

Utjecaj temperature na rast i proizvodnju etanola kod kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Kralj, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:080412>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Monika Kralj

6807/BT

**Utjecaj temperature na rast i proizvodnju etanola kod
kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemijsko inženjerstvo

Mentor: Doc. dr. sc. Mladen Pavlečić

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ TEMPERATURE NA RAST I PROIZVODNJU ETANOLA KVASCA

Kluyveromyces marxianus NBRC 1777

Monika Kralj, 58204157

Sažetak: Kvasci se često koriste kao biokatalizatori u proizvodnji raznih fermentiranih proizvoda, kao i jakih alkoholnih pića te pekarskih proizvoda. Napretkom znanosti i različitim tehnikama genetičkog inženjerstva, kvasci se počinju sve češće primjenjivati i u drugim biotehnološkim postupcima. Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju veliki no vrlo slabo iskorišten izvor bioraznolikosti ovih mikroorganizama. Za razliku od *Saccharomyces* kvasaca, oni pokazuju neke karakteristike koje ih čine interesantnima za istraživanje, poput mogućnosti rasta na kompleksnim supstratima, odnosno na supstratima koji su tvoreni od dva ili više biogenih elemenata, osim toga imaju i veću otpornost prema višim koncentracijama inhibitora ili visokim temperaturama. Jedan od interesantnijih ne-*Saccharomyces* kvasaca za istraživanje je i kvasac *Kluyveromyces marxianus* NRBC 1777. S obzirom da spada u termotolerantne kvasce, neka istraživanja pokazala su da može rasti i pri temperaturama od 52 °C, dok se s druge strane pokazalo da je i dobar producent etanola na temperaturama od čak 40 °C. U ovom završnom radu proučavan je uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u anaerobnim uvjetima u tikvici pri temperaturama od 20°, 30°, 40° i 50 °C. Tokom ovog istraživanja kvasca određivana je specifična brzina rasta kvasca pri tim temperaturama, kao i mogućnost proizvodnje etanola. Najveća specifična brzina rasta određena je pri 30° C i 40 °C, također, kvasac je pokazao mogućnost proizvodnje etanola pri svim temperaturama, a prinos etanola je bio najviši pri 30 °C. Najbolji rezultati ostvarili su se na temperaturama od 20°C i 50°C.

Ključne riječi: ne-*Saccharomyces* kvasci, *Kluyveromyces marxianus* NRBC 1777, termotolerantnost, etanol.

Rad sadrži: 22 stranice, 5 slika, 3 tablice, 18 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr.sc Mladen Pavlečić

Datum obrane: 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Bachelor thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON GROWTH AND PRODUCTION OF YEAST ETHANOL *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Monika Kralj, 58204157

Abstract: Yeasts are often used as biocatalysts in the production of various fermented products, as well as strong alcoholic beverages and bakery products. With the advancement of science and various techniques of genetic engineering, yeasts are beginning to be used more and more often in other biotechnological processes. Non-*Saccharomyces* yeasts represent a large but very underused source of biodiversity of these microorganisms. Unlike *Saccharomyces* yeasts, they show some characteristics that make them interesting for research, such as the possibility of growth on complex substrates, ie on substrates formed of two or more biogenic elements, in addition they have greater resistance to higher concentrations of inhibitors or high temperatures. One of the more interesting non-*Saccharomyces* yeasts for research is the yeast *Kluyveromyces marxianus* NRBC 1777. Since it belongs to the thermotolerant yeasts, some research has shown that it can grow at temperatures of 52 ° C, while on the other hand it has been shown to be good. Ethanol producer at temperatures as high as 40 ° C. In this final work, the cultivation of yeast *K. marxianus* NBRC 1777 under anaerobic conditions in a flask at temperatures of 20°, 30°, 40° and 50° C was studied. During this study of yeast, the specific growth rate of yeast at these temperatures was determined, as well as the possibility of ethanol production. The highest specific growth rate was determined at 30 °C and 40 °C, also, yeast showed the possibility of ethanol production at all temperatures, and the ethanol yield was highest at 30 °C. The worst results were achieved at temperatures of 20 °C and 50 °C.

Key words: non-*Saccharomyces* yeasts, *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, different temperatures, ethanol.

Thesis contains: 22 pages, 5 figure, 3 tables, 18 references

Original in: Croatian

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

Mentor: asst.prof. Mladen Pavlečić

Defence date: 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Primjena kvasca u biotehnologiji.....	3
2.2. Ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci	5
2.3. Kvasac <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRBC 1777	6
2.4. Utjecaj temperature na primjenu kvasca u biotehnološkoj proizvodnji.....	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Radni mikroorganizam	9
3.1.2. Kemikalije.....	9
3.1.3. Hranjive podloge	10
3.1.4. Korištena aparatura i pribor.....	10
3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (UPLC).....	10
3.1.4.2. Ostala korištena aparatura.....	10
3.2. Metode rada	11
3.2.1. Priprema inokuluma i hranjivih podloga za rad i održavanje čiste kulture <i>K. marxianus</i> NBRC 1777	11
3.2.2. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777	12
3.3. Analitičke metode.....	12
3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca i određivanje prinosa etanola (Y_P)	12
3.3.2. Pripremanje uzoraka za UPLC analizu	13
3.3.3. Određivanje specifične brzine rasta	13
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
5. ZAKLJUČCI	20
6. LITERATURA	21

1. UVOD

Kvasci predstavljaju jednostanične eukariotske mikroorganizme koji se tradicionalno primjenjuju u biotehnologiji. Svrstavamo ih u carstvo Fungi koje se na temelju svojih karakteristika vegetativnog rasta i prirode spora dijeli dalje u četiri koljena (Grba, 2010):

- *Zygomycota*,
- *Ascomycota*,
- *Deuteromycota (Fungi imperfecti)*,
- *Basidiomycota*.

Možemo ih definirati kao askomicetne i bazidiomicetne gljive koje se razmnožavaju vegetativnim pupanjem ili cijepanjem, odnosno fisijom, pri čemu industrijsku primjenu pokazuju kvasci svrstani su u razrede *Ascomycetes* i u *Basidiomycetes* (Grba, 2010).

Zbog svoje industrijske primjene u pekarstvu, te u fermentacijama piva i vina, *Saccharomyces cerevisiae* je najpoznatija vrsta iz roda *Saccharomyces*, pa se tako kod ljudi često pojam kvasac i *Saccharomyces cerevisiae* upotrebljava upravo kao sinonim. Kvasci iz roda *Saccharomyces* inače su specifični po tome što se ubrajaju među one kvasce koji mogu rasti i u anaerobnim uvjetima. Ostali fermentativni kvasci kao što su primjerice iz rodova *Candida* i *Kluyveromyces* trebaju određenu količinu kisika za rast odnosno mogu rasti samo u aerobnim uvjetima. Takvi kvasci stalno zahtijevaju izuzetno strogu kontrolu dobave kisika tijekom procesa rasta (Prescott i sur., 2000). Osim toga, kvasci iz roda *Saccharomyces* manje su osjetljivi na visoke koncentracije etanola, te se iz tog razloga koriste za njegovu proizvodnju. Tradicionalna primjena i korištenje kvasca u današnje vrijeme proširila se i na područja moderne biotehnologije kao rezultat uporabe rekombinantne deoksiribonukleinske kiseline poznatije kao DNK (Prescott i sur., 2000).

Ne-*Saccharomyces* kvasci, s druge strane, predstavljaju veliki no vrlo slabo iskorišten izvor bioraznolikosti. Mnogi kvasci iz ove skupine pokazuju sva svojstva koja su bitna za industrijsku primjenu, poput primjerice rasta na kompleksnim supstratima, različitim šećerima (heksoza i

pentoza), ima veću otpornost prema stresnim uvjetima poput primjerice visoke temperature, pri kojima se provodi proces kao i prema višoj koncentraciji inhibitora (Radecka i sur., 2015).

Iz tih razloga neke vrste ovih kvasaca pronašle su svoju primjenu u proizvodnji bioetanola i raznih biokemikalija. (Wang i sur., 2015).

U stručnoj literaturi najčešće su opisani kao kvasci kvarenja jer se mogu izolirati upravo iz kontaminirane hrane i pića. Razvojem tehnologije sekvencioniranja i molekularnog inženjerstva, otvara se mogućnost otkrivanja molekularne osnove zbog koje ne-*Saccharomyces* kvasci imaju izraženiju otpornost prema nepovoljnim uvjetima u odnosu na *Saccharomyces* kvasce. (Radecka i sur., 2015). Do sada je opisano nekoliko tisuća vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca uz pretpostavku ali veliki broj još nije otkriven.

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NRBC 1777 interesnatan je zbog činjenice da je termotolerantan (zabilježen rast pri temperaturama 47, 49 pa čak i 52 °C), kao i mogućnosti proizvodnje etanola na temperaturama iznad 40 °C (Radecka i sur., 2015). Ove karakteristike omogućuju mu korištenje u biotehnološkim procesima proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina, koji postaju sve interesantniji u današnje vrijeme (Mukherjee i sur., 2017). U ovom završnom radu biti će prikazani rezultati istraživanja brzine rasta ovog kvasca na različitim temperaturama kao i rezultati proizvodnje etanola na kemijski definiranoj podlozi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Primjena kvasca u biotehnologiji

U proizvodnjama raznih fermentiranih proizvoda kvasci se koriste kao biokatalizatori, posebice kod proizvodnje raznih fermentiranih proizvoda kao što su to pivo ili vino, zatim u proizvodnji čistog etanola i drugih jakih alkoholnih pića te pekarskih proizvoda. Današnjim napretkom znanosti i biotehnologije, kvasci se počinju sve češće primjenjivati i u proizvodnji biogoriva, „single cell“ proteina (SCP), metabolita male molarne mase i industrijskih enzima. Osim toga pokazali su se kao odlični indikatori u bioremedijaciji što je prikazano na slici 1.



Slika 1. Primjena kvasca u biotehnologiji (Johnson i sur., 2011)

Zbog sve veće potrošnje goriva i sve većeg straha od njegova nestanka i iscrpljivanja u posljednjih nekoliko godina razvili su se različiti procesi proizvodnje biogoriva koja se dobivaju iz raznih alternativnih izvora. Kada se govori o kvascima u proizvodnji biogoriva tada se

najčešće taj izraz odnosi na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koji je dosad najbolje istražen i ima GRAS status. Osim ovog kvasca, interes znanstvenika zaokupljaju vrste kvasaca koji su sposobni za fermentaciju pentoznih šećera poput primjerice *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* te vrste roda *Brettanomyces*, *Clavispora*, *Schizosaccharomyces* i *Debaromyces* (Kuhad i sur., 2011). Primjena genetičkog inženjerstva u suvremeno doba omogućila je razvoj novih rekombinantnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji onda mogu koristiti pentozne šećere kao izvor ugljika što je uvelike unaprijedilo proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina (Kuhad i sur., 2011).

Posebno mjesto u primjeni kvasaca pronalazi se i u proizvodnji farmaceutskih preparata i lijekova (Grba, 2010). Za proizvodnju farmaceutskih preparata najviše se koriste kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i kvasci roda *Pichia* (*Pichia pastoris*), a jedni od najčešćih proizvoda su kožni respiracijski faktor, β -glukan, koenzim-A sintetizirajući kompleks i (S)-adenozil-L-metionin (Grba, 2010).

U tablici 1. prikazani su neki terapijski proteini proizvedeni pomoću stanica kvasca

Tablica 1. Terapijski proteini proizvedeni pomoću stanica kvasca

Komercijalni naziv	Rekombinantni protein	Kvasac
Actrapid / Novolog	Inzulin	<i>S. cerevisiae</i>
Albumen	Rh albumen	<i>S. cerevisiae</i>
Comvax <i>S.cerevisiae</i>	Hepatitis B-antigen	<i>S. cerevisiae</i>
Glukagen	Glukagon	<i>S. cerevisiae</i>
Hepatitis B vaccine	Hepatitis B-protein	<i>P. angusta</i>
Trypsin	Inzulin	<i>P. pastoris</i>
Valtropin	Somatropin, rh GH	<i>S. cerevisiae</i>

2.2. Ne-*Saccharomyces* kvasci

Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju veliki, no usprkos tome, relativno slabo iskorišten izvor bioraznolikosti. Jedna od prednosti ovih sojeva kvasaca temelji se na činjenici kako su otporniji na stresne uvjete koji su prisutni u procesu proizvodnje bioetanol druge generacije (Mukherjee i sur., 2017), zatim imaju sposobnosti korištenja kompleksnih supstrata kao izvor ugljika kao i povišenu toleranciju prema inhibitorima koji nastaju tokom predobradbe linoceluloznih sirovina (Radecka i sur., 2015).

Ne-*Saccharomyces* kvasci u literaturi često su opisani kao kvasci kvarenja, jer ih se najčešće može izolirati iz kontaminirane hrane ili pića, no napretkom tehnologije sekvencioniranja i tehnika genetičkog inženjerstva, otvorila se mogućnost otkrivanja molekularne osnove zbog koje ovi kvasci imaju superiornu otpornost prema nekim karakterističnim nepovoljnim uvjetima kao što je recimo visoka temperatura (Radecka i sur., 2015). Znanstvenici su dosada opisali nekoliko tisuća vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca uz pretpostavku da veliki broj njih ni danas još nije otkriven.

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 visoka početna koncentracija šećera, visoka temperatura, te prisutnost inhibitora poput octene kiseline i derivata furana. Kvasac *Zygosaccharomyces rouxii*, npr., može rasti na koncentracijama šećera do 90 % (w/v). Kvasac *Kluyveromyces marxianus* interesantan je zbog toga što spada u termotolerantne kvasce, gdje je zabilježen rast pri temperaturama od 47, 49 i 52 °C, dok je s druge strane zabilježena mogućnost proizvodnje etanola na temperaturama iznad 40 °C. *Ogataea polymorpha* je još jedna vrsta kvasca koja može rasti na temperaturama višim od 50 °C, a *Zygosaccharomyces bailii* poznat je po visokoj otpornosti na povišene koncentracije octene kiseline. Zabilježen mu je rast pri koncentraciji octene kiseline od čak 24 gL⁻¹, dok *S. cerevisiae* može rasti pri koncentraciji octene kiseline do 9 gL⁻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 soja *S. cerevisiae*, ali i otkrivanje novih multitolerantnih sojeva koji mogu proizvoditi etanol zbog čega mogu imati potencijalnu primjenu u globalnoj industriji (Mukherjee i sur., 2017).

2.3. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NRBC 1777

Kluyveromyces marxianus NRBC 1777 je nekonvencionalni kvasac koji je zbog svoje fiziologije i metabolizam pronašao primjenu u biotehnološkim postupcima (Rajkumar i sur., 2019). Iako se divlji soj ovog kvasca već koristi za proizvodnju mirisa i fermentiranih proizvoda, Rajkumar i suradnici naglašavaju da nedostatak standardiziranih alata koji bi se koristili za genetičko i metaboličko inženjerstvo navedenog kvasca, ograničavaju njegovu primjenu u postupcima proizvodnje novih kemikalija (Rajkumar i sur., 2019). Budući da se godinama izolirao uglavnom iz mliječnih proizvoda, dobio je status kako je siguran za uporabu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Marcišauskas i sur., 2019).

Stanice kvasca *K. marxianus* izgledaju okruglo, elipsoidno ili cilindrično, veličine od 2 do 6 x 3–11 μm . Tvorba askospora nastaje konjugacijom haploidnih stanica koja je prethodila stvaranju askusa. Kao alternativa, askosporogeneza može nastati izravno iz diploidnih stanica. Svaki askus sadrži 1-4 askospore. Ploidnost *K. marxianus* izvorno se smatrala haploidnom, no nedavna su istraživanja pokazala da su mnogi sojevi kvasca koji su korišteni u nekim istraživanjima i industriji diploidni. Ovi sukobljeni nalazi sugeriraju da *K. marxianus* može postojati u vegetativnom obliku ili kao haploid i diploid.

Kluyveromyces marxianus zanimljiv je znanstvenicima zbog svoje termootpornosti što ga čini pogodnim za industrijsku primjenu upravo u procesima koji se odvijaju pri višim temperaturama. Ovaj kvasac također ima jednu od najvećih specifičnih brzina rasta među svim kvascima, ima mogućnost korištenja širokog spektra šećera, proizvodnju enzima te je dobar producent etanola, čak i pri višim temperaturama (Lane i sur., 2010).

Kao što je već prethodno navedeno, fermentacije pri višim temperaturama rezultiraju smanjenom potrošnjom vode za hlađenje te manjom mogućnosti kontaminacije

Kluyveromyces marxianus je aerobni kvasac koji je sposoban za respiratorno-fermentacijski metabolizam koji se sastoji od istovremenog stvaranja energije iz disanja kroz TCA ciklus i fermentacije etanola. Ravnoteža između metabolizma pri aerobnim uvjetima i fermentacije specifična je za ove sojeve kvasca. U uzgoju kada je u podlozi istovremeno prisutna glukoza i laktoza, sa padom koncentracije glukoze ispod 6 gL^{-1} , započinje transport laktoze (Parachini Bettiga, 2011) što znači da i kod njega susrećemo pojavu represije metabolizma glukozom.

Uspješno se primjenjuje i u proizvodnji endogenih enzima. Iako njegova sestrinska vrsta *Kluyveromyces lactis* sadrži čak 94% istih gena, samo *K. marxianus* pokazuje toleranciju na temperature od 45–50 °C. (Marcišauskas i sur., 2019).

U aerobnim uvjetima, u stanici kvasca odvija se potpuna oksidacija ugljikohidrata na način da nastaje CO₂, voda, određena količina biomase i toplina (Maaheimo i sur., 2001).

Razgradnja disaharida unutar *K. marxianusa* odvija se ili unutar ili izvan stanice (maltoza koja se cijepa na dvije glukoze izvan stanice a saharoza se cijepa na glukozu i fruktozu u periplazmatskom prostoru). Transport heksoze (glukoze, fruktoze i manoze) odvija se putem olakšane difuzije uz pomoć istog transmembranskog prijenosnika. Dva su transportna sustava koji su dominantni u različitim uvjetima koncentracije glukoze u okolini stanice (Novak i Marić, 1995).

Transport maltoze započinje ulaskom u stanicu pomoću specifičnog transmembranskog proteina maltoza-permeaze. Maltoza se nakon toga cijepa pomoću enzima maltaze na dvije molekule glukoze koje se prije svega fosforiliraju pa tek nakon toga ulaze u glikolizu (Fraenkel, 1982).

Transport maltoze odvija se putem dva karakteristična transportna sustava:

- Konstitutivno ekspresivan sustav niskog afiniteta,
- Inducibilno ekspresivan sustav visokog afiniteta (Crumplen i sur., 1996).

Tri regulacijska mehanizma kontroliraju metabolizam maltoze:

- Indukcija,
- Katabolička represija,
- Katabolička inaktivacija (Wang i sur., 2002).

Transportnim sustavom za maltozu odvija se i metabolizam maltotrioze prilikom čega je potrošnja maltotrioze ipak sporija pa nerijetko tijekom vrenja jedan dio maltotrioze ostane neprevreo. Razlog sporijoj potrošnji maltotrioze prethodi činjenica da postoji niži afinitet transportnih proteina za maltotriozu te od sedam transportnih proteina za maltozu (manje specifične α -glukozid permeaze) samo tri proteina (za koje kodiraju geni: AGT1, MPH2 i MPH3) mogu dalje transportirati maltotriozu u stanicu (Day i sur., 2002).

Pri ulasku maltotrioze u stanicu dolazi do njenog daljnjeg cijepanja na tri jedinice glukoze što se katalizira intercelularnom α -glukozidazom (maltaza) koja osim toga katalizira i cijepanje maltoze na dvije glukozne jedinice te omogućuje cijepanje još nekih glukozida. Novonastale glukozne jedinice nakon toga ulaze u glikolizu (Chang i sur., 1989).

2.4. Utjecaj temperature na primjenu kvasca u biotehnološkoj proizvodnji

Biotehnološki postupci pri povišenim temperaturama postaju sve interesantniji u novije vrijeme zbog činjenice da povišena temperatura smanjuje mogućnost kontaminacije i posljedično omogućava sniženu potrošnju vode koja se koristi za hlađenje. Međutim, s druge strane, s povećanjem temperature može doći i do smanjenja prinosa etanola što nije optimalno. (Fonesca i sur., 2008).

Fermentacije se najčešće provode na temperatura od 18 do 25 °C, s obzirom da je to optimalna temperatura za kvasce koji se tradicionalno koriste u tim procesima. Kod temperatura nižih od 12 °C, metabolička aktivnost kvasaca je usporena što naravno posljedično utječe na smanjenje produktivnosti i proizvedenu količinu željenog produkta. S druge strane, niže temperature pogoduju stvaranju spojeva arome, primjerice kod vina, te dovode do formiranja veće količina viših masnih kiselina i hlapljivih estera. Kod viših temperatura može doći i do naglog oslobađanja CO₂, koju onda može za sobom istisnuti dio aromatičnih tvari kao i prisutan alkohol. Međutim, generalno, previsoka ili preniska temperatura nisu dobre za sam procesa u slučaju ako dolazi do formiranja spojeva koji negativno utječu na kvalitetu proizvoda (mliječna ili octena kiselina). (Muštović, 1985.; Tomas i Kolovrat, 2011.; Zoričić, 1996.; web 4).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom radu kao radni mikroorganizam korišten je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 koji se može pronaći u zbirci organizama NBRC Culture Collection u Japana, ali i u zbirci Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno biotehnološkog fakulteta U Zagrebu. Ovaj mikroorganizam izoliran je iz tla u Japanu.

3.1.2. Kemikalije

Popis kemikalija, čistoće i podrijetla kemikalija odnosno proizvođača nalaze se u Tablici 2.

Tablica 2. Popis kemikalija, čistoća i podrijetlo za pripremu hranjive podloge i otopine

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Kvaščev 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
glukoza monohidrat	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov sulfat 7-hidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Sumporna kislina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka

3.1.3. Hranjive podloge

Čista kultura kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 održavana je u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj podlozi koja je sadržavala 50 gL⁻¹ YPD i 20 gL⁻¹ agra. Inače, YPD podloga sastoji se od kvašćevog ekstrakta, peptona i glukoze koji se nalaze u omjeru 1:2:2. YPD podloga standardnog sustava također je korištena za izradu podloga za uzgoj inokuluma kao i u svim eksperimentima koji su provedeni u ovom završnom radu. Sastav hranjive podloge bio je slijedeći, 10 gL⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 20 gL⁻¹ peptona i 20 gL⁻¹ glukoze.

3.1.4. Korištena aparatura i pribor

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

Korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) koji se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) čije su dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim predkOLONAMA, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Otopina od 0,0023 M sumporne kiseline korištena je kao mobilna faza. Analizirani uzorak imao je volumen koji je iznosio 10 μL, dok je protok mobilne faze (0,0025 M H₂SO₄) bio 0,6 mL min⁻¹.

3.1.4.2. Ostala korištena aparatura

- Tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija),
- Analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka),
- Autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija),
- Sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska),
- Magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD),

- Oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20 μm , 47 mm; Sartorius Stedim Biotech, GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester SAD),
- Termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska),
- Centrifuga Tehnica (Železniki, Slovenija),
- Centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD).

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema inokuluma i hranjivih podloga za rad i održavanje čiste kulture *K. marxianus* NBRC 1777

Čista kultura kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 čuva se na čvrstim hranjivim YPD podlogama u Petrijevim zdjelicama. Navedene čvrste hranjive podloge pripremljene su na način da se određen volumen demineralizirane vode doda izračunatoj i odvaganoj masi YPD podloge (50 gL^{-1}) i agara (20 gL^{-1}). Podloga se sterilizira u autoklavu na temperaturi od 121 °C tokom 20 minuta nakon čega se ista prelije u Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima. Nakon što se podloga u pločama ohladi i skrutne, ista se nacjepljuje kulturom kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 uz pomoć mikrobiološke ušice. Ploče sa kulturama stavljene su na inkubaciju tokom 48 sati na temperaturu od 30 °C.

Za pripremu podloge za uzgoj inokuluma kao i za sve ostale uzgoje u tikvicama dodan je potreban volumen demineralizirane vode u koju dodana prethodno izračunata i odvagana količina sastojaka YPD podloge. Podloga je u svim tikvicama sadržavala slijedeće sastojke i pripadajuće koncentracije; glukoza (20 gL^{-1}), kvašćev ekstrakta (10 gL^{-1}) te pepton (20 gL^{-1}). 100ml podloge pripremljeno je u 250 ml demineralizirane vode. Tikvice su zatim sterilizirane na temperaturi od 121 °C tokom 20 minuta. Nakon sterilizacije, sadržaj tikvice ohlađen je te je slijedila inokulacija sa čistom kulturom radnog mikroorganizma. Tikvica je zatim stavljena na tresilicu (200 okretaja po minuti) na temperaturu od 30 °C tokom 24h.

3.2.2. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

U prethodno pripremljene, sterilizirane i ohlađene tikvice koje su sadržavale 100 ml hranjive podloge, dodano je 15% vol/vol prethodno pripremljenog inokuluma. Uzgoj kvasca je proveden u anaerobnim uvjetima, u tikvicama s vreljnjačama. Provedena su četiri uzgoja na magnetnoj miješalici (150 okretaja po minuti) pri temperaturama od 20, 30, 40, 50 °C. Uzorkovanje je provedeno u vremenskim intervalima od oko sat vremena. U svim izuzetim uzorcima određena je koncentracija biomase te je UPLC analizom praćena promjena koncentracije supstrata i etanola u podlozi.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca i određivanje prinosa etanola (Y_p)

Prilikom svakog izuzimanja uzorka, određeni volumen podloge iz tikvice (4-5 ml) otpipetiran je u prethodno izvaganu i osušenu plastičnu kivetu. Sadržaj kivete zajedno s čepom stavljen je na centrifugiranje tokom 5 minuta pri 6000 okretaja po minuti (centrifuga SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon centrifugiranja odvojen je tekući dio (supernatant) od čvrstog dijela uzorka (biomasa). Sadržaj kivete, bez čepa, stavljen je na sušenje u sušionik pri 80 °C do konstantne mase. Osušene i ohlađene kivete su dodatno su se sušile u eksikatoru. Koncentracije biomase kvasca X (gL^{-1}) određena je prema sljedećoj formuli:

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad [\text{gL}^{-1}]$$

Pri čemu je:

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

m_{pk} - masa prazne kivete [g]

V_{uz} - volumen uzorka [L]

Supernatant je korišten za određivanje koncentracije etanola u uzorcima korištenjem UPLC analitike na temelju čega se u konačnici određivao prinosa etanola. Prinos se računa kao razlika konačne i početne koncentracije etanola u uzorku tj.;

$$Y_p = P - P_0 \quad [\text{gL}^{-1}]$$

pri čemu je

P- koncentracija etanola na kraju uzgoja $[\text{gL}^{-1}]$

P₀- koncentracija etanola na početku uzgoja $[\text{gL}^{-1}]$

3.3.2. Pripremanje uzoraka za UPLC analizu

Supernatant koji je dobiven nakon centrifugiranja (poglavlje 3.3.2.) korišten je dalje za pripremu uzoraka za UPLC analizu. U 750 μL supernatanta uzorka dodano je 750 μL otopine cinkovog sulfata heptahidrata s koncentracijom 100 gL^{-1} . Nakon toga, dobivena otopina intenzivno se miješala 20 sekundi te je ostavljena na sobnoj temperaturi kroz narednih 10 minuta. Poslije toga uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10000 okretaja po minuti. Centrifugiranjem su se istaložili proteini i nečistoće. Dobiveni uzorak tada je razrijeđen tako što se 750 μL uzorka dodaje u 750 μL demineralizirane vode. Ovako pripremljeni uzorci zatim su profiltrirani kroz filter s porama veličine 0,20 μm te su dalje korišteni za UPLC analizu.

3.3.3. Određivanje specifične brzine rasta

Tokom ovog istraživanja kvasca određivana je specifična brzina rasta kvasca pri različitim temperaturama; 20, 30, 40 i 50 °C. Specifična brzina rasta mikroorganizma ovisi o brojnim faktorima a i o samoj vrsti mikroorganizma, i to je jedan od ključnih parametara koji utječe na trajanje biotehnološkog procesa. S obzirom da su ranije već spomenute prednosti vođenja uzgoja pri višim temperaturama, i s obzirom da se ovaj proizvodni mikroorganizam savršeno uklapa u takav model, u ovim eksperimentalnom istraživanju pokušali smo odrediti optimalnu temperaturu uzgoja tj. temperaturu pri kojoj kvasac *K. marxianus* NRBC 1777 ima najbolje pokazatelje. Po definiciji, specifična brzina rasta je promjena koncentracije u jedinici vremena podijeljena sa koncentracijom biomase koja je uzrokovala tu promjenu ili ;

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \mu \quad [\text{h}^{-1}]$$

Nakon što je gravimetrijski određena koncentracija biomase u svakom uzorku, ti podaci su se koristili u aproksimacijskoj mid-point slope metodi za određivanje specifičnih brzina rasta mikroorganizma, pri čemu je uzeta aproksimacija;

$$\frac{dX}{dt} \sim \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

i iz čega slijedi;

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} \cdot \frac{1}{X} = \mu$$

Tj.

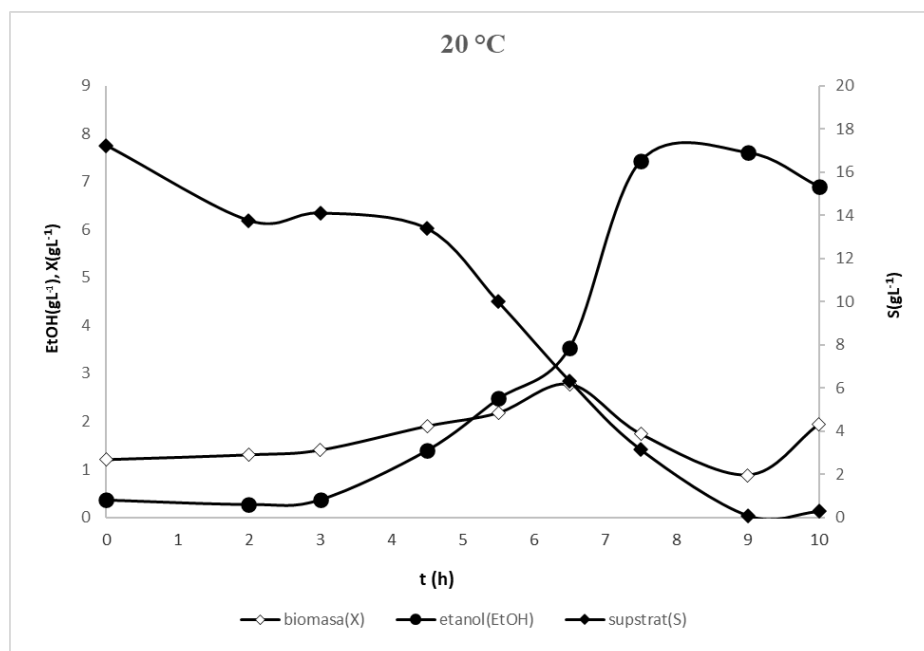
$$\frac{X_3 - X_1}{t_3 - t_1} \cdot \frac{1}{X_2} = \mu \quad [\text{h}^{-1}]$$

Kod svakog eksperimenta pri različitim temperaturama određene su i zabilježene najveće vrijednosti ovog parametra i na temelju toga određena optimalna temperatura za rast kvasca *K. marxianus* NRBC 1777.

4. REZULTATI I RASPRAVA

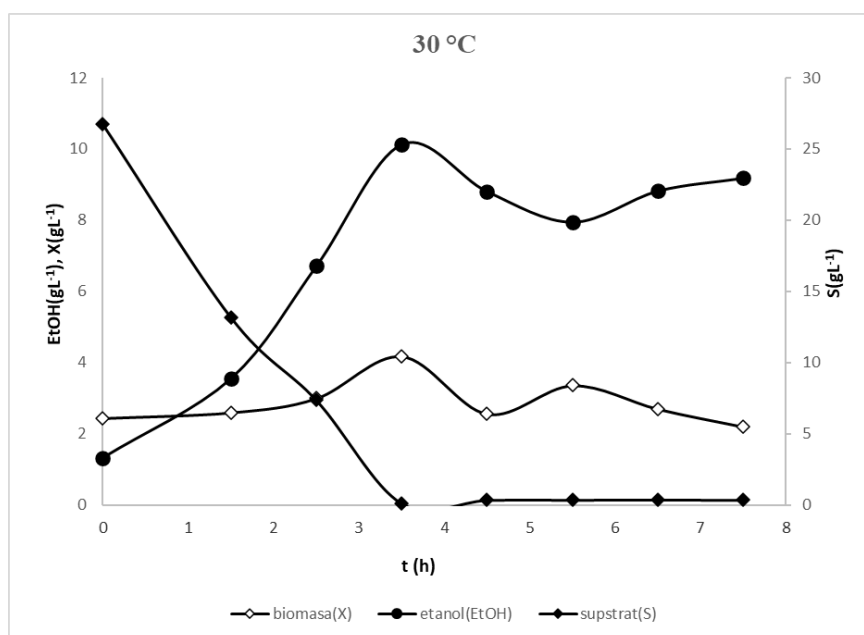
U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u anaerobnim uvjetima u tikvici pri temperaturama od 20, 30, 40 i 50 °C koji će biti uspoređeni sa dosadašnjim provedenim istraživanjima na istu temu. Specifična brzina rasta mikroorganizma ovisi o brojnim faktorima a i o samoj vrsti mikroorganizma, i to je jedan od ključnih parametara koji utječe na trajanje biotehnološkog procesa (Salvado i sur., 2011). S obzirom da su ranije već spomenute prednosti vođenja uzgoja pri višim temperaturama, i s obzirom da se ovaj proizvodni mikroorganizam savršeno uklapa u takav model ispitan je na prethodno određenim temperaturama.

Svi eksperimenti su započinjali na isti način. 100 ml prethodno pripremljene i sterilizirane YPD podloge u Erlenmeyer tikvici od 250 ml, inokulirano je sa 15 % vol/vol prethodno pripremljenim inokulumom. Nakon inokulacije na tikvicu je stavljena vrelnjača kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Sadržaj tikvice termostatiran je na određenoj temperaturi na magnetnoj miješalici dok se koncentracija biomase više nije značajnije mijenjala. Koncentracija biomase određivala se gravimetrijski a iz supernatanta koji se dobio centrifugiranjem uzoraka određena je koncentracija etanola.



Slika 2. Promjena koncentracije supstrata (S), biomase (X) i etanola (EtOH) u eksperimentu s kvascem *K. marxianus* NRBC 1777 koji je proveden pri 20 °C na magnetskoj miješalici sa regulacijom temperature

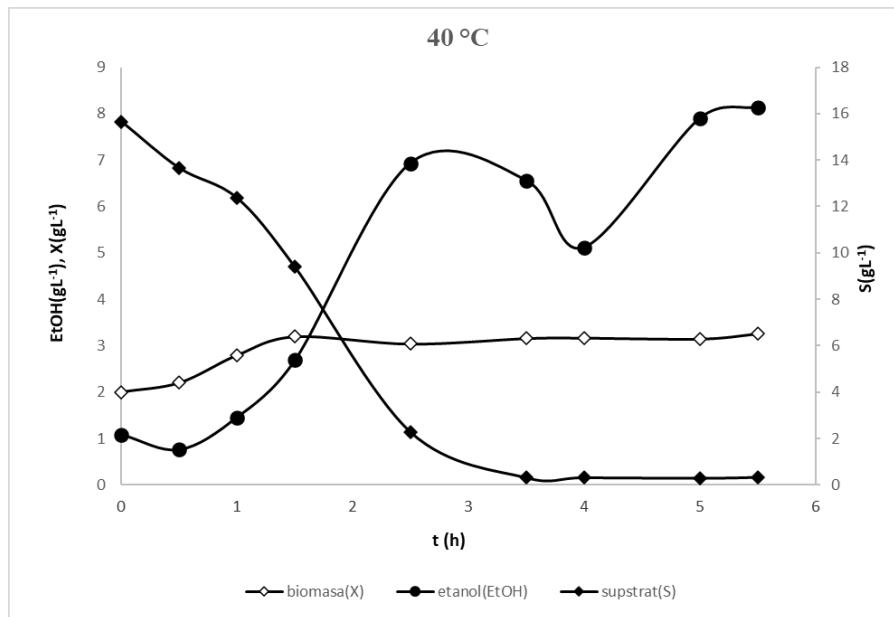
Na slici 2. prikazani su rezultati dobiveni u prvom eksperimentu koji je proveden pri 20°C na magnetskoj miješalici pri 150 okretaja po minuti sa regulacijom temperature. Uzgoj je trajao sveukupno 10 sati pri čemu se uzorkovanje vršilo svakih sat vremena. Početna koncentracija glukoze bila je 18 gL⁻¹ dok je koncentracija biomase u početku iznosila 1,2 gL⁻¹. U prvom uzorku također je zabilježena mala koncentracija etanola s obzirom da je dio alkohola zajedno sa biomasom prenesen prilikom inokulacije. Najveća koncentracija biomase zabilježena je nakon 6,5 sati uzgoja dok je najveća koncentracija etanola bila 7,61 gL⁻¹ i izmjerena je skoro pri kraju fermentacije. Ukupan prinos etanola iznosio je $Y_p=6,54$ gL⁻¹. Najveća specifična brzina rasta iznosila je 0,2 h⁻¹ pri čemu je glukoza kao supstrat bila u potpunosti utrošena, što je u skladu sa istraživanjem koje su proveli Salvado i suradnici (2011) te dobili iste rezultate.



Slika 3. Promjena koncentracije supstrata (S), biomase (X) i etanola (EtOH) u eksperimentu s kvascem *K. marxianus* NRBC 1777 koji je proveden pri 30 °C na magnetskoj miješalici sa regulacijom temperature

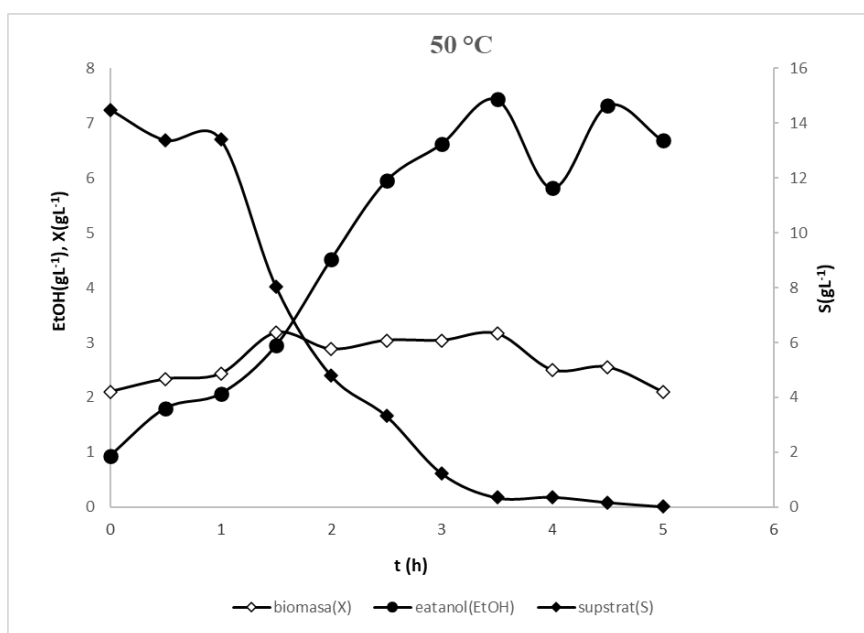
Rezultati uzgoja provedeni na temperaturi 30 °C prikazani su na slici 3. Inicijalna koncentracija glukoze je u ovom slučaju malo viša od željene ali ova vrijednost je moguće posljedica analitičke greške. Nakon početnog inicijalnog rasta biomase, njena vrijednost se nakon 3,5 sati stabilizirala i kretala se u rasponu između 2-3,5 gL⁻¹. I u ovom slučaju može se vidjeti kako je

sinteza etanola vezana uz rast i s obzirom da je temperatura nešto viša, rezultati pokazuju da na ovoj temperaturi kvasac bolje proizvodi etanol što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima koja su dobila iste rezultate (Salvado i sur., 2011). Najviša vrijednost koncentracije zabilježena je upravo nakon 3,5 sati i iznosila je skoro 10 gL^{-1} . U konačnici prinos je bio nešto malo niži i iznosio je $7,86 \text{ gL}^{-1}$. Najveća brzina rasta izmjerena je u intervalu između 1,5 i 3 sata uzgoja i iznosila je $\mu=0,26 \text{ h}^{-1}$.



Slika 4. Promjena koncentracije supstrata (S), biomase (X) i etanola (EtOH) u eksperimentu s kvascem *K. marxianus* NRBC 1777 koji je proveden pri 40 °C na magnetskoj miješalici sa regulacijom temperature

Nadalje na slici 4. prikazani su rezultati uzgoja kvasca *K. marxianus* NRBC 1777 na temperaturi od 40 °C. U ovom eksperimentu stanice kvasca su u najkraćem roku postigle maksimalnu koncentraciju od 3 gL^{-1} , već nakon 1,5 sati nakon čega je koncentracija biomase ostala gotovo nepromijenjena što je također u skladu sa dosad provedenim istraživanjima koja imaju iste rezultate (Salvado, 2011). Što se tiče koncentracije etanola, ona je na kraju fermentacije iznosila oko 8 gL^{-1} . Prinos je iznosio $7,05 \text{ gL}^{-1}$, što je malo niža vrijednost u odnosu na prethodni eksperiment. Međutim tokom ovog uzgoja u tikvici zabilježena je najveća specifična brzina rasta od $0,36 \text{ h}^{-1}$. Bitno je napomenuti da se ovakav trend porasta specifične brzine rasta očekivao i u skladu je s literaturom (Salvado, 2011). Glukoza je u ovom eksperimentu bila gotovo u potpunosti utrošena.



Slika 5. Promjena koncentracije supstrata (S), biomase (X) i etanola (EtOH) u eksperimentu s kvascem *K. marxianus* NRBC 1777 koji je proveden pri 50 °C na magnetskoj miješalici sa regulacijom temperature

U posljednjem eksperimentu ovog završnog rada provedena je fermentacija YPD podloge uz pomoć kvasca na temperaturi od 50 °C. I u ovom eksperimentu glukoza je u potpunosti potrošena a uzgoj je trajao 5 sati. Zabilježena početna koncentracija bila je nešto niža od željenih 20 gL⁻¹. Koncentracija biomase nakon inicijalnog rasta stabilizirala se na vrijednosti oko 3 gL⁻¹ što je slična vrijednost kao i u eksperimentima pri nižim temperaturama. S obzirom da je proizvodnja etanola trajala dok god se supstrat u potpunosti nije potrošio, povećana koncentracija etanola i nedostatak kisika u podlozi imali su za posljedicu negativan utjecaj na rast biomase. Maksimalna koncentracija etanola određena u uzorcima iznosila je 7,5 gL⁻¹ dok je prinos u konačnici bio nešto niži i iznosio je $Y_P=5,75$ gL⁻¹. Što se tiče specifične brzine rasta, ona je na ovoj temperaturi imala najnižu vrijednosti ($\mu = 0,14$ h⁻¹) u usporedbi sa specifičnom brzinom rasta pri temperaturi od 40° C koja je iznosila 0,36 h⁻¹.

U tablici 3. prikazani su sumarno rezultati dobiveni uzgojem kvasca *K. marxianus* NRBC 1777 na YPD podlozi u anaerobnim uvjetima na magnetnoj miješalici pri različitim temperaturama. Iz usporedbe rezultata može se zaključiti da je najveća specifična brzina rasta zabilježena pri temperaturi 40 °C, dok je najveći prinos etanola ostvaren pri temperaturi 30 °C. Najniži prinos

etanola i najniža izmjerena specifična brzina rasta zabilježena je pri 50 °C. Dobiveni rezultati slažu se literaturnim podacima.

Tablica 3. Prikaz rezultata dobivenih uzgojem kvasca *K. marxianus* NRBC 1777 na YPD podlozi u anaerobnim uvjetima na magnetnoj miješalici pri različitim temperaturama.

T (°C)	20	30	40	50
$\mu_{\max\text{OBS}}$ (h ⁻¹)	0,20	0,26	0,36	0,14
Y _P (gL ⁻¹)	6,54	7,86	7,05	5,75

5. ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju pokazalo se da kvasac *K. marxianus* NRBC 1777 raste na svim odabranim temperaturama u rasponu od 20-50 °C.
2. Najveća specifična brzina rasta kvasca *K. marxianusa* NRBC 1777 određena je pri 40 °C te iznosi 0,36 h⁻¹, što je s obzirom da se radi o termo-tolerantnom kvascu u skladu s očekivanjima (Salvado i sur., 2011), ali i literaturnim navodima koja navode kako se najveća specifična brzina odvija upravo pri navedenoj temperaturi (Van Uden, 1985).
3. Također, kvasac je pokazao mogućnost proizvodnje etanola pri svim temperaturama od 20° C, 30° C, 40° C i 50° C, a prinos etanola je bio najviši pri 30 °C te iznosi 7,86 gL⁻¹.
4. S obzirom na navedeno, ovaj kvasac potencijalno bi se mogao koristiti u proizvodnji etanola pri višim temperaturama koje bi tada iznosile 30°C (Salvado i sur., 2011).

6. LITERATURA

1. Chang, Y. S., Dubin, R. A., Perkins, E., Michels, C. A., Needleman, R. B. (1989) Identification and characterization of the maltose permease in genetically defined *Saccharomyces* strain. *J. Bacteriol.* 171, 6148-6154.
2. Crumplen, R. M., Slaughter, J. C., Stewart, G. G. (1996) Characteristics of maltose transporter activity in an ale and large strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 231, 448–452
3. Day, R. E., Higgins, V. J., Rogers, P. J., Dawes I. W. (2002) Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast* 19(12), 1015-1027.
4. Fonesca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 339-354.
5. Fraenkel, D. G. (1982) Carbohydrate Metabolism. U: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: The Metabolism and Gene Expression* (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. R., ured.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str. 1–37.
6. Grba, S. (2010). *Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji, udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Plejada, Zagreb.*
7. Johnson, E. A., Echavarri-Erasun, C. (2011). *Yeast biotechnology. U: The Yeasts-A Taxonomic Study, 5. izd, (Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T., ured.), Elsevier, 1, str. 21.-44.*
8. Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P., Singh, A., Zhang, Y. H. P. (2011). Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renew. Sust. EnerG. Rev.*, 15 (9), 4950-4962.
9. Lane, M. M., Morrissey J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus: A yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biology Reviews, 24 (1-2): 17-26.*
10. Maaheimo, H., Fiaux, J., Cakar, Z. P., Bailey, J. E., Sauer, U., Szyperski, T. (2001) Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* 26(8), 2464-2479.
11. Madeira, J. V. , Gombert, A. K. (2018). Towards high-temperature fuel ethanol production using *Kluyveromyces marxianus*: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcane-based biorefinery. *Biomass and Bioenergy*, 119, 217-228.

12. Marčišauskas, S., Ji, B., Nielsen, J. (2019). Reconstruction and analysis of a *Kluyveromyces marxianus* genome-scale metabolic model. *BMC Bioinformatics*, 20 (551).
13. Novak, S., Marić, V. (1995) Transport i regulacija metabolizma ugljikohidrata kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: I. Glukoza, fruktoza i manoza. *Kemija u industriji* 44, 341-353.
14. Parachin, N. S., Bettiga, M. (2011). *Kluyveromyces marxianus*. Dostupno na mrežnoj stranici Science Directa: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/kluyveromyces-marxianus>
15. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2000). *Microbiology*, McGraw-Hill.
16. Rajkumar, A., Varela J. A., Juergens, H., Daran, J. M. (2019). Biological Parts for *Kluyveromyces marxianus* *Synthetic Biology*, Dostupno na mrežnoj stranici: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00097/full>
17. Salvado, Z., Arroyo-Lopez, F. N., Guillamon, J. M., Salazar, G., Querol, A., Barrio, E. (2011). Temperature Adaptation Markedly Determines Evolution within the Genus *Saccharomyces*. *American Society for Microbiology*, 77(7): 2292-2302.
18. Van Uden, N. (1985). Temperature Profiles of Yeast. *Advances in Microbial Physiology*, 25: 195-251.
19. Wang, X., Bali, M., Medintz, I., Michels, C. A. (2002) Intracellular maltose is sufficient to induce MAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 1, 696–703.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta