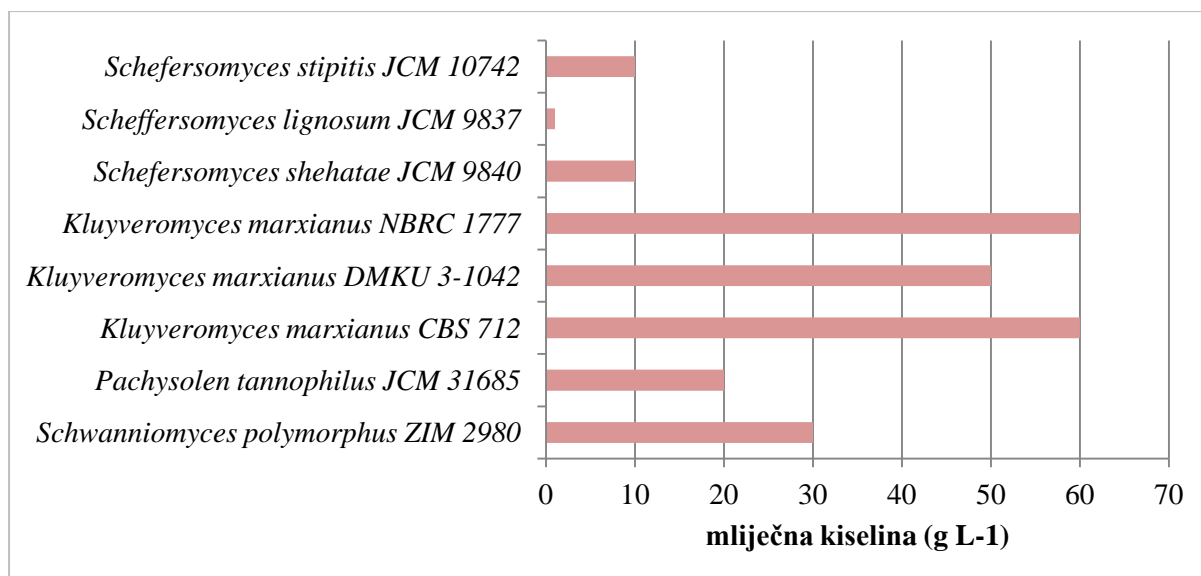
4.2. Određivanje inhibitornog utjecaja mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja inhibitornog učinka mliječne kiseline na rast odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca. Inhibitorni učinak je određivan naciepljivanjem kvasaca na YPD agar podloge u koje su dodane različite koncentracije mliječne kiseline (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 g L⁻¹). Uzgoj kvasca proveden je u aerobnim i anaerobnim uvjetima pri 28 °C kroz tri dana, a rezultati za navedene eksperimente su prikazani na Slici 16. i Slici 17.



Slika 16. Utjecaj različitih koncentracija mliječne kiseline na rasta odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na YPD podlozi u aerobnim uvjetima.

Na Slici 16. prikazani su rezultati uzgoja odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na podlogama s različitim koncentracijama mliječne kiseline u aerobnim uvjetima. Kvasac koji ima najmanju otpornost prema kiselini je kvasac *S. lignosum* JCM 983 koji raste na podlogama s koncentracijom mliječne kiseline od 1 do 20 g L⁻¹. Nešto veću rezistenciju prema mliječnoj kiselini imali su kvasci *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742, *S. shehatae* JCM 9840, *P. tannophilus* JCM 31685 i *S. polymorphus* ZIM 2980 koji mogu rasti i na YPD podlozi s koncentracijom mliječne kiseline od 40 g L⁻¹. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 može rasti na podlozi s 50 g L⁻¹, dok kvasac *K. marxianus* CBS 712 i *K. marxianus* NBRC 1777 mogu rasti čak i u podlozi sa 60 g L⁻¹ mliječne kiseline. Niti jedan testirani kvasac ne može rasti na podlozi s koncentracijom mliječne kiseline od 70 g L⁻¹.



Slika 17. Grafički prikaz rasta odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na podlogama s različitim koncentracijama mliječne kiseline prilikom uzgoja u anaerobnim uvjetima.

Na Slici 17. prikazani su rezultati uzgoja odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca na podlogama s različitim koncentracijama mliječne kiseline u anaerobnim uvjetima. Za razliku od uzgoja kvasca *S. lignosum* JCM 983 u aerobnim uvjetima, ovaj kvasac u anaerobnim uvjetima može rasti na podlozi sa samo 1 g L⁻¹ mliječne kiseline, dok mliječna kiselina u koncentraciji od 5 g L⁻¹ ima potpuni inhibitorski učinak.

Kvasci *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 i *Scheffersomyces shehatae* JCM 9840 narasli su na YPD podlogama s koncentracijom mliječne kiseline od 1 do 10 g L⁻¹, što je 4 puta manja otpornost ovih kvasaca na mliječnu kiselinu u anaerobnim uvjetima u odnosu na aerobne uvjete. Kvasac *Pachysolen tannophilus* JCM 31685 također pokazuje 2 puta manju otpornost na inhibitorski učinak mliječne kiseline u anaerobnim uvjetima (raste i pri koncentraciji mliječne kiseline od 40 g L⁻¹) te raste na podlogama u kojima je koncentracija mliječne kiseline u rasponu od 1 do 20 g L⁻¹. Kvasac *S. polymorphus* ZIM 2980 u anaerobnim uvjetima ima nešto manju rezistenciju na inhibitorski učinak mliječne kiseline te može rasti u rasponu koncentracija mliječne kiseline od 1 do 30 g L⁻¹. U aerobnim i anaerobnim uvjetima dobiveni su isti rezultati za kvasce *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 (Slika 16. i Slika 17.). Interesantno je za istaknuti da kvasci iz roda *Kluyveromyces* u odnosu na druge testirane kvasce mogu tolerirati iste koncentracije mliječne kiseline prisutne u YPD podlogama u aerobnim i anaerobnim uvjetima, iako se zna da za održavanje homeostaze u stanicama

potrebna je velika količina energije koja se lakše pridobiva u aerobnim uvjetima. Stoga bi bilo interesantno istražiti mehanizme rezistencije kvasaca iz roda *Kluyveromyces* na slabe organske kiseline, posebice mliječnu kiselinu.

4.3. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Tijekom određivanja inhibicijskog utjecaja mliječne kiseline na rast i metaboličku aktivnost kvasaca ustanovili smo da najveću otpornost prema inhibicijskom utjecaju imaju kvasci *Kluyveromyces marxianus*. Za uzgoj u većem mjerilu odabran je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. Uzgoj u većem mjerilu proveli smo u YPD podlozi i u YPD podlozi u koju je dodana mliječna kiselina u koncentraciji od 60 g L⁻¹. Tijekom uzgoja su izuzumani uzorci u kojima su određivani koncentracije biomase, supstrata i produkata. Na temelju dobivenih rezultata određeni su osnovni biokinetički parametri, trajanje lag faze (t_{lag}) i eksponencijalne faze (t_{eksp}), maksimalne specifične brzine rasta (μ_{max}), brzine potrošnje supstrata (r_s), brzine nastajanja produkta (r_p) te druge parametre uspješnosti procesa poput koeficijenta konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$), koeficijenta konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$), produktivnosti procesa (Pr)

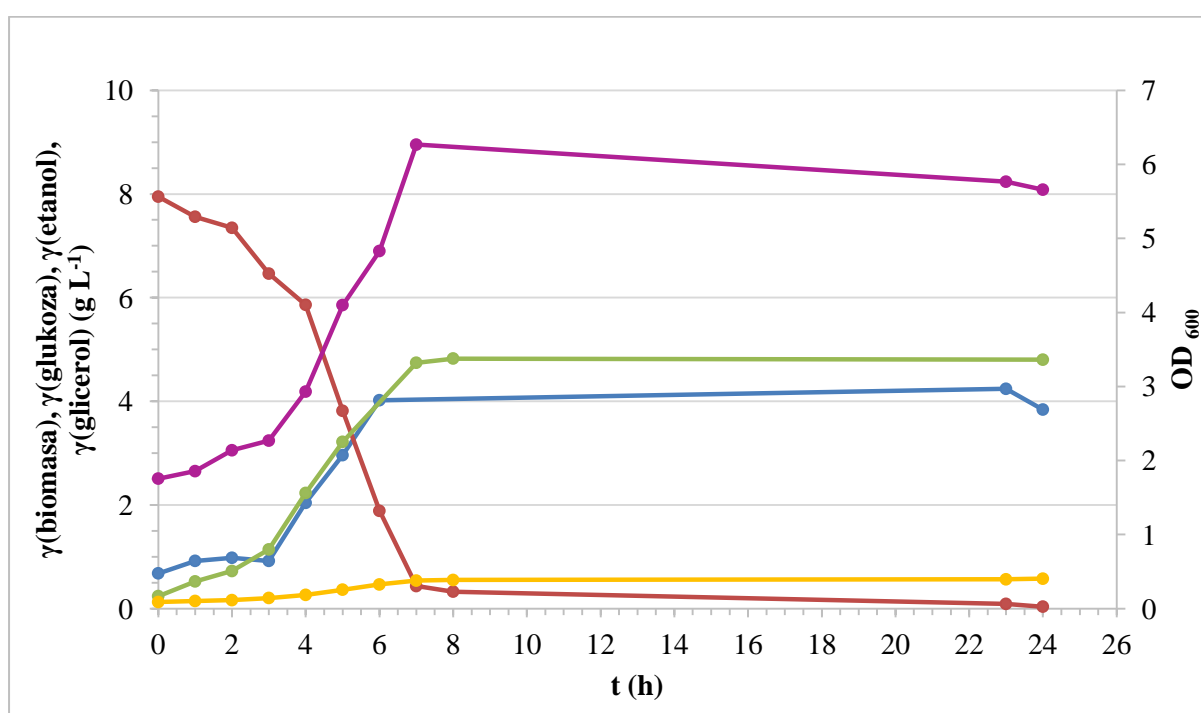
4.3.1. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi

Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 proveden je u YPD podlozi koja je sadržavala kvašičev ekstrakta (10 g L⁻¹), pepton (20 g L⁻¹) i glukozu (10 g L⁻¹). Uzgoj je proveden u anaerobnim uvjetima, na magnetnoj miješalici pri brzini okretaja miješala od 200 okretaja/min te temperaturi uzgoja od 28°C.

Tijekom uzgoja praćena je promjena optičku gustoću podloge pri 600 nm (OD_{600}), koncentracija biomase gravimetrijski, te koncentracije glukoze i potencijalnih produkata uzgoja poput etanola, glicerola i octene kiseline. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 18., a parametri uspješnosti procesa prikazani su u Tablici 10.

Na Slici 18. prikazana je promjena koncentracije biomase, glukoze, etanola i glicerola i promjena optičke gustoće podloge (OD_{600}) tijekom 24 h uzgoja kvasca. Faza prilagodbe

kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 trajala je 3 h, nakon čega je kvasac ušao u eksponencijalnu fazu rasta koja je trajala 4 h. U eksponencijalnoj fazi maksimalna specifična brzina rasta iznosila je $0,40 \text{ h}^{-1}$. Nakon eksponencijalne faze rasta kvasac je ušao u stacionarnu koja je trajala do 23 h uzgoja, nakon čega dolazi do pada koncentracije biomase. Tijekom uzgoja kvasac proizvodi, kao glavni produkt metabolizma, etanol i vrlo niske koncentracije glicerola. Na kraju procesa iscrpljena je sva glukoza iz podloge, te je proizveden etanol u koncentraciji od $4,80 \text{ g L}^{-1}$, uz koeficijent pretvorbe supstrata u etanol od $0,46 \text{ g g}^{-1}$. Koncentracija glicerola u 24 h uzgoja iznosila je $0,58 \text{ g L}^{-1}$ uz koeficijent pretvorbe supstrata u glicerol od $0,06 \text{ g g}^{-1}$.



Slika 18. Promjena koncentracije biomase(●), glukoze(●), etanola(●) i glicerola(●) i promjena optičke gustoće podloge (OD_{600} , ●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 28°C u anaerobnim uvjetima.

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri 28°C u anaerobnim uvjetima.

t_{lag}	3 h
t_{eksp}	4 h
$Y_{X/S}$	0,40 g g ⁻¹
$Y_{\text{etanol}/S}$	0,46 g g ⁻¹
$Y_{\text{glicerol}/S}$	0,06 g g ⁻¹
Pr_X	0,13 g L ⁻¹ h ⁻¹
Pr_{etanol}	0,19 g L ⁻¹ h ⁻¹
Pr_{glicerol}	0,02 g L ⁻¹ h ⁻¹
$r_{P(\text{etanol})}$	0,51 h ⁻¹
$r_{P(\text{glicerol})}$	0,21 h ⁻¹
r_S	0,75h ⁻¹
μ_{max}	0,40 h ⁻¹

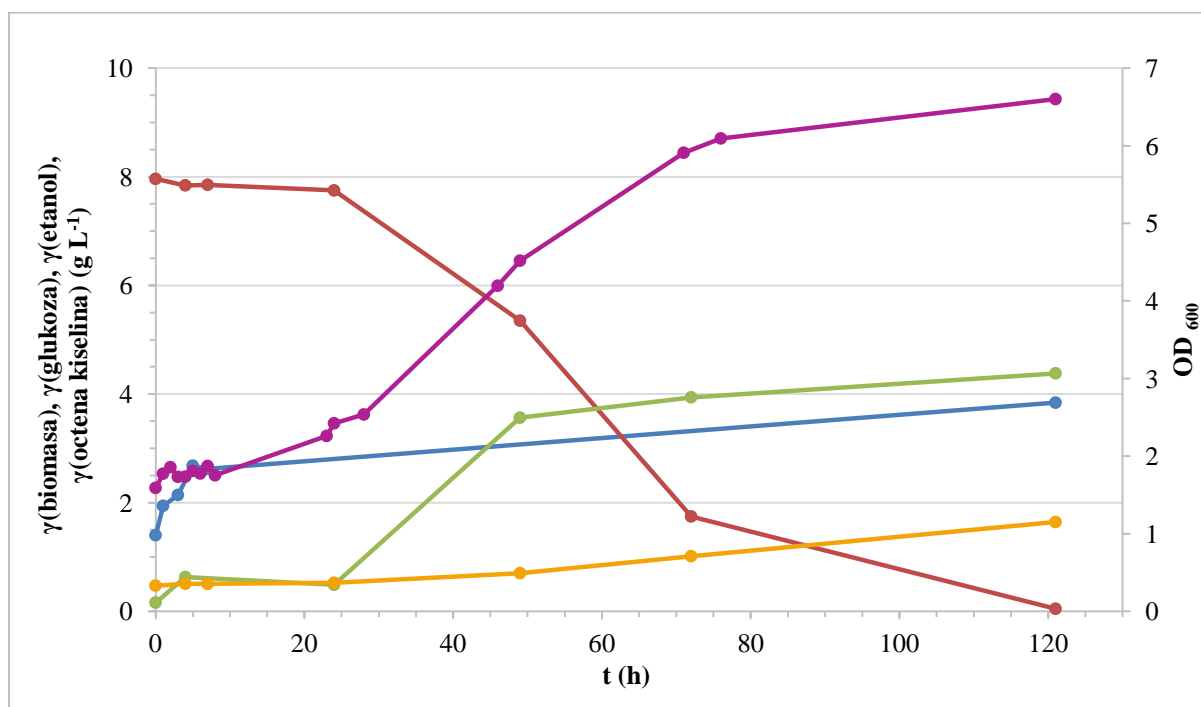
4.3.2. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s visokom koncentracijom mliječne kiseline

Nakon što je proveden uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi kako bi se odredili osnovni bioprocesni parametri, proveden je uzgoj u YPD podlozi u kojoj je koncentracija mliječne kiseline iznosila 60 g L⁻¹. Podloga je sadržavala kvašičev ekstrakta (10 g L⁻¹), pepton (20 g L⁻¹), glukozu (10 g L⁻¹) i mliječnu kiselinu (60 g L⁻¹). Fermentacija je provedena u istim uvjetima kao i uzgoj u YPD podlozi (anaerobni uvjeti, n = 200 min⁻¹, t = 28°C), te su tijekom procesa praćeni svi parametri kao i tijekom uzgoja u YPD podlozi. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 19., a parametri uspješnosti procesa navedeni su u Tablici 11.

Na Slici 19. prikazana je promjena koncentracije biomase, glukoze, etanola i octene kiseline i promjena optičke gustoće podloge tijekom 24 h uzgoja. Vidljivo je da je lag faza rasta kvasca trajala 24 h. Produžena lag faza rezultat je prisutnosti visoke koncentracije mliječne kiseline. Nakon lag faze sljedila je eksponencijalna faza koja je trajala 48 h tj. do 76

h uzgoja. Maksimalna specifična brzina rasta iznosila je $0,10 \text{ h}^{-1}$, te je 4 puta manja u odnosu na iste vrijednosti određene u YPD podlozi bez mliječne kiseline ($\mu_{\max}=0,40 \text{ h}^{-1}$). Kvasac je tijekom uzgoja proizvodio etanol i octenu kiselinu. Koncentracija etanola nakon 121 h uzgoja iznosila je $4,38 \text{ g L}^{-1}$, uz koeficijent pretvorbe supstrata u etanol od $0,46 \text{ g g}^{-1}$. Koncentracija octene kiseline nakon 121 h uzgoja iznosila je $1,64 \text{ g L}^{-1}$, uz koeficijent pretvorbe supstrata u octenu kiselinu od $0,15 \text{ g g}^{-1}$.

Autori Rugthaworn i sur. (2014) ispitivali su utjecaj različitih koncentracija mliječne kiseline na rast kvasca *K. marxianus* TISTR5925 u YP podlogama s glukozom (10 g L^{-1}) i različitim koncentracijama mliječne kiseline od 18 do 56 g L^{-1} pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri koncentraciji mliječne kiseline od 45 g L^{-1} nije zamijećen rast ovog kvasca niti nakon 60 h trajanja bioprocasa. Iz navedenog se može zaključiti da kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 tolerira značajno više koncentracije mliječne kiseline od izolata kvasac *K. marxianus* TISTR5925 (Slika 19).



Slika 19. Promjena koncentracije biomase(●), glukoze(●), etanola(●) i octene kiseline(●) i promjena optičke gustoće podloge (OD_{600} , ●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s dodatkom mliječne kiseline ($\gamma_{MK} = 60 \text{ g L}^{-1}$) pri 28°C u anaerobnim uvjetima.

Tablica 11. Pokazatelji uspješnosti rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s dodatkom mliječne kiseline ($\gamma_{MK}=60 \text{ g L}^{-1}$) pri 28°C u anaerobnim uvjetima.

t_{lag}	24 h
t_{eksp}	48 h
$Y_{X/S}$	$0,29 \text{ g g}^{-1}$
$Y_{\text{etanol}/S}$	$0,42 \text{ g g}^{-1}$
$Y_{\text{octene kiselina}/S}$	$0,15 \text{ g g}^{-1}$
Pr_X	$0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Pr_{etanol}	$0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$Pr_{\text{octena kiselina}}$	$0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$r_{P(\text{etanol})}$	$0,24 \text{ h}^{-1}$
$r_{P(\text{octena kiselina})}$	$0,01 \text{ h}^{-1}$
r_S	$0,19 \text{ h}^{-1}$
μ_{max}	$0,10 \text{ h}^{-1}$

5. ZAKLJUČCI

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

1. U aerobnim uvjetima svi testirani ne-*Saccharomyces* kvasci rastu u YP podlogama u kojima su kao glavni izvor ugljika korišteni ugljikohidrati prisutni u lignoceluloznim sirovinama (celobioza, glukoza, manoza, galaktoza, ksiloza i arabinoza).
2. U anaerobnim uvjetima u YP podlogama s pentozama (ksiloza i arabinoza), od ispitivanih ne-*Saccharomyces* kvasaca rastu samo *S. stipitis* JCM 10742, *K. marxianus* NBRC 1777, *K. marxianus* CBS 712, *P. tannophilus* JCM 31685 i *S. polymorphus* ZIM 2980. Na ostalim YP podlogama, s celobiozom i heksozama, u anaerobnim uvjetima rastu svi ispitivani kvasci.
3. Kvasac koji proizvodi najviše etanola tijekom uzgoja u anaerobnim uvjetima na YP podlogama s heksozama i pentozama je *K. marxianus* NBRC 1777, a na YP podlozi s celobiozom *K. marxianus* DMKU 3-1042.
4. Drugi zanimljivi produkti određeni tijekom uzgoja bili su arabitol i ksilitol. Svi testirani kvasci proizvodili su arabitol, no najveći koeficijent konverzije arabinoze u arabitol određen je za kvasac *P. tannophilus* JCM 31685 ($Y_{\text{arabitol/S}} = 0,40 \text{ g g}^{-1}$). Najveći koeficijent konverzije ksiloze u ksilitol određen je za kvasac *S. polymorphus* ZIM 2980 ($Y_{\text{ksilitol/S}} = 0,10 \text{ g g}^{-1}$).
5. Inhibitorni učinak mliječne kiseline na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca u aerobnim i anaerobnim uvjetima testiran je u rasponu koncentracija mliječne kiseline od 1 do 70 g L⁻¹. Od sedam testiranih ne-*Saccharomyces* kvasaca jedino kvasci *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 mogu rasti u podlozi s koncentracijom mliječne kiseline do 60 g L⁻¹ u aerobnim i anaerobnim uvjetima.
6. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 odabran je za daljnja istraživanja zbog visoke otpornosti na mliječnu kiselinu, mogućnosti rasta na svim testiranim heksozama

i pentozama te visokih prinosa etanola što ga čini potencijalnim kandidatom za provođenje genetičkih transformacija u soj producent mliječne kiseline.

7. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 raste u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom mliječne kiseline ($\gamma_{\text{glukoza}} = 10 \text{ g L}^{-1}$, $\gamma_{\text{mk}} = 60 \text{ g L}^{-1}$) pri 28 °C u anaerobnim uvjetima. U YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom mliječne kiseline lag faza traje 20 h duže nego u YDP podlozi. Vrijednosti za brzinu potrošnje glukoze i specifičnu brzinu rasta u YPD podlozi s visokom početnom koncentracijom mliječne kiseline ($r_S = 0,75 \text{ h}^{-1}$; $\mu_m = 0,40 \text{ h}^{-1}$) 4 puta su manje od odgovarajućih vrijednosti u YPD podlozi ($r_S = 0,19 \text{ h}^{-1}$; $\mu_m = 0,10 \text{ h}^{-1}$). Na kraju oba uzgoja iscrpljen je sav supstrat iz podloge i postignut je vrlo sličan prinos etanola ($\gamma_{\text{etanol}} = 4,38 \text{ g L}^{-1}$ i $4,80 \text{ g L}^{-1}$) i isti koeficijent konverzije glukoze u etanol ($Y_{P/S} = 0,42 \text{ g g}^{-1}$).

6. LITERATURA

1. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J. Biotechnol.* **156** (4), 286-301.
2. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. (2013) Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv.* **31** (6), 877-902.
3. Anonymus 1. <[https://www.semanticscholar.org/paper/OPTICALLY-PURE-D-\(-\)-LACTIC-ACID-BIOSYNTHESIS-FROM-Zhang/c60f64b754a9db374dd1c12e5a7f7474afb57dd9/figure/1](https://www.semanticscholar.org/paper/OPTICALLY-PURE-D-(-)-LACTIC-ACID-BIOSYNTHESIS-FROM-Zhang/c60f64b754a9db374dd1c12e5a7f7474afb57dd9/figure/1)> Pristupljeno 6. rujna 2019.
4. Anonymus 2., <https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=10742>. Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
5. Anonymus 3., <https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=9837>. Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
6. Anonymus 4., <https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=9840>. Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
7. Anonymus 5. , <<https://www.nite.go.jp/nbrc/catalogue/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00001777>>. Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
8. Anonymus 6., <<https://www.nite.go.jp/nbrc/catalogue/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00104275>>. Pristupljeno 7. kolovoza 2019.

9. Anonymus 7.,
<<https://www.nite.go.jp/nbrc/catalogue/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00010005>>. Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
10. Anonymus 8., <https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=31685>.
Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
11. Anonymus 9.,
<https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients_tech_manual.pdf>.
Pristupljeno 6. rujna 2019.
12. Antunes F. A. F., Chandel A. K., Brumano L. P. B., Terán Hilares R., Peres G. F. D., Ayabe L. E. S., Sorato V. S., Santos J. R., Santos J. C., Da Silva S. S. (2018) A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. *Renew. Energ.* **124**, 189-196.
13. Antunes F. A. F., Santos J. C., Chandel A. K., Milessi T. S. S., Peres G. F. D., da Silva S. S. (2016) Hemicellulosic Ethanol production by immobilized wild brazilian yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Effects of Cell Concentration and Stirring Rate. *Curr. Microbiol.* **72** (2), 133-138.
14. Beales N. (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **3** (1), 1–20.
15. Cadete R.M., Fonseca C., Rosa C. A. (2014) Novel yeast strains from Brazilian biodiversity: biotechnological applications in lignocellulose conversion into biofuels. U: *Biofuels in Brazil* (da Silva S.S., Chandel A.K., ured.). Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, str. 255–279.
16. Castillo Martinez F. A., Balciunas E. M., Salgado J. M., Domínguez González J. M., Converti A., Oliveira R. P. d. S., (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **30** (1), 70-83.

17. Chen R., Dou J. (2016) Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development. *Biotechnol. Lett.* **38** (2), 213-221.
18. Cheng K. K., Ge J. P., Zhang J. A., Ling H. Z., Zhou Y. J., Yang M. D., Xu J. M. (2007) Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* **29** (7), 1051–1055.
19. Dasgupta D., Ghosh D., Bandhu S., Adhikari D. K. (2017) Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. *Microbiol. Res.*, **200**, 64-72.
20. Deparis Q., Claes A., Foulquié-Moreno M. R., Thevelein J. M. (2017) Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* **17** (4), 1–16.
21. Ferchak, J. D., Pye, E. K. (1983) Effect of cellobiose, glucose, ethanol, and metal ions on the cellulase enzyme complex of *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol. Bioeng.* **25** (12), 2865–2872.
22. Ferreira A. D., Mussatto S. I., Cadete R. M., Rosa C. A., Silva S. S. (2011) Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMGIMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. *Yeast.* **28** (7), 547-554.
23. François J., Parrou J. L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25** (1), 125-45.
24. Hirshfield I. N., Terzulli S., O'Byrne C. (2003) Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci. Prog.* **86** (4), 245-269.
25. Johnson E. A., Echavarri-Erasun, C. (2011) Yeast Biotechnology. U: *The yeasts, a taxonomic study* (Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., ured.). Elsevier Science, Amsterdam, Nizozemska, str. 21-44.

26. Juturu V., Wu J. C. (2016) Microbial production of lactic acid: the latest development *Crit. Rev. Biotechnol.* **36** (6), 967-977.
27. Kordowska-Wiater M., Kuzdraliński A., Czernecki T., Targoński Z., Frąc M., Oszust K. (2017) The ability of a novel strain *Scheffersomyces* (Syn. *Candida*) *shehatae* isolated from rotten wood to produce arabitol. *Pol. J. Microbiol.* **66** (3), 335-343.
28. Lobs, A.K., Schwartz, C., Wheeldon, I., 2017. Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: current advances and applications. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2** (3), 198-207.
29. Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1.izd., Golden Marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
30. Mattanovich D., Sauer M., Gasser B. (2014) Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microb. Cell Fact.* **13**, 34
31. Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., and Thevelein, J. M. (2017). Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 216.
32. Narendranath N. V., Thomas K. C., Ingledew W. M. (2001) Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59** (4), 187-194.
33. Okano K., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. (2010) Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85** (3), 413-423.

34. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.* **74** (1), 25-33.

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

36. Ramesh S., Muthuvelayudham R., Kannan R.R., Viruthagiri T. (2013) Enhanced production of xylitol from corncob by *Pachysolen tannophilus* using response surface methodology. *Int. J. Food Sci.* **2013**, 1-8.

37. Rugthaworn P., Murata Y., Machida M., Apiwatanapiwat W., Hirooka A., Thanapase W., Dangjarean H., Ushiwaka S., Morimitsu K., Kosugi A., Arai T., Vaithanomsat P. (2014) Growth inhibition of thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus*, in hydrolysates from cassava pulp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173** (5), 1197-1208.

38. Sánchez S., Bravo V., Moya A. J., Castro E., Camacho F. (2004) Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Process Biochem.* **39** (6), 673-679.

39. Scordia D., Cosentino S. L., Lee J. W., Jeffries T. W. (2012) Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass Bioener.* **39**, 269–305.

40. Ullah A., Orij R., Brul S., Smits G. J. (2012) Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (23), 8377-8387.

41. Valli M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D. (2006) Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (8), 5492-5499.

42. Wang Y., Tashiro Y., Sonomoto K. (2015) Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J. Biosci. Bioeng.* **119** (1), 10-18.

43. Wu J. Elliston A. Le Gall G. Colquhoun I.J. Collins S.R.A., Dicks J., Roberts I.N., Waldron K.W. (2017) Yeast diversity in relation to the production of fuels and chemicals. *Sci. Rep.*, **7** (11), 1-11.

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

7. PRILOZI

7.1. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda HPLC i UPLC analizom

Tablica 12. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Arabinoza	14,5229	$A = 366484 \gamma_{\text{Arabinoza}} + 9888,8$	0,9999
Arabitol	15,1563	$A = 362963,41 \gamma_{\text{Arabitol}} + 9251,37$	1,0000
Celobioza	10,5704	$A = 378875 \gamma_{\text{Celobioza}} - 797,71$	0,9999
Etanol	24,5143	$A = 1163351,69 \gamma_{\text{Etanol}} - 953,28$	0,9998
Galaktoza	13,3743	$A = 372368,32 \gamma_{\text{Galaktoza}} + 926,11$	1,0000
Glicerol	17,5007	$A = 298199,58 \gamma_{\text{Glicerol}} + 7203,56$	1,0000
Glukoza	12,5827	$A = 377242 \gamma_{\text{Glukoza}} - 4487,1$	1,0000
Ksilitol	15,8300	$A = 362963,41 \gamma_{\text{Ksilitol}} + 9251,37$	1,0000
Ksiloza	13,3620	$A = 362057,07 \gamma_{\text{Ksiloza}} + 5598,61$	1,0000
Manoza	13,5438	$A = 372368,32 \gamma_{\text{Manoza}} + 926,11$	1,0000
Octena kiselina	18,4665	$A = 164953 \gamma_{\text{Octena kiselina}} + 2261$	0,9989

A= površina

Tablica 13. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Arabinoza	5,6080	$A = 151554 \gamma_{\text{Arabinoza}} - 7676,4$	0,9998
Celobioza	3,9200	$A = 144147 \gamma_{\text{Celobioza}} + 6285,5$	0,9996
Etanol	11,1000	$A = 361299,75 \gamma_{\text{Etanol}} + 27468,6$	1,0000
Galaktoza	5,1080	$A = 146529 \gamma_{\text{Galaktoza}} + 4914,5$	0,9999
Glicerol	7,0067	$A = 120817 \gamma_{\text{Glicerol}} - 3671,6$	0,9997
Glukoza	4,7000	$A = 132342 \gamma_{\text{Glukoza}} + 1503,7$	0,9999
Ksilitol	5,8000	$A = 147029 \gamma_{\text{Ksilitol}} + 3656,8$	1,0000
Ksiloza	5,1910	$A = 142576 \gamma_{\text{Ksiloza}} - 3815,8$	0,9999
Manoza	5,1080	$A = 142576 \gamma_{\text{Manoza}} - 3815,8$	1,0000
Octena kiselina	7,7924	$A = 8664,6 \gamma_{\text{Octena kiselina}} - 67,234$	0,9992

A= površina

7.2. Popis kratica

Tablica 14. Popis kratica uz navedene oznake veličine, veličine i jedinice.

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta