

Proizvodnja etanola s pomoću kvasaca iz roda *Spathaspora* na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe

Perković, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:186284>

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, prosinac 2020.

Lucija Perković
1273/BPI

**Proizvodnja etanola s pomoću
kvasaca iz roda *Spathaspora* na
hidrolizatima dobivenim
kiselinskom predobradom
izluženih rezanaca šećerne repe**

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

Rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkih projekata Bioprospecting Jadranskog mora “BioProCro” (KK.01.1.1.01.0002) i “Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina” (HRZZ-9717).

Prije svega, veliko hvala mentoru, doc. dr. sc. Mariu Novaku, na izrazito motivirajućoj i ugodnoj radnoj atmosferi, ali istovremeno stručnosti te nesebičnom prenošenju znanja prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te samog pisanja rada. Hvala vam što sam vam se bez ustručavanja uvijek mogla obratiti za bilo kakav savjet i daljnje usmjerenje.

Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Antoniji Trontel, asistentu Nenadu Marđetku i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na susretljivosti, strpljivosti, prenesenom znanju i ugodnoj radnoj atmosferi. Osobito se zahvaljujem prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na velikom stručnom vodstvu kroz cijeli diplomski studij.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene tijekom studiranja i bili mi velika podrška. Veliko hvala Ani s kojom sam podijelila sve lijepo trenutke perioda studiranja.

Naposljetku, najveće hvala mojoj obitelji i Petru, osobama za koje znam da su uvijek uz mene i bodre me kroz svaku novu životnu epizodu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Proizvodnja etanola s pomoću kvasaca iz roda *Spathaspora* na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe

Lucija Perković 1273/BPI

Sažetak: Kvasci iz roda *Spathaspora*, uz heksoze (glukoza, galaktoza, manozu) mogu rasti i na pentozama te se iz tog razloga sve više istražuju u bioprocima proizvodnje bioetanola i vrijednih biokemikalija kao što su šećerni alkoholi na lignoceluloznim sirovinama. U ovom radu provedena je kiselinska predobrada izluženih rezanaca šećerne repe u rasponu temperatura od 160 °C do 200 °C i vremenima zadržavanja od 1 do 10 minuta. Maksimalni udio ukupnih ugljikohidrata u hidrolizatu nakon predobrade određen je pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute. Dobiveni hidrolizati s visokim udjelom ukupnih ugljikohidrata (160 °C/5 min, 180 °C/5 min, 180 °C/10 min, 200 °C/1 min i 200 °C/ 5 min) korišteni su za bioproc proizvodnje etanola i šećernih alkohola s pomoću kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u mikroaerofilnim uvjetima. Navedeni kvasci u ispitivanim uvjetima proizvode etanol i šećerne alkohole u hidrolizatima dobivenim nakon predtretmana pri 160 °C/5 min i 180 °C/5 min. Tijekom uzgoja na hidrolizatima dobivenim pri 180 °C/10 min, 200 °C/1 min i 200 °C/5 min nije zamijećen rast niti jednog kvasca.

Ključne riječi: izluženi rezanci šećerne repe, ne-*Saccharomyces* kvasci, etanol, šećerni alkoholi

Rad sadrži: 61 stranicu, 14 slika, 10 tablica, 98 literaturnih referenci

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. Mario Novak

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

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Datum obrane: prosinac, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Ethanol production by yeasts from genus *Spathaspora* on hydrolysates obtained by acid pretreatment of leached sugar beet chips

Lucija Perković 1273/BPI

Abstract: *Yeasts of the genus *Spathaspora* can grow on pentose sugars, in addition to hexose sugars such as glucose, galactose and mannose. Therefore, they are being increasingly investigated for bioprocess production of bioethanol and valuable biochemicals such as sugar alcohols, primarily from lignocellulosic raw materials. In this paper, leached sugar beet chips were treated with diluted acid in the temperature range from 160 °C to 200 °C and retention time from 1 to 10 minutes. Highest amount of total carbohydrates in the hydrolyzate was determined at a temperature of 200 °C and retention time of 1 minute. The rest of the obtained hydrolyzates with high amount of total carbohydrates (160 °C/5 min, 180 °C/5 min, 180 °C/10 min, 200 °C/1 min and 200 °C/5 min) were used to produce ethanol and sugar alcohols using yeasts *Spathaspora arborariae* CBS 11463 and *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 under microaerophilic conditions. These yeasts were showing growth under specific conditions on hydrolyzates obtained after pretreatment method under 160 °C/5 min and 180 °C/5 min. As for hydrolyzates obtained at 180 °C/10 min, 200 °C/1 min and 200 °C/5 min, no yeast growth was detected there.*

Keywords: leached sugar beet chips, Non-*Saccharomyces* yeasts, ethanol, sugar alcohols

Thesis contains: 61 pages, 14 figures, 10 tables, 98 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Mario Novak, Assistant professor

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

Reviewers:

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

Paper defended: December, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. OBNOVLJIVI IZVORI SIROVINA.....	4
2.1.1. Energetski usjevi	4
2.1.2. Lignocelulozne sirovine	5
2.1.3. Izluženi rezanci šećerne repe.....	7
2.2. BIOGORIVA I BIOKEMIKALIJE IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA.....	9
2.3. MIKROORGANIZMI U PROIZVODNJI BIOETANOLA I BIOKEMIKALIJA.....	12
2.3.1. Bakterije u proizvodnji bioetanola	12
2.3.2. Kvasci u proizvodnji bioetanola i biokemikalija	14
2.3.3. Ne-Saccharomyces kvasci.....	15
2.3.4. Kvasci roda Spathaspora.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Sirovina	18
3.1.2. Radni mikroorganizam	18
3.1.3. Kemikalije.....	18
3.1.4. Hranjive podloge	19
3.1.5. Aparatura i pribor.....	20
3.2. METODE RADA.....	22
3.2.1. Određivanje sastava početne sirovine za kiselinsku predobradu u visokotlačnom reaktoru	22
3.2.2. Predobrada lignocelulozne sirovine	22
3.2.3. Priprema hranjivih podloga.....	22
3.2.4. Uzgoj kvasaca Spathaspora arborariae CBS 11463 i Spathaspora passalidarum CBS 10155	24
3.3. ANALITIČKE METODE	24
3.3.1. Određivanje suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini.....	24
3.3.2. Određivanje udjela topivog lignina.....	25
3.3.3. Određivanje udjela netopivog lignina.....	25
3.3.4. Određivanje ukupnih furana	26
3.3.5. Određivanje optičke gustoće uzorka.....	26
3.3.6. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca	26
3.3.7. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)	27
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI BIOPROCESA.....	27
3.4.1. Prinos biomase (Y_x)	27
3.4.2. Prinos produkta (YP).....	28
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{x/s}$)	28
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{p/s}$)	28
3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_{glc}).....	28
3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_p)	28
3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m).....	28
3.4.8. Produktivnost (Pr)	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. KISELINSKA PREDOBRAĐA IZLUŽENIH REZANACA ŠEĆERNE REPE U VISOKOTLAČNOM REAKTORU PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA I VREMENIMA ZADRŽAVANJA.....	31
4.2. UZGOJ KVASACA SPATHASPORA ARBORARIAE CBS 11463 I SPATHASPORA PASSALIDARUM CBS 10155 NA YPD PODLOZI PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA (20 °C, 30 °C, 40 °C I 50 °C) U MIKROAEROFILNIM UVJETIMA	36

4.3. UZGOJ NE-SACCHAROMYCES KVASACA U MODELNIM PODLOGAMA I NA HIDROLIZATU IZLUŽENIH ŠEĆERNIH REZANACA S CILJEM PROIZVODNJE KSILITOLA I ARABITOLA	41
4.3.1. Uzgoj kvasaca <i>Spathaspora arborariae</i> CBS 11463 i <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155 u modelnoj YP podlozi	41
4.3.2. Uzgoj kvasaca <i>Spathaspora arborariae</i> CBS 11463 i <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155 na hidrolizatima izluženih rezanaca šećerne repe	43
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA	50

1. UVOD

Otprilike 84 milijuna barela sirove nafte dnevno koristi se u transportnom i energetskom sektoru. Procjenjuje se kako će taj broj porasti na 116 milijuna barela sirove nafte do 2030. godine (Ahorsu i sur., 2018). U ovom trenutku globalna potrošnja fosilnih goriva kao primarnog izvora energije iznosi 13,865 milijuna tona nafte što je ekvivalentno godišnjem rastu od 2,9 % (Karagoz, 2019). Unatoč tome, korištenje obnovljive energije iz obnovljivih sirovina značajno je porasla. U 2018. godini narasla je za 14 %, što obuhvaća 9 % svjetske opskrbe električnom energijom.

Lignocelulozna sirovina se sve više primjenjuje kao alat u svrhu potiskivanja fosilnih goriva iz upotrebe. Poljoprivredni ostaci, drvni ostaci, ostaci prehrambene industrije, kao i organski otpad pritom su obećavajuće, ekološki prihvatljive alternative, za proizvodnju biogoriva i biokemikalija sa širokom primjenom u biomedicini, farmaciji, kozmetičkoj industriji te industriji proizvodnje različitih oblika energije (Okolie i sur., 2020).

Obnovljive lignocelulozne sirovine sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, pritom čineći vrlo kompaktnu strukturu. Celuloza je homopolimer glukoze, dok se hemiceluloza sastoji od heksoznih šećera glukoze, manoze i galaktoze te pentoznih šećera ksiloze i arabinoze (Hayn i sur., 1993), pritom čineći vrlo vrijedan supstrat za fermentacijske mikrobne procese. Kako bi se uklonio lignin, povećala poroznost lignocelulozne sirovine i smanjila kristaličnost celuloze potrebno je provesti odgovarajući predtretman lignocelulozne sirovine. U tom koraku oslobađaju se prethodno navedeni šećeri koje u fermentacijskim procesima mogu koristiti odgovarajući mikroorganizmi (Marđetko i sur., 2018).

Ne-Saccharomyces kvasci pritom pokazuju karakteristike poželjne za industrijsku primjenu u proizvodnji biogoriva i biokemikalija kao što su korištenje različitih ugljikohidrata iz podloge (uključujući heksoze i pentoze), toleranciju na stresne uvjete te inhibitore koji se oslobađaju u koraku predtretmana lignocelulozne sirovine (Lane i sur., 2011). Kvasci roda *Spathaspora*, sposobni fermentirati pentozne

šećere, pritom se sve više istražuju u svrhu proizvodnje bioetanolu i vrijednih biokemikalija kao što su šećerni alkoholi ksilitol i arabitol (Cadete i sur., 2017).

U ovom radu proveden je kemijski predtretman hidrolize lignocelulozne sirovine izluženih reznaca šećerne repe uz pomoć razrijeđene sumporne kiseline u svrhu oslobađanja fermentabilnih šećera koji, nakon predobrade, zaostaju u tekućem hidrolizatu. Hidrolizati s detektiranim najvišim koncentracijama ugljikohidrata dalje su se koristili kao hranjiva podloga za uzgoj kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 s ciljem proizvodnje etanola i šećernih alkohola ksilitola i arabitola u mikroaerofilnim uvjetima. Za usporedbu, proveden je uzgoj kvasaca na modelnim, YP podlogama, s dodatkom glukoze, ksiloze i arabinoze, simulirajući tako sastav podloge hidrolizata lignocelulozne sirovine. Također, određena je optimalna temperatura za uzgoj navedenih kvasaca tako što su se na YPD podlogama oba kvasca uzgajali pri temperaturnom rasponu od 20 °C do 50 °C.

2. TEORIJSKI DIO

Ograničeni prirodni resursi sirove nafte i ostalih fosilnih goriva u kombinaciji s njihovim dugogodišnjim negativnim učinkom na okoliš, rezultiraju porastom financijskih ulaganja u obnovljive izvore energije. Cilj investicija jest zamjena industrije ugljikovodika s industrijom temeljenom na ugljikohidratima. Takav pristup u središte stavlja lignocelulozu i iskorištavanje biomase kao početnog supstrata za proizvodnju biogoriva i biokemikalija (Lange, 2007).

Biogoriva predstavljaju obećavajuću alternativu za fosilna goriva uzimajući u obzir da se njihovom sintezom i korištenjem reducira emisija stakleničkih plinova. Jedan od najznačajnijih predstavnika je bioetanol koji se kao gorivo može koristiti bez modifikacija na motoru (Thangavelu i sur., 2016) ukoliko se miješa s benzinom u rasponu od 3 % do 20 % (Roy i Dutta, 2019). Također, kako posjeduje visoke koncentracije kisika u sastavu, postiže veći stupanj izgaranja goriva te tako snižava koncentraciju ugljikovog monoksida u ispušnom plinu (Morales i sur., 2014). Američka uprava za energetske informacije iznijela je podatak o značajnom povećanju proizvodnje i potrošnje bioetanola u periodu od 2006. do 2018. godine, za čak 60 %. Vodeći proizvođači bioetanola u ovom trenutku su Sjedinjene Američke Države, koje bioetanol proizvode iz kukuruza i pšenice te Brazil, čija se proizvodnja etanola temelji na resursima šećerne trske (Roy i Dutta, 2019). Brazil i SAD zajedno bilježe približno 90 % svjetske proizvodnje bioetanola (Branco i sur., 2019). Proizvodnja bioetanola bazira se na 3 glavne kategorije izvora biomase: šećer kao primarni izvor (šećerna repa, šećerna trska, slatki sirak) (Zabed i sur., 2017; Balat, 2011), škrob kao sekundarni izvor (kukuruz, pšenica) (Mohapatra i sur., 2017) i lignocelulozna sirovina kao tercijarni izvor (otpad iz područja agroindustrije, drve industrije te industrije hrane) (Zhao i sur., 2018; Hafid i sur., 2017).

Osim za proizvodnju biogoriva, lignocelulozna biomasa primjenjuje se u svrhu proizvodnje biokemikalija poput šećernih alkohola, aromatskih spojeva i pojačivača okusa (Okolie i sur., 2020). Većina proizvodnje biokemikalija još uvijek svoje uporište ima u iskorištavanju fosilnih goriva odnosno prirodnog plina zbog dostupnosti i još uvijek relativno pristupačne cijene. No porast u cijeni tih lako dostupnih sirovina, kao i porast sve veće toksičnosti za okoliš okreću proizvodnju kemikalija u smjeru

iskorištavanja lokalno dostupnih obnovljivih izvora lignocelulozne biomase. Ovakav prijelaz ima velik prostor za napredak u energetske i ekonomskom smislu. U usporedbi s količinom studija koje se fokusiraju na energiju dobivenu iz obnovljive biomase, relativno malo pozornosti je posvećeno mogućnosti zamjene postojećih petrokemikalija s kemikalijama proizvedenim iz obnovljivih materijala. Pritom biomasa predstavlja jedini obnovljivi izvor bogat ugljikom za proizvodnju biokemijskih proizvoda. Održiva upotreba takvih sirovina sugerira integriranu proizvodnju u biorafinerijama čiji se koncept rada bazira na tehnologijama koje razdvajaju obnovljivu biomasu (poljoprivredni ostaci, drvni ostaci,...) na njene gradivne komponente (ugljikohidrati, proteini, masti,...) koje se mogu pretvoriti u proizvode s dodanom vrijednosti: biogoriva i biokemikalija (Okolie i sur., 2020).

2.1. OBNOVLJIVI IZVORI SIROVINA

2.1.1. Energetski usjevi

Šećerna repa i šećerna trska glavni su predstavnici ove skupine jer u svom sastavu sadrže značajne količine saharoze koja se može koristiti u proizvodnji bioetanola. Iziskuju manje manipulacije te samim time smanjuju troškove jer u proizvodnji izostaje metoda predtretmana sirovine, korak specifičan kod obrade škrobnih sirovina (Vohra i sur., 2014). Velika potražnja za bioetanolom na svjetskom tržištu ne može se zadovoljiti resursima i proizvodnjom na bazi šećerne repe i šećerne trske. Stoga se kao alternativa primjenjuju sirovine na bazi škroba među kojima je glavni predstavnik kukuruz zbog visoke koncentracije škroba u kukuruznom zrcu (Watson, 2003). Sljedeća, široko primjenjiva škrobna sirovina je pšenica dok je primjena ostalih usjeva žitarica otežana zbog onečišćenja fenolnim spojevima (Wong i sur., 2009).

Proizvodnja bioetanola iz navedenih primarnih izvora biomase natječe se za ograničeno obradivo zemljište namijenjeno proizvodnji hrane za ljudsku upotrebu i stočnu hranu. Stoga se proizvodnja bioetanola okreće ka povoljnijim izvorima sirovina, odnosno sekundarnim izvorima biomase u koje spadaju poljoprivredni ostaci, ostaci drvne industrije, ostaci prehrambene industrije, pa čak i komunalni otpad (Ivančić-Šantek i sur., 2016).

2.1.2. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine predstavljaju najzastupljeniji oblik biomase u svijetu te samim time i najveći izvor obnovljivog materijala. Iako obnovljivi izvori energije trenutno zauzimaju manje od 20 % svjetske potražnje za energijom, do 2035. godine se očekuje da taj udio dosegne brojku od 30 % (Matsuo i sur., 2013). Također, potrebno je naglasiti kako približno 70 % troškova proizvodnje bioetanolu proizlazi iz segmenta nabavke sirovina (Smuga-Kogut i sur., 2019).

Poljoprivredni ostaci kao što su stabljika i klipovi kukuruza, sijeno, otpatci prerade šećerne repe i trske te stabljike riže i pšenice, potencijalni su izvori za proizvodnju bioetanolu. Karakterizira ih visoka razina dostupnosti i brojni ciklusi berbe kroz samo jednu fazu sadnje. Na godišnjoj razini se ubire 350 do 450 milijuna tona usjeva, što generira ogromne količine poljoprivrednog otpada (Liyamen i Ricke, 2012). Za usporedbu, cijena šećerne trske i kukuruza iznosi 60,9 USD/t, odnosno 185,9 USD/t, dok cijene ostataka iz prerade šećerne trske i kukuruza iznose 36,4, odnosno 58,5 USD/t (Rosales-Calderon i Arantes, 2019). Organski otpad iz komunalnog čvrstog otpada pokriva drugi segment jeftinog i lako dostupnog izvora biomase koji je prikupljen iz raznih industrija ili velikog broja kućanstava. Iako se tretiraju kao otpad, organski ostaci su vrijedan izvor šećera, lipida i proteina koji se mogu iskoristiti uz djelovanje mikroorganizama (Lynd, 2017). Ostaci šumarske industrije obuhvaćaju biomasu koja nije iskorištena ili uklonjena iz komercijalne proizvodnje tvrdog i mekog drva kroz postupke gospodarenja šumama. Otpad šumarske industrije uključuje piljevinu i koru te može osigurati do 65 % energetskog potencijala biomase (Lynd, 2017). U tablici 1 prikazani su izvori lignocelulozne biomase i njihov sastav prikazan kao udio suhe tvari biomase.

Tablica 1. Izvori lignocelulozne biomase i njihov sastav

Biomasa	Hemiceluloza (%)	Celuloza (%)	Lignin (%)
Poljoprivredni ostaci	25- 50	37- 50	5- 15
Tvrdo drvo	25- 40	45- 47	20- 25
Meko drvo	25- 29	40- 45	30- 60
Otpadne trave	35- 50	25- 40	-
Organski otpad	21-24	15-17	14-16

Iako predstavlja lako dostupan i jeftin izvor obnovljive energije, lignoceluloza se kao sirovina još uvijek rijetko koristi zbog svoje strukture i fizikalno-kemijskih svojstava. Lignoceluloza u svom sastavu najvećim dijelom sadrži celulozu, hemicelulozu te lignin, dok su pektin, proteini, ekstraktivne tvari i pepeo prisutni u manjim količinama. Udio pojedine tvari razlikuje se ovisno o vrsti lignocelulozne sirovine (Matoković, 2018). Celuloza je dugolančani homopolimer izgrađen od niza D-glukočnih jedinica povezanih β -1,4 glikozidnim vezama. Zbog velikog broja vodikovih mostova koje tvore hidroksilne skupine, celulozu karakterizira kristalična struktura. Hemiceluloza je heterogeni polimer šećera i šećernih derivata koji zajedno formiraju razgranatu mrežu. Monomeri koji izgrađuju takav sustav su heksoze u koje spadaju glukoza, galaktoza i manozna te pentoze u koje spadaju ksiloza i arabinoza. Obzirom na razgranatost, hemicelulozu karakterizira amorfnost struktura što ju čini podložnijom djelovanju kiselina, lužina i enzima. Lignin je vrlo složen heteropolimer koji se sastoji od fenolnih spojeva i njihovih derivata. Strukturno povezuje celulozna i hemicelulozna vlakna te tako osigurava čvrstu fiziološku potporu biljkama (Hayn i sur., 1993). Obzirom na znatne količine šećera koje sadrži u svom sustavu, lignoceluloza je kao sirovina iskoristiva za proizvodnju biogoriva, točnije proizvodnju etanola druge generacije i ostalih biomaterijala (Isikgor i Becer, 2015).

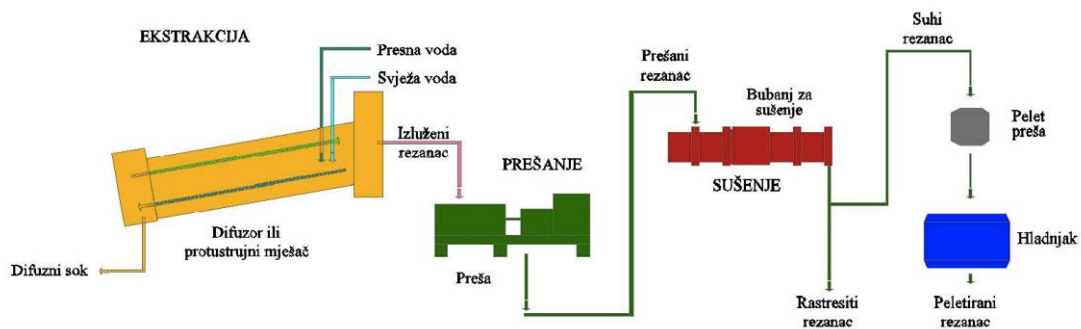
Predobrada je prvi korak u iskorištavanju lignoceluloznih sirovina u svrhu generiranja fermentabilnih šećera. Cilj predobrade je odvajanje lignina od celuloze i hemiceluloze, smanjenje kristaličnosti celuloze i povećanje poroznosti materijala kako bi hidrolitički enzimi mogli pristupiti svojim supstratima (celulozi i hemicelulozi) u

enzimskim hidrolizama koje slijede nakon predtretmana (Su i sur., 2015). Metode predtretmana mogu se podijeliti u sljedeće kategorije: fizikalne u koje spadaju mehaničko usitnjavanje i mljevenje, piroliza i gama zračenje; fizikalno-kemijske u koje spadaju predobrada parom, hidrotermoliza i mokra oksidacija; kemijske u koje spadaju alkalna i kemijska hidroliza, ozonoliza, upotreba oksidirajućih sredstava i organskih otapala te biološke metode koje se provode pomoću mikroorganizama i enzima (Kumar i sur., 2009). U ovom radu primjenjena je metoda kemijske predobrade lignocelulozne sirovine prilikom koje se koristila razrijeđena otopina sumporne kiseline pri visokim temperaturama (140 °C-200 °C). Sumporna kiselina pri višim temperaturama razgrađuje hemicelulozu što rezultira raspadaanjem čvrste lignocelulozne strukture. Većina hemiceluloze razgrađuje se do šećera koji prelaze u tekuću fazu, dok celuloza ostaje prisutna u krutoj fazi. Glavni nedostatak predtretmana razrijeđenom sumpornom kiselinom formiranje je kemikalija kao što su furfurali koji djeluju inhibirajuće na sljedeću enzimsku hidrolizu i mikrobiološku fermentaciju (Zhang i sur., 2015).

2.1.3. Izluženi rezanci šećerne repe

Šećerna repa uzgaja se i prerađuje u gotovo svim zemljama Europske Unije što ukazuje na široko rasprostranjenu i razvijenu industriju proizvodnje šećera koja je zaslužna za održavanje lokalnog gospodarstva u mnogim ruralnim područjima (Balat, 2011).

Nusproizvodi prilikom obrade šećerne repe uključuju pulpu šećerne repe i lišće šećerne repe. Jedna tona šećerne repe u prosjeku generira 500 kg njene pulpe (Mesbahi i sur., 2005). Pulpa se nakon tretmana parom preša i/ili suši te se u obliku izluženih rezanaca šećerne repe na tržištu prodaje kao stočna hrana (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz dobivanja izluženih rezanaca šećerne repe iz procesa proizvodnje šećera (Anonymus, 2020)

Izluženi rezanci šećerne repe sastoje se od različitih polisaharida (najviše pektina (20-30 %), celuloze (44 %) i hemiceluloze (24 %), koji su prisutni u puno većoj koncentraciji nego lignin (2-4 %). Preostali udio zauzimaju proteini (7-10 %) i pepeo (5 %). Izluženi rezanci šećerne repe moraju se, prije fermentacije, podvrgnuti tretmanu predobrade kako bi se povećala površina celuloze i omogućila učinkovitija hidroliza biomase s pomoću enzima. Primjerice, jedan od načina predobrade je eksplozija parom pomoću vruće vode u uvjetima visokog tlaka. Naglim spuštanjem tlaka, sirovina se podvrgava eksplozivnoj dekompresiji, oslobađajući pritom topljive komponente pektina u vodeni medij. Zaostala netopiva frakcija celuloze, pulpa, može se koristiti za daljnju proizvodnju bioetanola (Zhang i sur., 2015). Također, celuloza i hemiceluloza mogu se do jednostavnijih šećera hidrolitički razgraditi pomoću celulaza, odnosno hemicelulaza. Osim upotrebe enzima, rezanci šećerne repe mogu se i kemijski obrađivati u svrhu dobivanja jednostavnih šećera. Primjerice, koristeći predtretman pomoću sumporne kiseline, gdje se s fermentirajućim šećerima ujedno oslobađaju i drugi spojevi (Rahman i sur., 2007). Razgradnjom acetilne strukture hemiceluloze oslobađaju se organske kiseline, poput octene kiseline. Furanski spojevi, poput furfurala i 5-hidroksimetilfurfurala (5-HMF) nastaju dehidracijom šećera pentoze i heksoze. Razgradnjom lignina dolazi do oslobađanja fenolnih spojeva (Jönsson i Martin, 2016; Almeida i sur., 2007). Nastali spojevi u fermentacijskim procesima mogu djelovati kao inhibitori staničnog mikrobnog metabolizma (Prasad i sur., 2019). Procesi koji kombiniraju kemijsku predobradu te simultanu enzimsku hidrolizu i fermentaciju pokazuju visoku učinkovitost te snižuju troškove proizvodnje. Zbog toga takvi procesi postaju sve zanimljiviji za istraživanje i daljnje razvijanje. Patelski i sur. (2015) utvrdili su učinkovitost istodobne saharifikacije i fermentacije (86 %-tno poklapanje

fermentacijske učinkovitosti s teoretskom) primjenjujući najprije termičku obradu pulpe šećerne repe (121 °C kroz 30 minuta) u mediju s 2 %-tnom otopinom sumporne kiseline nakon kojeg slijedi postupak enzimske hidrolize. Prema njihovom istraživanju je dokazano da vremenski interval od 6 sati između početka enzimske hidrolize i inokulacije određenim sojem mikroorganizama može poboljšati fermentacijske procese zbog progresivnog oslobađanja fermentabilnih šećera heksoza i pentozna. Rezić i sur. (2016) kombinirali su termički predtretman pulpe šećerne repe (121 °C kroz 30 minuta), enzimsku hidrolizu pomoću pektinaza i celulaza kroz 22 sata i naposljetku fermentaciju s pomoću kvasca *S. cerevisiae* te u konačnici postigli prinose etanola 0,10 g etanola g⁻¹ osušene pulpe šećerne repe. Prijašnja istraživanja bilježe prinose etanola u intervalu od 0,04 do 0,06 g g⁻¹ osušene pulpe šećerne repe (Micard i sur., 1997). Niski prinosi mogu se pritom pripisati specifičnom kemijskom sastavu pulpe šećerne repe.

2.2. BIOGORIVA I BIOKEMIKALIJE IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Najnovije strategije proizvodnje energije okreću se primjeni takozvanog cirkularnog procesa koji favorizira potpuno iskorištavanje nusprodukata iz različitih industrija. Strategija se zasniva na razvoju integriranih biorafinerija prilikom čega se sirovi materijali koriste kao biomasa za proizvodnju goriva, kemikalija i energije s ciljem smanjenja ovisnosti o fosilnim gorivima što značajno pridonosi održivosti svjetskog gospodarstva i usporavanju globalnih klimatskih promjena (Liguori i Faraco, 2016; Mohan i sur., 2016). Biogoriva se mogu nalaziti u tekućem agregatnom stanju kao primjerice bioetanol, biobutanol, bioulje, biodizel i plinovitom agregatnom stanju kao primjerice bioplin, biometan i biovodik. Navedeni proizvodi sintetiziraju se termokemijskim postupcima poput pirolize, ukapljivanja, različitih sinteza i transesterifikacija ili primjenom biotehnoških postupaka koji uključuju enzimske hidrolize, fermentacije i anaerobne digestije (Parakh i sur., 2020; Nanda i sur., 2016; Kamm 2007).

Etanol proizveden biotehnoškim postupkom može se miješati u adekvatnom omjeru s benzinom i tako koristiti kao gorivo za transport. U usporedbi s konvencionalnim gorivima, bioetanol ima brojne prednosti. U svom sastavu sadrži 35 %-tnu frakciju kisika, što poboljšava izgaranje bioetanola i minimizira emisiju CO, NO, NO_x čestica i ugljikovodika u okolišnom zraku (Kim i Dale, 2004). Proizvodnja

bioetanola iz primarnih izvora biomase, odnosno sirovina na bazi šećera ili škroba negativno utječe na svjetsku ekonomiju jer preusmjerava proizvodnju energetskih usjeva prema dobivanju transportnih sredstava umjesto proizvodnji hrane za svjetsku populaciju. Upravo je zbog toga proizvodnja bioetanola iz neprehrambenih izvora, odnosno iz lignocelulozne biomase privukla pozornost zbog benefita u ekonomskom i ekološkom segmentu.

Biobutanol se proizvodi kao alternativa bioetanolu zbog svojih superiornih svojstava goriva i visokog udjela energije koja je za 30 % viša u odnosu na bioetanol. Za razliku od bioetanola, biobutanol se može u postojećim motorima vozila koristiti u samostalnom obliku zbog svoje nehigroskopske prirode sprječavajući tako smrzavanje dijelova motora i niskog tlaka pare što ga čini sigurnim za upotrebu (Sarangi i Nanda, 2020). Iako bioetanol i biobutanol zajedno čine perspektivna goriva, njihov proizvodni proces uvelike ovisi o postupcima izdvajanja proizvoda iz proizvodne smjese koji iziskuju velike količine energije (Nanda i sur., 2018). Dok se bioetanol može izdvojiti destilacijom, odvajanje biobutanola je puno izazovnije i dugotrajnije što ga u konačnici čini skupljim proizvodom.

Biodizel je obnovljivo, netoksično i ekološki prihvatljivo gorivo koje se može koristiti u dizelskim motorima bez preinaka motora (Reddy i sur., 2016). Jedan od najčešćih postupaka proizvodnje iz lignoceluloznih sirovina je reverzibilna reakcija transesterifikacije iz koje kao proizvodi izlaze esteri masnih kiselina i glicerol (Srivastava i Prasad, 2000). U novije vrijeme, istražuje se proizvodnja biodizela iz sirovog ulja rižinih mekinja (Shiu i sur., 2010) i proizvodnja reakcijom transesterifikacije iz mulja papirnica kao početne sirovine (Deeba i sur., 2015).

Biometan je obećavajuće biogorivo zbog svoje velike kalorifске vrijednosti, male gustoće i velike energetske učinkovitosti. Može se proizvesti iz različitih izvora biomase postupcima anaerobne digestije. Koristi se kao zamjena za prirodni plin dobiven iz fosilnih goriva za kombiniranu proizvodnju topline i električne energije. Pokazuje slična svojstva kao prirodni plin u pogledu potrošnje, performansi motora i učinkovitosti kao pogonsko gorivo (Khan i sur., 2017). Sličan biometanu, sintetički plin može se koristiti za proizvodnju električne energije s visokom učinkovitosti ili kao čisto transportno gorivo. Proizvodnja vodika, plina s izuzetno visokim udjelom energije, iz

lignocelulozne biomase dobiva se fotofermentacijom i tamnom fermentacijom, postupcima proizvodnje u prilagođenim uvjetima i s pravim izborima mikroorganizama (Rapagna i sur., 2002).

Lignocelulozna biomasa sve više se pokazuje kao koristan supstrat za proizvodnju kemikalija dodane vrijednosti jer u svom sastavu sadrži značajne udjele celuloze, hemiceluloze i lignina. Većina aromatskih spojeva proizvodi se termokemijskom razgradnjom lignina zbog njegove aromatičnosti, dok se celuloza i hemiceluloza mogu termički nadograditi na alifatske spojeve male molekulske mase. Enzimskom ili kemijskom hidrolizom celuloze proizvodi se glukoza, koja se dalje nadograđuje do sinteze kemikalija poput levulinske kiseline i 5-hidroksimetilfurfurala, obećavajućeg spoja za proizvodnju različitih organskih kemikalija visoke vrijednosti, aromatičnih spojeva i aditiva za gorivo (Alonso i sur., 2013).

Šećerni alkohol ksilitol važna je kemikalija koja nastaje hidrolizom hemiceluloze i njenih derivata, poput ksiloze, ksilana, arabinoze i drugih šećera, koji su topljivi u razrijeđenim kiselinama. U prehrani se primjenjuje kao alternativa saharozi u zaslađivačima hrane za dijabetičare, vitaminskim tabletama za žvakanje i u žvakaćim gumama. Također se primjenjuje u industriji proizvodnje tankih površinskih premaza (Rahman i sur., 2007). Zauzima široku primjenu u stomatologiji jer ulazi u formulaciju pasti za zube, služi kao antimikrobni agens prilikom zubnih manipulacija te kao vodica za ispiranje usta (Kumar i sur., 2008). Proizvodnja ksilitola postupkom redukcije kemikalija ograničena je upotrebom skupih katalizatora i metoda pročišćavanja (Saha, 2003). Iz tog razloga se postupak mikrobne fermentacije postavlja kao obećavajući alternativni put proizvodnje.

Arabitol je sladak i bezbojan šećerni alkohol koji, kao i ksilitol, svoju primjenu nalazi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Koristi se najčešće kao antimikrobni agens prilikom zubnih manipulacija u stomatologiji te kao sredstvo za redukciju adipoznog tkiva (Kumdam i sur., 2014). Iako se trenutna proizvodnja arabitola bazira na reakciji redukcije laktona koja zahtijeva temperature više od 100 °C i skupi katalizator, sve više se istražuje primjena biotehnoloških procesa proizvodnje kako bi se dobivanje ovog produkta okrenulo ekonomičnoj i ekološki prihvatljivijoj alternativni (Kordowska-Wiater i sur., 2012).

Osim ksilitola i arabitola, vrijedne kemikalije iz lignocelulozne biomase su vanilin i galna kiselina koje predstavljaju početne monomere u proizvodnji različitih polimera, poliestera, epoksi materijala i polikarbonata (Cetera i sur., 2018). Vanilin se proizvodi depolimerizacijom lignina (Fache i sur., 2016) te nalazi svoju primjenu u prehrambenoj industriji kao pojačivač okusa, u farmaceutskoj industriji proizvodnje lijekova i proizvodnje antipjeniča (Kumar i Pruthi, 2014). Galna kiselina koristi se kao antioksidans u formulaciji čajeva, u papirnoj industriji kao sastojak tinte te u popularnoj industriji samotamnjenja (Zanwar i sur., 2013). Furfural je kemikalija s godišnjom proizvodnjom od 250 000 tona nastalom iz hidroliza poljoprivrednih i drvnih ostataka koncentriranom sumpornom kiselinom (Gallezot, 2012). Koristi se u procesu pročišćavanja ulja za podmazivanje te kao intermedijer za proizvodnju važnih kemikalija poput furana, furfural alkohola i tetrahidrofurana (Lichtenthaler, 2002).

Kako bi se lignocelulozna biomasa koristila što učinkovitije, posebno je procese proizvodnje što više usmjeravati ekološki prihvatljivim postupcima, uzimajući istovremeno u obzir ekonomski aspekt cjelokupnog procesa.

2.3. MIKROORGANIZMI U PROIZVODNJI BIOETANOLA I BIOKEMIKALIJA

Proizvodni troškovi bioetanola i biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina još uvijek su visoki te takav način proizvodnje još nije komercijalno primjenjiv (Duwe i sur., 2019; Lennartsson i sur., 2014). Trenutno se proizvodnja bioetanola druge generacije razvija u fazi pilot postrojenja. Za ostvarenje takve proizvodnje potrebno je razviti mikrobne sojeve koji mogu rasti i proizvoditi etanol iz glukoze i ksiloze, koji su glavni fermentabilni šećeri generirani tijekom postupka hidrolize lignocelulozne sirovine. Ostali šećeri koji se također oslobađaju u istom postupku su fruktoza, manoza, galaktoza i pentozni šećer arabinoza (Ruchala i sur., 2019).

2.3.1. Bakterije u proizvodnji bioetanola

Bakterija *Escherichia coli*, fakultativni anaerob, dugi niz godina se pokazuje kao obećavajući mikroorganizam u proizvodnji bioetanola. Modificiran je tako da može sintetizirati različite kemikalije, među njima i etanol. Najvažnija karakteristika ovog mikroorganizma u proizvodnji bioetanola njegova je sposobnost apsorbiranja različitih

izvora ugljika. Unatoč svojstvenim prednostima, postoje prepreke za industrijsku proizvodnju: sposobnost rasta samo u uskom području pH, oko neutralnog; manje robustan mikroorganizam u usporedbi s kvascima; karakteristična biotoksičnost (Bajwa i sur., 2010); osjetljivost u prisutnosti etanola i inhibitora (Cadiere i sur., 2011); formiranje inkluzijskih tijela (Clifton i Fraenkel, 1981) te nemogućnost iskorištavanja polisaharida. *E. coli* se iz navedenih razloga genetički manipulira ne bi li se povećala tolerancija na etanol i inhibitore te potaknula proizvodnja celulaze i hemicelulaze (Prasad i sur., 2019).

Zymomonas mobilis je detaljno istraživana bakterija kao potencijalni proizvođač bioetanola. Visoka apsorpcija šećera iz podloge, rast pri niskim pH vrijednostima, visoka sposobnost tolerancije na etanol i supstrate te dobar fermentacijski učinak čine ga odličnim kandidatom za primjenu u industrijskoj proizvodnji etanola. Ono što je kod ovog mikroorganizma osobito izraženo je tolerancija na visoke koncentracije etanola u podlozi (Haurie i sur., 2001). Identificirani su geni odgovorni za tu toleranciju (Hawkins i sur., 2013). Unatoč prednostima, glavni nedostatak je nemogućnost fermentacije pentoznih šećera dobivenih hidrolizom lignoceluloznih sirovina (Hector i sur., 2008). Zbog toga se razvoj ovog mikroorganizma okreće genetičkim manipulacijama kako bi mogao previrati pentoze i kako bi proizvodio enzime za razgradnju lignoceluloze i škroba (Prasad i sur., 2019).

Clostridium thermocellum je anaerobna, termofilna i Gram-pozitivna bakterija s mogućnosti proizvodnje bioetanola iz celuloze. Glavna prednost ove bakterije je što sadrži celulosom, multienzimski kompleks koji sadrži preko 20 različitih enzima koji služe za razgradnju lignoceluloze (Bicho i sur., 1988). Genetičko inženjerstvo u primjeni ove bakterije usmjerava se na redukciju sinteze neželjenih fermentacijskih proizvoda, na sposobnost previranja pentoznih šećera za proizvodnju etanola pri visokim temperaturama te sposobnost korištenja različitih lignoceluloznih sirovina (Prasad i sur., 2019).

Bacillus subtilis je Gram-pozitivna bakterija koja ima GRAS (Generally Recognized As Safe) status, niska nutritivna zahtjevanja te može previrati pentoze i heksoze uključujući glukozu, manozu, ksilozu i celobiozu. Posjeduje mogućnost ekspresije celulaza i hemicelulaza, koje se mogu izlučiti iz stanice i koristiti u svrhu

razgradnje lignocelulozne biomase i otpuštanja šećera (Bajwa i sur., 2009). Genetičke modifikacije *B. subtilis* usmjerene su eliminiranju sekrecije proteaza, poboljšanoj ekspresiji celulaza i redukciji neželjenih fermentativnih spojeva (Prasad i sur., 2019).

2.3.2. Kvasci u proizvodnji bioetanola i biokemikalija

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* primarni je mikroorganizam za upotrebu u industrijskoj proizvodnji bioetanola jer posjeduje nekoliko poželjnih svojstava: brz rast, učinkovit metabolizam glukoze, visoka produktivnost i prinos etanola, visoka tolerancija na stresne čimbenike poput visoke koncentracije etanola, visoke pH vrijednosti te niske koncentracije kisika. *S. cerevisiae* alkoholnom fermentacijom proizvodi etanol s prinosom blizu teoretskog maksimuma (0,51 g etanola g⁻¹ glukoze) (Gombert i van Maris, 2015). U industrijskim uvjetima proizvodi etanol s prinosom većim od 90 % teoretskog maksimuma (Della-Bianca i sur., 2013). *S. cerevisiae* uspješno previre heksoze glukoze, fruktozu i manozu te u manjoj količini galaktozu, ali ne i pentoze, no taj se problem rješava genetičkim modificiranjem kvasca (Madhavan i sur., 2012). Divlji tipovi ovog kvasca nisu u stanju previrati pentozne šećere (D-ksilozu ili L-arabinozu) koji čine glavne komponente lignoceluloznih hidrolizata. Kako se pritom ksiloza oslobađa u puno većem omjeru, genetičke modifikacije *S. cerevisiae* fokusiraju se na konstruiranje sojeva koji su sposobni metabolički razgraditi ksiloze i fermentirati ju (Ruchala i sur., 2019). Iako je genetički modificirani *S. cerevisiae* sposoban kofermentirati heksoze i pentoze, i dalje nije sposoban fermentirati glukoza/ksiloza podlogu jednako efikasno kao što divlji soj fermentira glukoze (Zhang i sur., 2015). Nadalje, izražena je osjetljivost prema inhibitorima koji se nalaze u lignoceluloznim hidrolizatima (Ruchala i sur., 2019).

Iako je glukoza glavna komponenta šećera lignocelulozne sirovine, pentozni šećeri, kao što su D-ksiloza i L-arabinoza, mogu biti prisutni do 20 %. Iz tog razloga je fermentacija D-ksiloze ključan faktor u iskorištavanju sirovina za proizvodnju biogoriva. Pritom razvoj sojeva *S. cerevisiae* koji mogu fermentirati ksiloze nebi trebao biti najznačajniji put koji se prati. Istraživanje i prilagodba nativnih kvasaca koji fermentiraju D-ksiloze kao što su *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Schefferomyces (Candida) shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, *Ogataea polymorpha* te kvasci iz soja

Spathaspora pružaju adekvatnu alternativu u industrijskoj primjeni proizvodnje bioetanola druge generacije (Cadete i sur., 2016).

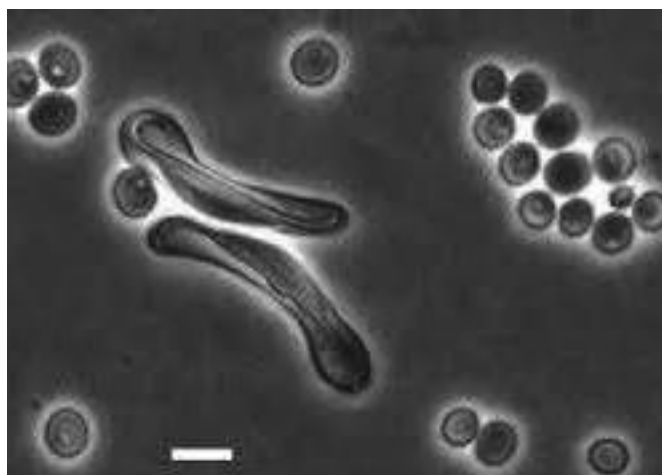
2.3.3. Ne-*Saccharomyces* kvasci

Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju veliki izvor bioraznolikosti s pozitivnim karakteristikama, važnim za industrijsku primjenu kao što su sposobnost korištenja kompleksnih supstrata te rast u prisutnosti inhibitora u podlozi. Njihov tijek evolucije neovisan je o kvascu *S. cerevisiae* zbog čega se smatra da veliki dio ne-*Saccharomyces* kvasaca sadrži nove i jedinstvene mehanizme koje *S. cerevisiae* ne posjeduje. Trenutno je opisano nekoliko tisuća vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca uz pretpostavku da veliki broj još nije niti otkriven (Mrak, 2019).

U pravilu su svi ksiloza fermentirajući kvasci izolirani iz organizma drvosadne bube koja razgrađuje trulo bijelo tvrdo drvo (Nardi i sur., 2006), osim soja *O. polymorpha* koji je izoliran iz drugih prirodnih izvora (Gellisen, 2000). *S. stipitis* jedan je od, dosad otkrivenih kvasaca, s najvećom sposobnosti fermentiranja D- ksiloze (du Preez i sur., 1989). Osim ksiloze, u mogućnosti je fermentirati i ostale šećere koji se prirodno nalaze u drvu kao što je celobioza (disaharid koji se sastoji od dvije glukozne jedinice povezane β -1,4-glikozidnim vezama oslobođen u postupku hidrolize celuloze) (Gírio i sur., 2010). Unatoč tome, *S. stipitis* pokazuje veći afinitet prema glukozu nego ksilozi kada se oba izvora ugljika nalaze u podlozi (Weierstall i sur., 1999). Identičan efekt represije glukozom dokazan je i kod ksiloza fermentirajućeg kvasca *C. shehatae*. U anaerobnim uvjetima, sinteza etanola pomoću *S. stipitis* je nedovoljna zbog lošeg transporta ksiloze, dok je u uvjetima s ograničenom koncentracijom kisika generiran veći prinosi etanola (Karagoz i sur., 2019). *O. polymorpha* je jedan od najtermotolerantnijih poznatih kvasaca koji ima mogućnost rasta na temperaurama od 50 °C. Divlji tip soja *O. polymorpha* sposoban je iz podloge fermentirati glukozu, ksilozu, manozu, maltozu i celobiozu u etanol, no nije u mogućnosti fermentirati galaktozu i L-arabinozu (Ryabova i sur., 2003). Fermentacijski uvjeti u kojima generira najveće prinose etanola su temperaturni rasponi 45-48 °C i uvjeti s limitirajućom koncentracijom kisika. U industrijskom mjerilu, mogućnost rasta na visokim temperaturama može smanjiti troškove hlađenja sustava i smanjiti rizike mogućih kontaminacija (Ruchala i sur., 2019).

2.3.4. Kvasci roda *Spathaspora*

Rod *Spathaspora* prvi su opisali Nguyen i sur. (2006) za karakterizaciju soja nove vrste kvasca koji proizvode alantoidne aske koji sadrže jednu askosporu sa zakrivljenim krajevima (slika 2). Asci i askospore ovih kvasaca razlikovali su se od ostalih, do tada poznatih kvasaca. Temeljna skupina roda *Spathaspora* trenutno broji 22 vrste.



Slika 2. Pupajuće stanice i aske kvasaca *Spathaspora arborariae* i *Spathaspora passalidarum* (Cadete i sur., 2017)

Vrsta *Spathaspora passalidarum* izolirana je iz crijeva drvosadne bube *Odontotaenius disjunctus*, pronađene na istoku Sjedinjenih Američkih Država. Najzanimljivija fiziološka karakteristika ovog kvasca je mogućnost korištenja D-ksiloze. Prije otkrića ove vrste, tek je nekolicina kvasaca bilo poznato s mogućnosti previranja ksiloze: *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Sc. (Candida) shehatae* i *Pachysolen tannophilus*.

Cadete i sur. (2009) opisali su drugu asporogenu vrstu iz roda *Spathaspora*: *Spathaspora arborariae*. Ova vrsta izolirana je s istrunulog drveta u atlantskoj prašumi i ekosustavima Cerrado u Brazilu. Pokazalo se kako vrsta dobro raste na glukozi ili D-ksilozi te proizvodi usporedive količine biomase i etanola iz oba šećera (Cadete i sur. 2009).

Među vrstama koje fermentiraju D-ksilozu, *Sp. passalidarum* je najbolji proizvođač etanola, pokazujući visoke prinose i produktivnost etanola kada se uzgaja u podlogama s D-ksilozom kao izvorom ugljika, bilo u aerobnim ili anaerobnim uvjetima. Takva svojstva čine ovu vrstu posebno zanimljivom za industrijsku proizvodnju etanola druge generacije (Cadete i sur., 2017). Također, uzimajući u obzir da je prirodno stanište ovog kvasca probavno crijevo kukca u kojem vladaju uvjeti ograničenja kisikom, može se očekivati prilagodba ove vrste za rast u mikroaerofilnim uvjetima u podlozi s celulozom i hemicelulozom (Long i sur., 2012). Nakanishi i sur. (2017) otkrili su kako ovaj kvasac uspjeva iskoristiti svu glukozu iz podloge i više od 90 % ksiloze kada se uzgaja na hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne trske. Međutim, pokazalo se kako na *Sp. passalidarum* značajno utječu inhibitori poput octene kiseline i furfurala te hidroksimetilfurfurala pristuni u hidrolizatima na način da koče rast mikroba i proizvodnju etanola (Jönsson i Martin 2016). Su i sur. (2015) proučavali su učinke octene kiseline, furfurala, 5-HMF i vanilina na rast, potrošnju šećera i proizvodnju etanola s pomoću kvasca *Sp. passalidarum* te su se rezultate usporedili s kvascem *S. stipitis*. Octena kiselina i furfural pokazali su se kao najjači inhibitori oba kvasca. Kada se nalazi u prisutnosti s drugim inhibitornim spojevima (furfural, HMF i vanilin), koncentracije octene kiseline iznad 1,5 g L⁻¹ djeluju potpuno inhibirajuće za fermentaciju kvasca *Sp. passalidarum*. S ciljem povećanja tolerancije prema inhibitorima, razvijeni su novi sojevi *Sp. passalidarum* s poboljšanim karakteristikama (Long i sur., 2012). Vrsta soja *Spathaspora*, koja također fermentira D-ksilozu, je *Spathaspora arborariae*. Posebno je proučavana radi sposobnosti fermentiranja lignoceluloznih hidrolizata s prinosima etanola od 0,45 g g⁻¹ (da Cunha-Pereira i sur., 2011). *S. arborariae* također proizvodi etanol kao glavni produkt metabolizma ksiloze, no ipak ju karakterizira veća produktivnost ksilitola od onih postignutih sa *Sp. passalidarum* (Cadete i sur., 2016). Također, ova vrsta pokazuje jasnu preferenciju prema glukozu kao primarnom izvoru ugljika kada je u podlozi prisutan izbor različitih šećera (Cadete i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

U svrhu izrade diplomskog rada, kao lignocelulozna sirovina, korišteni su izluženi rezanci šećerne repe dobiveni iz pogona za proizvodnju šećera Sladorana Županja. Sirovina je čuvana u zatvorenoj papirnoj ambalaži pri sobnoj temperaturi te u prostoriji s niskim udjelom vlage. Izluženi rezanci šećerne repe u vlastitom sastavu sadrže 92 % suhe tvari (tablica 2).

Tablica 2. Sastav sirovine: izluženi rezanci šećerne repe

komponenta sirovine	glukan	ksilan	arabanan	mravlja kiselina	octena kiselina	LTK	LNTK+pepeo
w (%)	2,09	11,25	11,09	5,32	0,87	23,15	38,04

3.1.2. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištene su dvije vrste kvasca roda *Spathaspora*: *Spathaspora arborariae* CBS 11463, izoliran iz organizma insekta (Louisiana, SAD) i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155, izoliran iz unutrašnjosti istrunulog drva (Brazil). Radni mikroorganizmi dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada.

3.1.3. Kemikalije

U tablici 3 prikazan je popis korištenih kemikalija, njihova čistoća, proizvođač te zemlja podrijetla.

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

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
YPD broth	za upotrebu u biotehnologiji	Fisher BioReagents, SAD
agar	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
sumporna kiselina	96 %	Merck, Njemačka
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
glukoza monohidrat	99+ %	Sigma- Aldrich, SAD
D - (+) - Ksiloz	99+ %	Acros Organics, SAD
L - (+) - Arabinoza	99+ %	Acros Organics, SAD

3.1.4. Hranjive podloge

Čiste kulture kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 održavane su na čvrstim agar YPD hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i biotehnoške uzgoje je YPD tekuća podloga standardnog sastava. YPD podloga sastoji se od kvašćevog ekstrakta, peptona i glukoze u omjeru 1:2:2. Za uzgoj mikroorganizama koristili su se tekući hidrolizati dobiveni prethodnom kiselinskom predobradom lignocelulozne sirovine u visokotlačnom reaktoru vlastite izvedbe Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Odabrani su hidrolizati s najvišim koncentracijama ugljikohidrata, a takvi su postignuti pri sljedećim temperaturama i vremenima zadržavanja: 160 °C/5 minuta, 180 °C/5 minuta, 180 °C/10 minuta, 200 °C/1 minuta i 200 °C/5 minuta. Sastavi navedenih podloga prikazani su u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Sastav tekuće i čvrste YPD podloge

komponenta podloge	tekuća YPD podloga	Čvrsta YPD podloga
glukoza (g L ⁻¹)	20	20
pepton (g L ⁻¹)	20	20
kvašičev ekstrakt (g L ⁻¹)	10	10
agar (g L ⁻¹)	-	20

Tablica 5. Sastav hidrolizata dobivenih kiselinskom predobradom koji su korišteni kao hranjiva podloga za uzgoj kvasaca iz roda *Spathaspora*

Hidrolizat (temperatura/vrijeme)	Wglukan (%)	Wksilan (%)	Warabinan (%)	Woctena kiselina (%)
160 °C/5 min	7,87	13,73	76,96	1,1
180 °C/5 min	6,6	13,55	78,3	1,21
180 °C/10 min	2,2	9,6	86,37	1,37
200 °C/1 min	5,54	16,5	76,64	0,87
200 °C/5 min	5,31	15,57	77,20	1,44

3.1.5. Aparatura i pribor

Visokotlačni reaktor

Za predobradu lignocelulozne sirovine korišten je sustav (slika 3) koji se sastoji od: reaktorske posude za zagrijavanje termičkog ulja koja sadrži 3 električna grijača snage 1,0 kW; sustava cijevi te plašta kojim se zagrijava reaktorska posuda za predobradu sirovine; reaktorske posude za predobradu sirovine; perforirane košare od nehrđajućeg čelika volumena 20 L koja služi za prihvatanje sirovine; pumpe; ventila za ispuštanje tekućeg dijela; kontrolne jedinice za uspostavljanje parametara procesa te zaštitne jedinice. Uključivanjem sustava pokreće se rad pumpe uz pomoć koje ulje cirkulira kroz sustav i zagrijava reaktor za predobradu sirovine. Sustav se nadzire mjerenjem temperature ulja, temperature i tlaka u reaktoru za predobradu te temperature vodene pare nastale tijekom zagrijavanja. Pri završetku procesa, tlak u reaktoru se izjednačava s atmosferskim pomoću ventila koji se nalazi s gornje strane reaktora. Nakon toga, tekući dio nastao predobradom ispušta se pomoću ventila koji se nalazi na dnu reaktora za predobradu. Kruti dio zaostaje u perforiranoj košari unutar reaktora koja se naknadno izuzima.



Slika 3. Visokotlačni bioreaktor (1 - kontrolna jedinica; 2 - posuda s grijačima i termičkim uljem; 3 - pumpa, 4 - reaktor za predobradu sirovine; 5 - ventil za ispuštanje tekućeg dijela; 6 - zaštitna jedinica) (Vrdoljak, 2019)

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, predkolone, analitičke kolone 150×7,8 (Rezex ROA- Organic Acid H+, Phenomenex), detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS).

Ostala oprema i programi

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija)
- laboratorijska tresilica Certomat RM B.Braun Biotech International (Njemačka)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga SL 8R (ThermoScientific, Waltham, MA, SAD)
- magnetna miješalica Cimarec ITM Poly15 (ThermoScientific, Waltham, MA, SAD)
- termostat Instrumentaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)
- sušionik Instrumentaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)

- oprema za filtraciju otopina: najlonski filter (0,20 μm , 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka)
- UV/VIS spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) s računalnim programom SimpleReads
- hladnjak i zamrzivač (Bosch, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje sastava početne sirovine za kiselinsku predobradu u visokotlačnom reaktoru

Sastav izluženih rezanaca šećerne repe određen je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti nakon postupka dvostupanjske kiselinske hidrolize prema Marđetko i sur. (2018), opisano u poglavlju 3.3. Analitičke metode.

3.2.2. Predobrada lignocelulozne sirovine

Predobrada sirovine korištene u ovom diplomskom radu provodi se prema metodi Marđetko i sur. (2018). Masa sirovine korištene u postupku predobrade je 1000 g suhe tvari izluženih rezanaca šećerne repe. Obzirom da je udio suhe tvari u rezancima repe 92 %, prilikom vaganja masa sirovine iznosi 1080 g. Za kiselinsku predobradu sirovine potrebno je pripremiti 0,5 %-tnu otopinu H_2SO_4 , volumena 10 L. Izvagana masa sirovine prenosi se u reaktor za predobradu, u kojeg je prethodno postavljena perforirana košara od nehrđajućeg čelika. Nakon toga, u sustav se uvodi 10 L otopine H_2SO_4 . Kiselinski predtretmani provode se pri tri različite temperature (160 °C, 180 °C i 200 °C) te kroz tri različita perioda zadržavanja (1, 5 i 10 minuta) na postignutoj željenoj temperaturi. Parametri procesa predobrade prate se preko kontrolne jedinice. Prilikom završetka tretmana, najprije se pristupa izjednačavanju tlaka u reaktoru s atmosferskim tlakom. Nakon toga, izuzimaju se tekuća i čvrsta faza koje odlaze na daljnje analize.

3.2.3. Priprema hranjivih podloga

Kvasci *Spathaspora* sp., korišteni u ovom radu, čuvani su na čvrstim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama koje su pripremljene na način da se u prethodno

određeni volumen demineralizirane vode dodaje izračunata i odvagana masa YPD podloge (50 g L^{-1}) i agra (20 g L^{-1}). Hranjiva podloga se sterilizira u autoklavu pri $121 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 20 minuta, zatim prelije u Petrijeve zdjelice, osiguravajući pritom sterilne uvjete. Na ohlađenu podlogu su pomoću mikrobiološke ušice nacijepljene željene kulture kvasca.

Podloge za uzgoj inokuluma

Podloge za uzgoj inokuluma pripremljene su tako da se u određeni volumen demineralizirane vode dodaje prethodno izvagana masa YPD podloge (50 g L^{-1}). Volumen podloge prebačen je u staklene epruvete, tako da svaka epruveta sadrži po 10 mL podloge. Epruvete se zajedno s podlogama autoklaviraju na $121 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 20 minuta te tako sterilne služe za uzgoj inokuluma koji se kasnije koristi za uzgoj u većem mjerilu.

Podloge za uzgoj uzgoj kvasaca *Spathaspora* sp.

Za uzgoj kvasaca *Spathaspora* sp. u Erlenmeyerovim tikvicama korištena je YPD podloga. U 250 mL demineralizirane vode dodaje se već izračunata YPD podloga (50 g L^{-1}). Tako pripremljena podloga sterilizirana je u autoklavu na $121 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 20 minuta.

Osim standardne YPD podloge, uzgoj kvasaca provodio se u YP (yeast extract peptone) podlozi korisnog volumena 200 mL, kojoj su dodane glukoza, ksiloza i arabinoza kao izvor ugljika u koncentraciji od 4, 9 i 11 g L^{-1} za pojedini monosaharid. Tako pripremljene hranjive podloge sterilizirane su u autoklavu na $121 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 20 minuta. Za uzgoj kvasaca na hidrolizatima korištene su Erlenmeyerove tikvice korisnog volumena 200 mL. Hranjivu podlogu činile su odabrane tekuće faze nastale kiselinskom predobradom lignocelulozne sirovine kojima je analizom utvrđen najveći udio monosaharida. Kao izvor dušika korištena je kukuruzna močevina (CSL) (20 g L^{-1}). U hranjivu podlogu također su dodani diamonij fosfat (DAP) i diamonij sulfat (DAS) u koncentraciji $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Tako pripremljene hranjive podloge sterilizirane su u autoklavu na $121 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 20 minuta.

3.2.4. Uzgoj kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155

Uzgoj kvasaca na tekućim YPD podlogama (u Erlenmeyerovim tikvicama korisnog volumena 250 mL) započinje inokuliranjem s 5 %-tnim inokulumom koji je uzgojen u epruvetama s tekućom YPD podlogom pri 28 °C u periodu od 18h. Uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama provodio se u aerobnim uvjetima, na magnetnoj miješalici ($n=200 \text{ min}^{-1}$), pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C). Uzorci za analizu izuzimali su se u redovitim vremenskim intervalima kroz ukupno 26 h trajanja bioprocasa. Pritom se uzorcima spektrofotometrijski određivala optička gustoća te gravimetrijski koncentracija biomase kvasca. UPLC analizom određene su koncentracije ugljikohidrata i produkata fermentacije.

Uzgoj kvasaca na tekućim YP podlogama s dodatkom glukoze, ksiloze i arabinoze te hranjive podloge koje čine hidrolizati lignocelulozne sirovine nakon kiselinskog predtretmana započinje inokuliranjem s 5 %-tnim inokulumom koji je uzgojen u epruvetama s tekućom YPD podlogom pri 28 °C u peirodu od 18h. Korisni volumen Erlenmeyerovih tikvica za uzgoj iznosio je 200 mL. Uzgoj se provodio na laboratorijskoj tresilici ($n=200 \text{ min}^{-1}$), te su se uzorci izuzimali u određenim vremenskim intervalima kroz ukupno 26 h trajanja bioprocasa. Pritom se uzorcima spektrofotometrijski određivala optička gustoća i gravimetrijski koncentracija biomase kvasca. UPLC analizom određene su koncentracije ugljikohidrata i produkata fermentacije.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini

Uzorak prethodno usitnjenih izluženih rezanaca šećerne repe izvagan je i osušen na 100 °C do konstantne mase. Uzorak je nakon sušenja izvagan te je prema navedenoj jednadžbi određen udio suhe tvari:

$$w (\text{suhe tvari}) = \frac{m (\text{poslije sušenja})}{m (\text{prije sušenja})} * 100 [\%] \quad [1]$$

Uzorci izluženih rezanaca šećerne repe prije i nakon kiselinske predobrade podvrgnuti su metodi dvostupanjske kiselinske hidrolize kako bi se utvrdila koncentracija prisutnih monosaharida te udio topivog i netopivog lignina. U epruvetu

se dodaje 0,4 g uzorka te 4 mL 72 %- ne H₂SO₄. Sadržaj epruvete izmiješa se staklenim štapićem kako bi sav uzorak bio u kontaktu s kiselinom. Nakon inkubacije uzorka na 30 °C kroz jedan sat, sadržaj epruvete kvantitativno se prebaci u okruglu tikvicu s ravnim dnom. Dodaje se 112 mL demineralizirane vode te se sadržaj tikvice kuha 4 sata uz povratno hladilo, uz povremena miješanja sustava. Nakon kuhanja, sadržaj tikvice se hladi i filtrira pomoću Büchnerovog lijevka kroz celulozni filter papir. Filtrat kulture izdvaja se za određivanje udjela topivog lignina i ukupnih furana spektrofotometrijom te koncentracije šećera koristeći tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti. Zaostali kruti dio prebacuje se zajedno s filter papirom na Petrijevu zdjelicu za sušenje kako bi se odredio udio netopivog lignina.

3.3.2. Određivanje udjela topivog lignina

Uzorak tekuće faze nakon kiseline predobrade lignocelulozne sirovine te alikvot izuzet iz permeata filtracije nakon dvostupanjske kiseline hidrolize uzeti su kako bi se spektrofotometrijski odredio udio topivog lignina. Uređaj korišten za navedenu metodu je spektrofotometar "Cary 100, UV-VIS; AgilentTechnologies".

Uzorak je pomoću demineralizirane vode pripremljen do odgovarajućeg razrjeđenja kako bi vrijednost apsorbancije bila u linearnom području (između 0,7 i 1). Uzorak je snimljen pri valnoj duljini od 205 nm u tri paralele. Udio lignina topivog u kiselini (LTK) računa se prema jednadžbi:

$$LTK = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot m} \quad [2]$$

A- apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 205 nm

D- faktor razrjeđenja

V- volumen filtrata

a- konstanta, iznosi 110 g L⁻¹ cm⁻¹

b- širina kivete, iznosi 1 cm

m- masa uzorka uzetog za analizu (g)

3.3.3. Određivanje udjela netopivog lignina

Kruta faza zaostala nakon dvostupanjske kiseline hidrolize najprije je isprana demineraliziranom vodom te je kvantitativno prenesena na prethodno osušeni i izvagani filter papir. Tako pripremljeni uzorak sušen je na temperaturi od 105 °C u

periodu od 24 sata. Nakon sušenja, uzorak je zajedno s filter papirom izvagan. Udio netopivog lignina (LNTK) zaostao nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize računa se prema jednadžbi:

$$\text{LNTK} = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) - m(\text{flitera})}{m(\text{uzorka čvrste faze uzetog u analizu})} \quad [3]$$

3.3.4. Određivanje ukupnih furana

Iz tekuće faze nakon kiselinske predobrade sirovine i iz tekuće faze nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize, izuzet je alikvot (9 μL) te je razrijeđen tisuću puta demineraliziranom vodom (9 mL). Tako pripremljeni uzorak snimljen je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 284 nm i 320 nm. Razlika dviju izmjerenih vrijednosti uvrštena je u jednadžbu baždarnog pravca kako bi se izračunala koncentracija ukupnih furana:

$$\gamma(\text{furani}) = 2,469 * \Delta A + 0,0158 * R^2 \quad [4]$$

3.3.5. Određivanje optičke gustoće uzorka

Optička gustoća uzoraka izuzetih tijekom uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u YPD podlogama, u YP podlogama s određenim koncentracijama glukoze, ksiloze i arabinoze, te u tekućim hidrolizatima nastalih kiselinskom predobradom sirovine, određivana je na UV-VIS spektrofotometru (Carry 100, Agilent Technologies, SAD) pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm. Prilikom određivanja optičke gustoće pripremljena su odgovarajuća decimalna razrjeđenja pojedinog uzorka.

3.3.6. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca

Određeni volumen uzoraka izuzet je iz hranjive podloge i prenesen u prethodno izvagane plastične kivete za centrifugiranje (Nalgene Nunc, SAD). Uzorci su centrifugirani u centrifugi SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD) pri broju okretaja od 6000 min^{-1} u trajanju od 5 minuta. Dobiveni supernatanti čuvani su za daljnju UPLC analizu dok se odcentrifugirana biomasa odnosila u sušionik podešen na $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Uzorak se zajedno s kivetom sušio do konstantne mase, zatim vagao te se prema dobivenim rezultatima računala masena koncentracija biomase kvasca X (g L^{-1}):

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad (g \ L^{-1}) \quad [5]$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom (g)

m_{pk} - masa prazne kivete (g)

V_{uz} - volumen uzorka (L)

3.3.7. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uzorci izuzimani iz hranjivih podloga tijekom provedenih uzgoja pripremljeni su za analizu na UPLC-u tako da je 750 μ L supernatanta otpipetirano u Eppendorf kivetu te je u kivetu dodano 750 μ L ZnSO₄ ($\gamma=100 \text{ g L}^{-1}$). Sadržaj kivete zatim je vorteksiran i ostavljen na čekanje 10 minuta. Nakon isteka vremena, uzorak se postavlja za centrifugiranje na centrifugi Tehnica (Železniki, Slovenija) u trajanju od 15 min ($n=10\ 000 \text{ min}^{-1}$) kako bi se proteini prisutni u uzorku istaložili. Alikvot supernatanta izuzet nakon centrifugiranja razrijeđen je s destiliranom vodom u omjeru 1:1. Sadržaj je homogeniziran i profiltriran kroz filter za špricu s veličinom pora 0,22 μ m (LLG-Syringe filters SPHEROS, LLG Labware).

Tako pripremljeni uzorci koriste se za UPLC analizu kako bi se odredila koncentracija supstrata i produkata pri sljedećim uvjetima:

- protok mobilne faze: 0,6 mL min⁻¹
- temperatura pećnice: 60 °C
- analitička kolona Rezex ROA- Organic Acid H+ (8 %) UPLC Column 15 x 4,6 mm s odgovarajućom predkolonom
- detektor indeksa loma (Refractive Index Detector)
- volumen injektiranja: 10 L

Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su u računalnom programu za kromatografiju OpenLAB CDS.

3.4. Određivanje parametara uspješnosti bioprocesa

3.4.1. Prinos biomase (Y_X)

$$Y_X = X - X_0 \quad [g \ L^{-1}] \quad [6]$$

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

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

3.4.2. Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [7]$$

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

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

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

$$Y_{X/S} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g / g}] \quad [8]$$

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

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

(Marić i Šantek, 2009).

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

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g / g}] \quad [9]$$

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

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

(Marić i Šantek, 2009).

3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_{glc})

$$\ln(S) = r_S \cdot t + b \quad [10]$$

3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_P)

$$\ln(P) = r_P \cdot t + b \quad [11]$$

Gdje P može bit etanol (EtOH), ksilitol ili arabitol

3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)

$$\ln(X) = \mu_m \cdot t + b \quad [12]$$

3.4.8. Produktivnost (Pr)

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad [13]$$

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

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

t_U - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

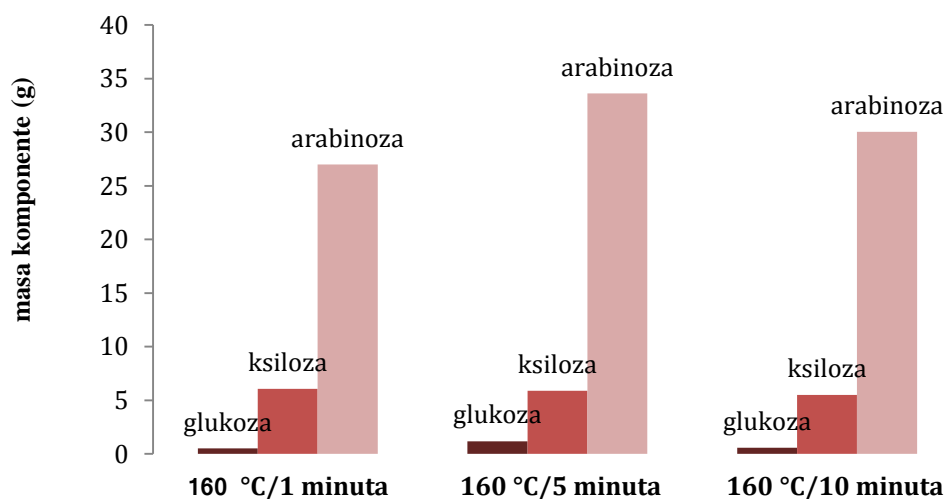
U ovom radu provedena je kiselinska predobrada lignocelulozne sirovine izluženih reznaca šećerne repe u viokotlačnom reaktoru u rasponu temperatura od 160 °C do 200 °C i vremenima zadržavanja od 1 do 10 minuta. Nakon predobrade dobiveni tekući dio (hidrolizat izluženih reznaca šećerne repe) koristio se za uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 kako bi se utvrdila mogućnost rasta ovih kvasaca na hidrolizatima izluženih reznaca šećerne repe i mogućnost proizvodnje etanola i drugih metabolita (Cadete i sur., 2017). Naime, izluženi rezanci šećerne repe bogati su pektinom koji u svom sastavu sadrži arabinozu koja može poslužiti kao dobar izvor za proizvodnju šećernih alkohola ksilitola i arabitola u aerobnim uvjetima. Navedeni kvasci izabrani su kao dobri proizvođači arabitola između 16 različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca (Lončar, 2019; Mrak, 2019). Nadalje, osim uzgoja na hidrolizatima, provedeni su uzgoji kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 na YPD podlogama pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C) kako bi se utvrdila optimalna temperatura za rast. Uspoređujući parametre uspješnosti procesa odredila se optimalna temperatura koja je korištena za gore navedene uzgoje kvasaca na hidrolizatima.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

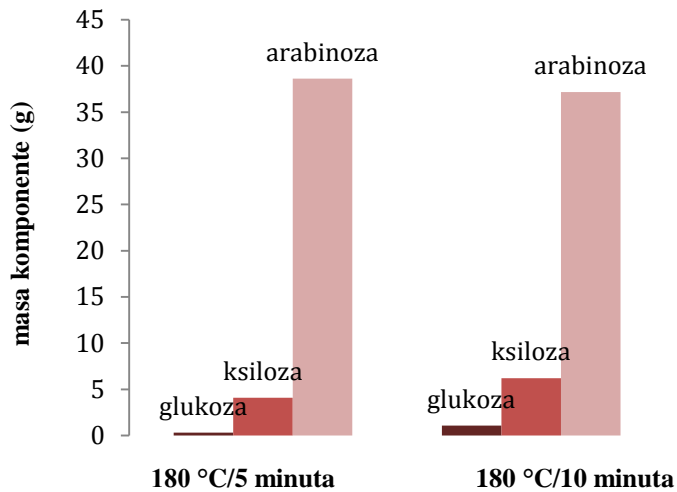
- a) Kiselinska predobrada izluženih reznaca šećerne repe u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja
 - (i) Kiselinska predobrada izluženih reznaca šećerne repe pri temperaturi od 160 °C i vremenima zadržavanja od 1 do 10 minuta
 - (ii) Kiselinska predobrada izluženih reznaca šećerne repe pri temperaturi od 180 °C i vremenima zadržavanja od 5 do 10 minuta
 - (iii) Kiselinska predobrada izluženih reznaca šećerne repe pri temperaturi od 200 °C i vremenima zadržavanja od 1 do 10 minuta
- b) Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca na YPD podlogama pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C)
- c) Uzgoj ne-*Saccharomyces* kvasaca u modelnim podlogama i na hidrolizatu izluženih reznaca, na optimalnoj temperaturi od 30 °C, u mikroaerofilnim uvjetima s ciljem proizvodnje etanola i šećernih alkohola

4.1. KISELINSKA PREDOBRAĐA IZLUŽENIH REZANACA ŠEĆERNE REPE U VISOKOTLAČNOM REAKTORU PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA I VREMENIMA ZADRŽAVANJA

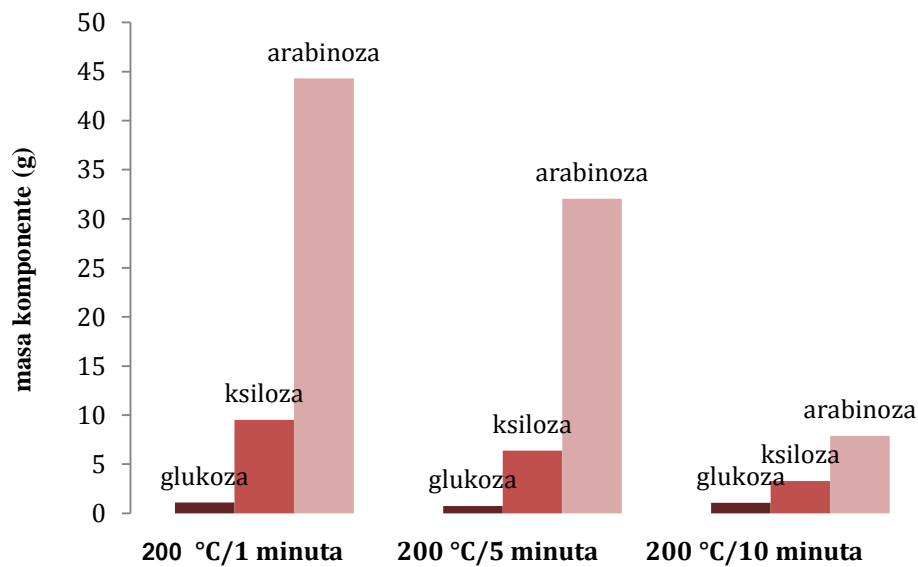
U ovom poglavlju prikazani su rezultati predtretmana izluženih rezanaca šećerne repe s 0,5 %-tnom sumpornom kiselinom na različitim temperaturama i vremenima zadržavanja u visokotlačnom reaktoru. Cilj predobrade bio je određivanje optimalnih parametara u svrhu dobivanja što većih prinosa fermentabilnih šećera s ujedno što manje nusprodukata s potencijalno inhibitornim učincima. Rezultati su prikazani na slikama 4-9.



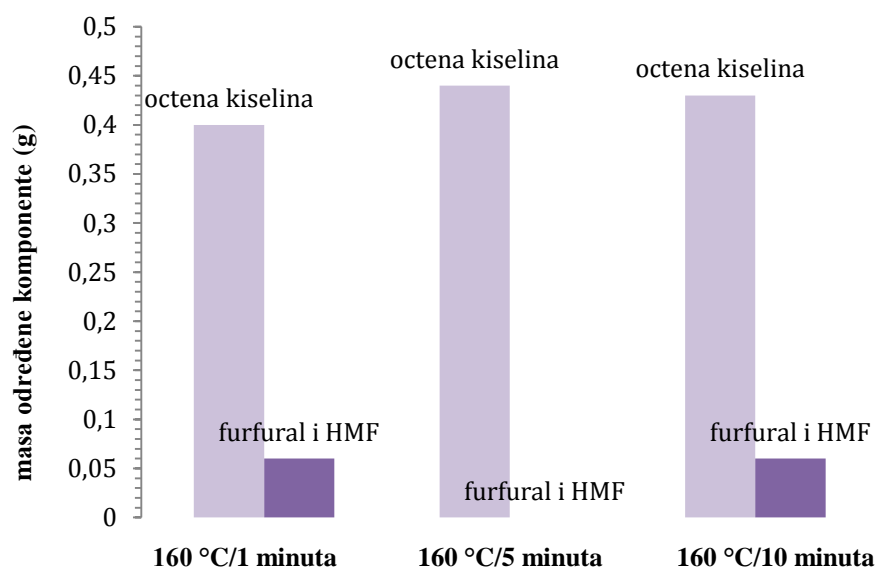
Slika 4. Prikaz mase glukoze, ksiloze i arabinoze u hidrolizatu lignocelulozne sirovine izluženih rezanaca šećerne repe nakon kiselinskog predtretmana na temperaturi od 160 °C pri 1 minuti, 5 minuta i 10 minuta vremenskog zadržavanja



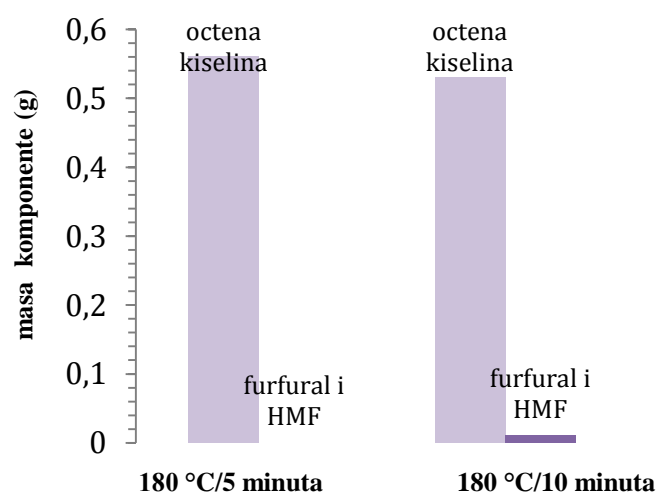
Slika 5. Prikaz mase glukoze, ksiloze i arabinoze u hidrolizatu lignocelulozne sirovine izluženih rezanaca šećerne repe nakon kiselnog predtretmana na temperaturi od 180 °C pri 5 minuta i 10 minuta vremenskog zadržavanja



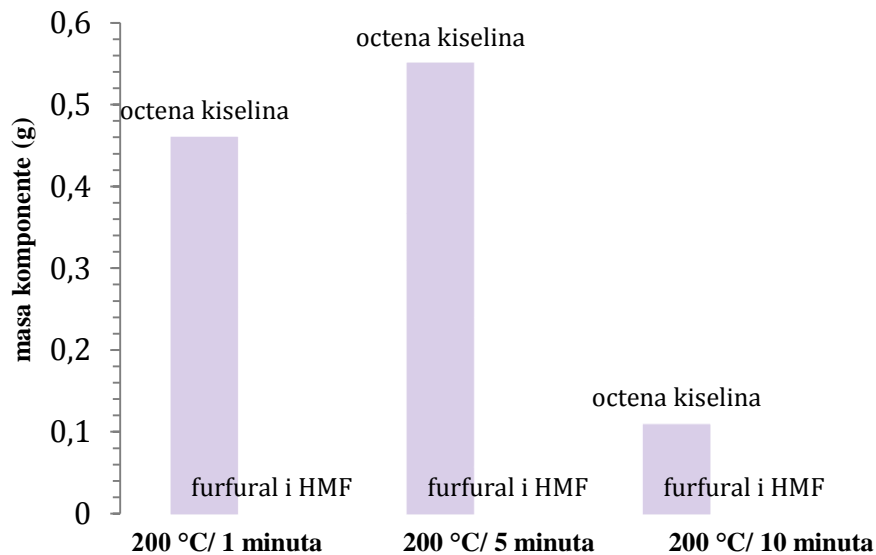
Slika 6. Prikaz mase glukoze, ksiloze i arabinoze u hidrolizatu lignocelulozne sirovine izluženih rezanaca šećerne repe nakon kiselnog predtretmana na temperaturi od 200 °C pri 1 minuti, 5 minuta i 10 minuta vremenskog zadržavanja



Slika 7. Prikaz mase octene kiseline i furfurala te 5-hidroksimetilfurfurala u hidrolizatu lignocelulozne sirovine izluženih reznaca šećerne repe nakon kiselinskog predtretmana na temperaturi od 160 °C pri 1 minuti, 5 minuta i 10 minuta vremenskog zadržavanja



Slika 8. Prikaz mase octene kiseline i furfurala te 5-hidroksimetilfurfurala u hidrolizatu lignocelulozne sirovine izluženih reznaca šećerne repe nakon kiselinskog predtretmana na temperaturi od 180 °C pri 5 minuta i 10 minuta vremenskog zadržavanja



Slika 9. Prikaz mase octene kiseline i furfurala te 5-hidroksimetilfurfurala u hidrolizatu lignocelulozne sirovine izluženih rezanaca šećerne repe nakon kiselinskog predtretmana na temperaturi od 200 °C pri 1 minuti, 5 minuta i 10 minuta vremenskog zadržavanja

Pri temperaturi od 160 °C kod tretmana izluženih rezanaca u visokotlačnom reaktoru najveći prinos arabinoze i glukoze je bio u hidrolizatu s vremenom zadržavanja od 5 minuta (33,62 g arabinoze i 1,19 g glukoze u volumenu tekuće faze od 3,5 L). Najveći prinos ksiloze zabilježen je pri vremenskom zadržavanju od 1 minute i istoj temperaturi: 6,07 g ksiloze u 3,8 L tekuće faze. Pri temperaturi od 180 °C najveći prinosi ugljikohidrata iznosili su: 38,61 g arabinoze pri vremenskom zadržavanju od 10 minuta u 3,4 L tekućeg hidrolizata, dok su koncentracije ksiloze i glukoze bile veće pri vremenskom zadržavanju od 5 minuta i to 6,19 g ksiloze i 1,08 g glukoze u 3,83 L tekućeg hidrolizata. Pritom je potrebno napomenuti kako rezultati predobrade pri 180 °C i 1 minuti zadržavanja nisu prikazani uslijed grešaka prilikom analiziranja uzoraka. Predobrada sirovine na 200 °C generirala je najviše koncentracije fermentabilnih šećera pri vremenu zadržavanja od 1 minute (44 g arabinoze, 9,52 g ksiloze i 1,1 g glukoze u 3,7 L tekućeg hidrolizata). Pri duljim vremenima zadržavanja (5 i 10 minuta) dolazi do značajnog smanjenja količine topive arabinoze što ukazuje na moguću termolabilnost ovoga šećera. Visoka topivost arabinoze iz pulpe šećerne repe pri temperaturama od 150 °C do 175 °C već je dokazana u ranijim istraživanjima (Madhavan i sur., 2012). Madhavan i sur. (2012) istraživali su efekt predtretmana razrijeđene kiseline izluženih

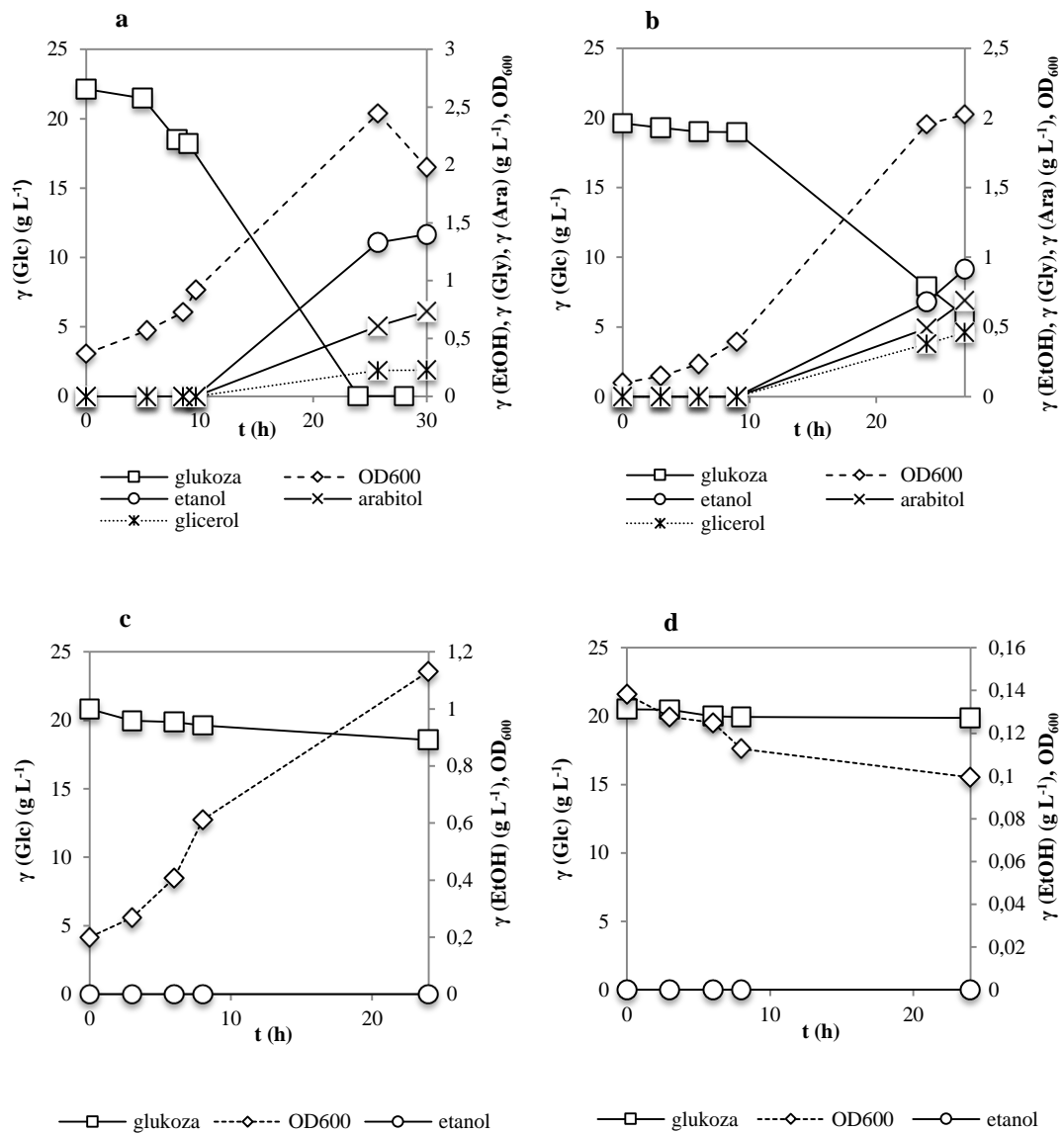
reznaca šećerne repe te su došli do saznanja kako s povećanjem intenziteta, osim povećanja topivosti komponenti u tekućoj fazi hidrolizata, dolazi do znantnih gubitaka u masi uzorka, a takvi rezultati su potvrđeni i u ovom radu (vidljivo iz grafa prikaza kemijskog predtretmana na 200 °C). Najvjerojatnije do ovakvih gubitaka dolazi uslijed kemijske degradacije ugljikohidrata (Millard-ove reakcije) i formiranja hlapivih spojeva. Millard-ove reakcije su reakcije neenzimskog posmeđivanja koje se odvijaju između slobodne amino skupine i karbonilnog spoja prilikom čega kao produkti nastaju smeđi pigmenti melanoidi (Grgić, 2011). Naime, nakon predtretmana pri višim temperaturama i dužim vremenima zadržavanja (200 °C/10 minuta i 180 °C/10 minuta) dolazi do izrazitog mijenjanja boje podloge u tamno smeđu i podloga dobiva specifičnu aromu karamele što su također potvrdili Madhavan i sur. (2012). Osim generiranja fermentabilnih šećera, u procesu kiselinskog predtretmana postoji mogućnost formiranja neželjenih spojeva koji mogu negativno utjecati na proces fermentacije s pomoću kvasca koji slijedi nakon predtretmana. Octena kiselina, furfural, 5-hidroksimetilfurfural i mravlja kiselina su spojevi koji mogu negativno utjecati na proces, čija proizvodnja je detektirana u ovom postupku kiselinskog predtretmana, a pritom su zabilježene znatnije količine proizvedene octene kiseline u usporedbi s furanima i HMF-om. Najviši prinos octene kiseline zabilježen je na temperaturi od 200 °C pri vremenskom zadržavanju od 5 minuta (0,56 g u 3,4 L tekućeg hidrolizata) i na temperaturi od 180 °C pri vremenu zadržavanja 10 minuta (0,55 g u 3,6 L tekućeg hidrolizata). Prinosi octene kiseline bili su bitno veći od prinosa furana i HMF-a čije su najveće koncentracije zabilježene na temperaturama 160 °C i 10 minuta zadržavanja (0,06 g u 3,6 L hidrolizata).

4.2. UZGOJ KVASACA *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 NA YPD PODLOZI PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA (20 °C, 30 °C, 40 °C I 50 °C) U MIKROAEROFILNIM UVJETIMA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja ne-*Saccharomyces* kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 na kemijski definiranoj podlozi (YPD) pri različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C) te u mikroaerofilnim uvjetima. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti optimalnu temperaturu za rast i sintezu etanola te ostalih alkoholnih šećera kao što su ksilitol i arabitol.

Prikaz promjene koncentracije supstrata i dobivenih produkata nakon šaržnih uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* 10155 prikazani su na slikama 10 i 11.

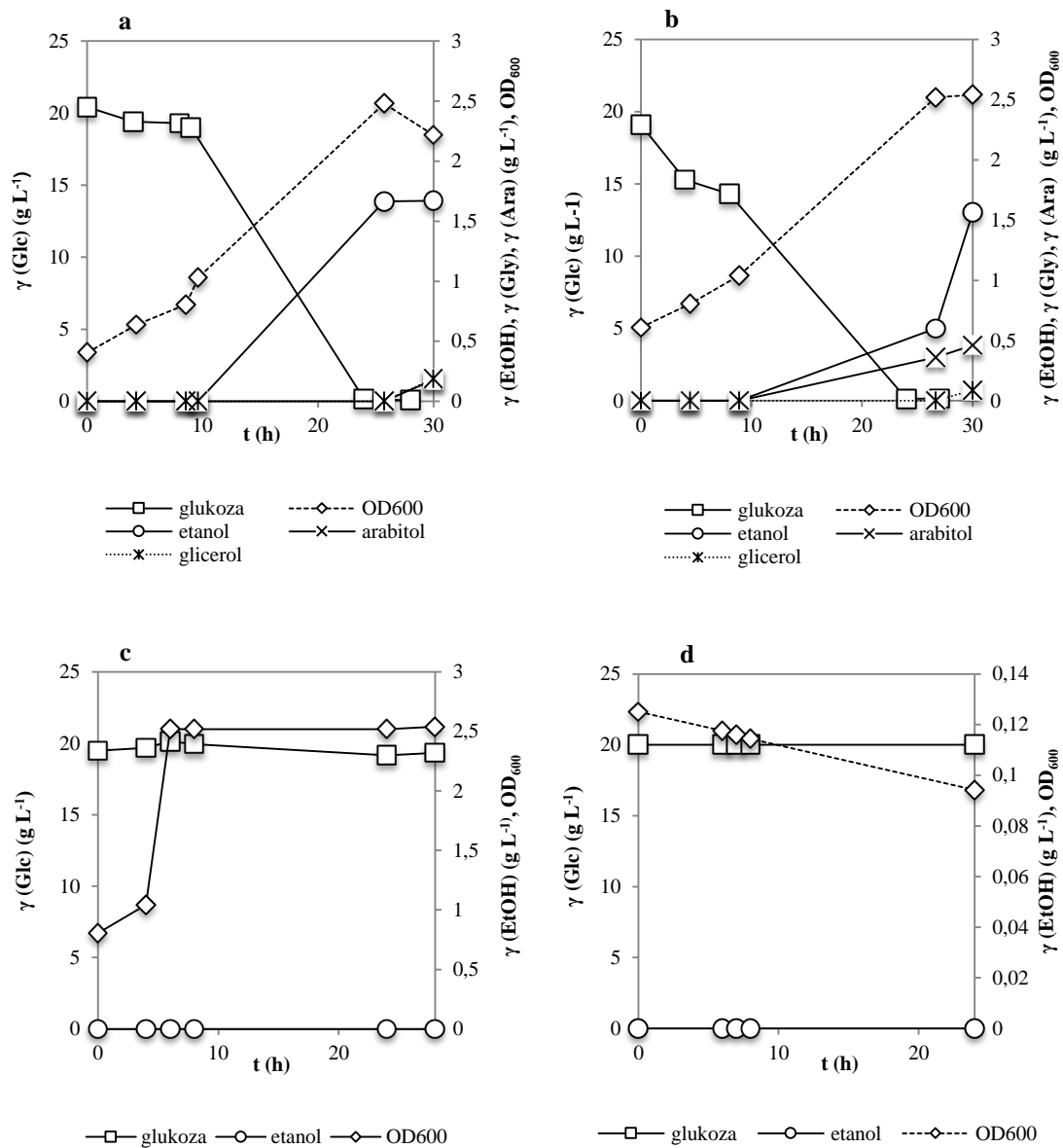
Nakon provedenih uzgoja izračunali su se neki od pokazatelja uspješnosti šaržnih uzgoja te su rezultati prikazani u tablicama 6 i 7.



Slika 10. Promjena koncentracije supstrata, OD₆₀₀ vrijednosti i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 u mikroaerofilnim uvjetima na YPD podlozi pri različitim temperaturama: 20 °C (a), 30 °C (b), 40 °C (c) i 50 °C (d)

Tablica 6. Pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 u mikroaerofilnim uvjetima, u YPD podlozi, pri različitim temperaturama uzgoja

Parametar	Temperatura uzgoja			
	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
$Y_{\text{etanol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,32	0,29	-	-
$Y_{\text{glicerol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,011	0,003	-	-
$Y_{\text{arabitol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,037	0,05	-	-
$Pr_{\text{etanol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,27	0,24	-	-
$Pr_{\text{glicerol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,008	0,02	-	-
$Pr_{\text{arabitol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,003	0,03	-	-



Slika 11. Promjena koncentracije supstrata, OD₆₀₀ vrijednosti i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u mikroaerofilnim uvjetima na YPD podlozi pri različitim temperaturama: 20 °C (a), 30 °C (b), 40 °C (c) i 50 °C (d)

Tablica 7. Pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u mikroaerofilnim uvjetima, u YPD podlozi, pri različitim temperaturama

Parametar	Temperatura uzgoja			
	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
$Y_{\text{etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	0,36	0,32	-	-
$Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	0,009	0,004	-	-
$Y_{\text{arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)	0,008	0,022	-	-
Pr_{etanol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,31	0,27	-	-
Pr_{glicerol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,007	0,003	-	-
Pr_{arabitol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,006	0,02	-	-

Iz dobivenih rezultata uzgoja kvasaca pri različitim temperaturama odmah je uočljivo kako kvasci *Sp. arborariae* CBS 11463 i *Sp. passalidarum* CBS 10155 nisu termofilni kvasci, odnosno ne bilježe rast pri temperaturama 40 °C i 50 °C. Rast i proizvodnja metabolita zabilježena je prilikom uzgoja na temperaturama 20 °C i 30 °C. Za kvasac *Sp. passalidarum* CBS 10155 ovakav rezultat ne iznenađuje obzirom da je izoliran iz organizma kukca koji je hladnokrvna životinja. Kod svih provedenih uzgoja vidljivo je kako se radi o kvascima s produljenom fazom prilagođavanja na podlogu, lag fazom, obzirom da ulazak u eksponencijalni rast kvasci bilježe tek nakon 8. sata od inokulacije podloge. Uzgoj *Sp. arborariae* CBS 11463 na temperaturi od 20 °C pokazuje bolje rezultate koeficijenta konverzije glukoze u etanol ($Y_{\text{etanol/S}}=0,32$ g g⁻¹) i glicerol ($Y_{\text{glicerol/S}}=0,011$ g g⁻¹) nego što ih pokazuje uzgoj na temperaturi od 30 °C ($Y_{\text{etanol/S}}=0,29$ g g⁻¹; $Y_{\text{glicerol/S}}=0,003$ g g⁻¹). Međutim, koeficijent konverzije arabitola pokazao se boljim kod uzgoja na višoj temperaturi i iznosi $Y_{\text{arabitol/S}}=0,05$ g g⁻¹. Produktivnost etanola bilježi višu vrijednost kod uzgoja na 20 °C ($Pr_{\text{etanol}}=0,27$ g L⁻¹ h⁻¹), dok su produktivnost za glicerol i arabitol uspješnije kod uzgoja na temperaturi 30 °C ($Pr_{\text{glicerol}}=0,02$ g L⁻¹ h⁻¹, $Pr_{\text{arabitol}}=0,03$ g L⁻¹ h⁻¹). Kod uzgoja kvasca *Sp. passalidarum* CBS 10155 koeficijenti konverzije produkata etanola i glicerola također pokazuju veće vrijednosti kod uzgoja na 20 °C ($Y_{\text{etanol/S}}=0,36$ g g⁻¹; $Y_{\text{glicerol/S}}=0,009$ g g⁻¹) nego li na 30 °C ($Y_{\text{etanol/S}}=0,32$ g g⁻¹; $Y_{\text{glicerol/S}}=0,004$ g g⁻¹), dok je koeficijent konverzije supstrata u arabitol bolji na temperaturi 30 °C ($Y_{\text{arabitol/S}}=0,022$ g g⁻¹). Postignute produktivnosti također pokazuju kako je za etanol i glicerol uspješnija radna temperatura na 20 °C ($Pr_{\text{etanol}}=0,31$ g L⁻¹ h⁻¹, $Pr_{\text{glicerol}}=0,007$ g L⁻¹ h⁻¹), dok je produktivnost arabitola bolja pri 30 °C ($Pr_{\text{arabitol}}=0,02$ g L⁻¹ h⁻¹).

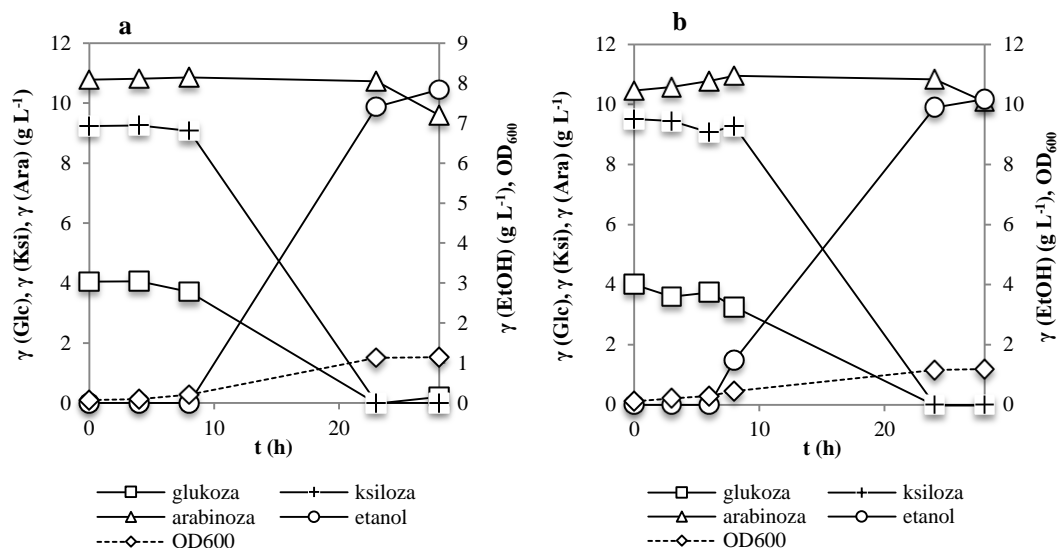
Usljed minimalnih razlika koje pokazuju vrijednosti konverzije supstrata u etanol pri uzgojima oba kvasca na 20 °C i 30 °C, koeficijenta konverzije supstrata u arabitol koji se pokazao uspješnijim za temperaturu 30 °C, upravo je temperatura 30 °C odabrana kao optimalna te se primjenila kod uzgoja oba kvasca na modelnim YP podlogama te hidrolizatima lignocelulozne sirovine izluženih rezanaca šećerne repe.

4.3. UZGOJ NE-*Saccharomyces* KVASACA U MODELNIM PODLOGAMA I NA HIDROLIZATU IZLUŽENIH ŠEĆERNIH REZANACA S CILJEM PROIZVODNJE KSILITOLA I ARABITOLA

U ovom su poglavlju prikazani uzgoji kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u modelnoj YP podlozi (poglavlje 4.3.1.) i na hidrolizatima dobivenim nakon kiselinske predobrade izluženih rezanaca šećerne repe u visokotlačnom reaktoru (poglavlje 4.3.2.) , na optimalnoj temperaturi uzgoja 30 °C i u mikroaerofilnim uvjetima uzgoja.

4.3.1. Uzgoj kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u modelnoj YP podlozi

Kako bi se mogli odrediti procesni parametri za potrošnju supstrata, proizvodnju biomase i produkata fermentacije provedeni su uzgoji ova dva ne-*Saccharomyces* kvasca u modelnoj podlozi koja se sastoji od ugljikohidrata prisutnih u hidrolizatima izluženih rezanaca šećerne repe. Navedeni ugljikohidrati su glukoza u koncentraciji 4 g L⁻¹, ksiloza 9 g L⁻¹ i arabinoza 11 g L⁻¹ (slika 12). Ostali sastojci (kvašćev ekstrakt i pepton) odgovaraju vrijednostima prisutim u standardnoj YPD podlozi. Tijek procesa prikazan je na slici 12, dok su parametri uspješnosti procesa prikazani u tablici 8.



Slika 12. Promjena koncentracije supstrata, OD₆₀₀ vrijednosti i produkata tijekom uzgoja kvasca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 (a) i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 (b) u mikroaerofilnim uvjetima na modelnoj YP podlozi pri 30 °C

Tablica 8. Određeni pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u mikroaerofilnim uvjetima na modelnoj YP podlozi pri 30 °C

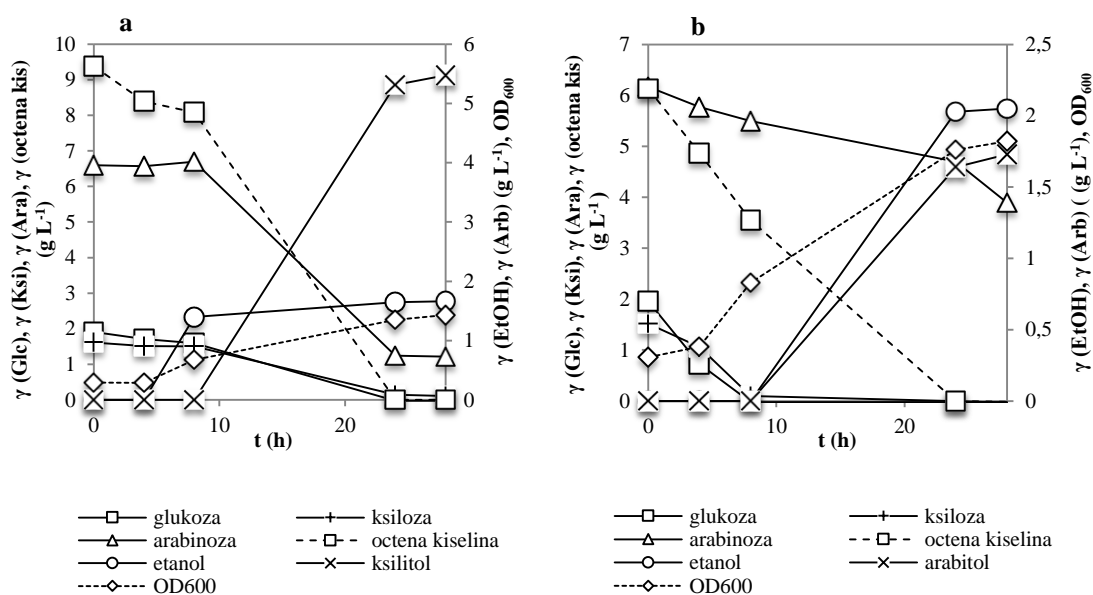
Parametri	<i>Sp. arborariae</i> CBS	<i>Sp. passalidarum</i>
	11463	CBS 10155
$Y_{\text{etanol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,327	0,416
$Y_{\text{arabitol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	-	-
$Pr_{\text{etanol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,28	0,363
$Pr_{\text{arabitol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	-	-

Iz grafičkih prikaza sa slike 12 jasno je vidljivo redosljedno trošenje supstrata iz podloge, tj. katabolička represija izvorom ugljika kada se kvasac *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 uzgajaju u modelnim YP podlogama u kojoj se istovremeno nalaze glukoza, ksiloza i arabinoza. Pritom kvasac sintetizira etanol kao primarni metabolit dok proizvodnja arabitola, odnosno ksilitola nije zabilježena. Izračunom određenih pokazatelja uspješnosti procesa pokazalo se kako kvasac *Sp. passalidarum* CBS 10155 ostvaruje veće koeficijente

konverzije supstrata u etanol ($Y_{\text{etanol/S}} = 0,416 \text{ g g}^{-1}$) i produktivnosti etanola ($Pr_{\text{etanol}} = 0,363 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nego što ih ostvaruje *Sp. arborariae* CBS 11463 za kojeg vrijedi koeficijent konverzije supstrata u etanol $Y_{\text{etanol/S}} = 0,327 \text{ g g}^{-1}$ i produktivnost proizvodnje etanola $Pr_{\text{etanol}} = 0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

4.3.2. Uzgoj kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 na hidrolizatima izluženih reznaca šećerne repe

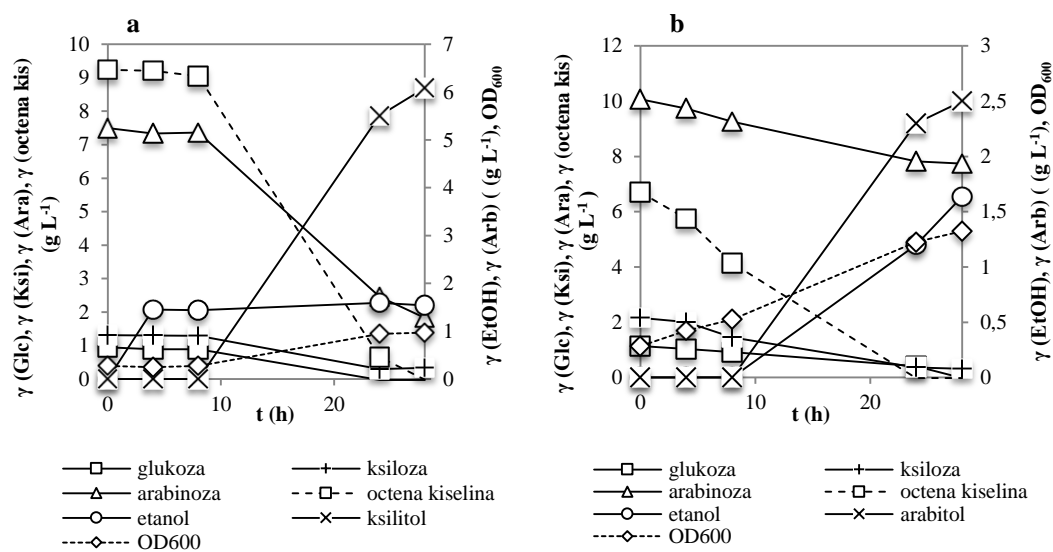
Za određivanje procesnih parametara potrošnje supstrata, proizvodnju biomase i produkata fermentacije provedeni su uzgoji ova dva ne-*Saccharomyces* kvasca na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom izluženih reznaca šećerne repe u visokotlačnom reaktoru. Uzgoji kvasaca na hidrolizatima prikazani su na slikama 13 i 14, dok su neki od parametara uspješnosti procesa prikazani u tablicama 9 i 10.



Slika 13. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze, etanola, ksilitola odnosno arabitola, octene kiseline i promjena optičke gustoće podloge (OD₆₀₀) tijekom uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 (a) i *Spathaspora passalidarum* 10155 (b) u hidrolizatu izluženih reznaca šećerne repe nakon kemijske hidrolize na 160 °C u vremenu zadržavanja od 5 minuta

Tablica 9. Određeni pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u mikroaerofilnim uvjetima na hidrolizatu izluženih reznaca šećerne repe nakon kemijske hidrolize na 160 °C u vremenu zadržavanja od 5 minuta

Parametri	<i>Sp. arborariae</i> CBS	<i>Sp. passalidarum</i>
	11463	CBS 10155
$Y_{\text{etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	0,16	0,20
$Y_{\text{ksilitol/S}}$ (g g ⁻¹)	0,46	-
$Y_{\text{arabitol/S}}$ (g g ⁻¹)	-	0,19
Pr_{etanol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,06	0,08
Pr_{ksilitol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,21	-
Pr_{arabitol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	-	0,07



Slika 14. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze, etanola, ksilitola odnosno arabitola, octene kiseline i promjena optičke gustoće podloge (OD₆₀₀) tijekom uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 (a) i *Spathaspora passalidarum* 10155 (b) u hidrolizatu izluženih reznaca šećerne repe nakon kemijske hidrolize na 180 °C u vremenu zadržavanja od 5 minuta

Tablica 10. Određeni pokazatelji uspješnosti šaržnih uzgoja kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u mikroaerofilnim uvjetima na hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe nakon kemijske hidrolize na 180 °C u vremenu zadržavanja od 5 minuta

Parametri	<i>Sp. arborariae</i> CBS	<i>Sp. passalidarum</i>
	11463	CBS 10155
$Y_{\text{etanol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,149	0,154
$Y_{\text{ksilitol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,31	-
$Y_{\text{arabitol/S}} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	-	0,13
$Pr_{\text{etanol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,06	0,06
$Pr_{\text{ksilitol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,23	-
$Pr_{\text{arabitol}} \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	-	0,09

Kvasci *Sp. arborariae* CBS 11463 i *Sp. passalidarum* CBS 10155 pokazuju sposobnost rasta na hidrolizatima dobivenim nakon predobrade u viokotlačnom reaktoru pri temperaturama od 160 °C i 180 °C i vremenu zadržavanja od 5 minuta (slike 13 i 14). Rast kvasaca nije zabilježen u podlozi nakon predtretmana razrijeđenom sumpornom kiselinom u vremenskom periodu zadržavanja 1 minute i 5 minuta na temperaturi od 200 °C te vremenskom zadržavanju od 10 minuta na temperaturi od 180 °C što se može pripisati visokim koncentracijama inhibitora u podlozi koji onemogućuju rast kvasca (rezultati shodno tome nisu prikazani).

Iako prema Cadete i sur. (2016) *Sp. arborariae* proizvodi etanol kao glavni produkt metabolizma ksiloze, na podlogama hidrolizata ova tvrdnja nije potvrđena (koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosi $Y_{\text{etanol/S}}=0.16 \text{ g g}^{-1}$ za podlogu 160 °C/5 minuta i $Y_{\text{etanol/S}}=0.149 \text{ g g}^{-1}$ za podlogu 180 °C/5 minuta). Isto istraživanje pokazuje kako *Sp. arborariae* karakterizira veća produktivnost ksilitola od onih postignutih sa *Sp. passalidarum*, koji rezultat je potvrđen i u ovom diplomskom radu. Koeficijent konverzije supstrata u ksilitol za podlogu hidrolizata 160 °C/5 minuta iznosi $Y_{\text{ksilitol/S}}=0,46 \text{ g g}^{-1}$, dok za podlogu hidrolizata 180 °C/5 minuta iznosi $Y_{\text{ksilitol/S}}=0,31 \text{ g g}^{-1}$. Produktivnost je međutim veća kod uzgoja na hidrolizatu 180 °C/5 minuta i iznosi $Pr_{\text{ksilitol}}=0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Jasno je vidljivo kako ovaj kvasac pokazuje preferenciju primarnog korištenja glukoze iz podloge, što potvrđuje i istraživanje Cadete i sur.

(2009) gdje je dokazana katabolička represija glukozom u podlozi s prisutnim koncentracijama glukoze i ksiloze. Pritom je $Y_{\text{etanol/S}}$ iznosio 0,35-0,37 g etanola g^{-1} šećera. Kod uzgoja na podlogama hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe 180 °C/5 minuta i 160 °C/5 minuta zabilježeno je opadanje koncentracije octene kiseline od samog početka uzgoja, što znači da ovaj kvasac ima sposobnost rasta na acetatu kao izvoru ugljika u podlozi, što može biti razlog značajnim prinosima ksilitola. Naime, visoke koncentracije soli i šećera, prisutne u podlogama hidrolizata, predstavljaju stresne uvjete za stanice kvasca. U takvim uvjetima dolazi do nakupljanja šećernih alkohola, u ovom slučaju ksilitola koji funkcionira kao osmolit i tako sprječava dehidraciju stanica (Kumdam i sur., 2014). Ista tvrdnja vrijedi za kvasac *Sp. passalidarum* CBS 10155. Međutim, uzgoj *Sp. passalidarum* CBS 10155 na hidrolizatima izluženih rezanaca šećerne repe ukazuje na istovremenu potrošnju sva 3 izvora ugljika u podlozi: glukozu, ksilozu i arabinozu, bez kataboličke represije glukozom, te tako kao produkt metabolizma stvara šećerni alkohol arabitol. Koeficijent konverzije supstrata u arabitol veći je kod uzgoja kvasca na hidrolizatu 160 °C/5 minuta i iznosi $Y_{\text{arabitol/S}}=0,19 \text{ g g}^{-1}$, dok za hidrolizat 180 °C/5 minuta iznosi $Y_{\text{arabitol/S}}=0,13 \text{ g g}^{-1}$. Produktivnost proizvodnje arabitola ista je za uzgoj na oba hidrolizata i iznosi $P_{\text{arabitol}}= 0,07 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Prema istraživanju kojeg su provodili Su i sur. (2015), koncentracija proizvedenog arabitola kada se u podlozi kao izvor ugljika koristi glukoza, ksiloza ili kombinacija glukoze i ksiloze ne prelazi 1,0 g L^{-1} . Pritom se može zaključiti kako dodatak arabinoze u podlogu primjetno utječe na prinose arabitola. Naime, prilikom uzgoja kvasca *Sp. passalidarum* CBS 10155 na hidrolizatima izluženih rezanaca šećerne repe (koji u svom sastavu sadrže arabinan u masenom udjelu od približno 70 %) koncentracija proizvedenog arabitola iznosila je 1,73 g L^{-1} pri uzgoju na hidrolizatu 160 °C/5 minuta i 2,6 g L^{-1} pri uzgoju na hidrolizatu 180 °C/5 minuta. *Sp. passalidarum* pokazuje superiorniju proizvodnju etanola kada se u podlozi nalazi samo ksiloza, sa specifičnom produktivnošću etanola više od 3 puta većom nego kada se u podlozi nalazi glukoza kao jedini izvor ugljika (Su i sur., 2015; Long i sur., 2012). Kada se uzgaja u podlozi sa ksilozom u uvjetima s ograničenim kisikom, kvasac postiže visoke prinose etanola (do 0,48 g g^{-1} , blizu teoretskog maksimuma, 0,51 g g^{-1}), visoku produktivnost i brzu potrošnju šećera (Hou, 2012). Prinosi etanola su značajno niži na uzgojima hidrolizata rezanaca šećerne repe ($Y_{\text{etanol/S}}=0,2 \text{ g g}^{-1}$ na hidrolizatu 160 °C/5 minuta i $Y_{\text{etanol/S}}=0,154 \text{ g g}^{-1}$ na hidrolizatu 180 °C/10). Ovakvi rezultati se mogu pripisati prisutnosti inhibitora u hidrolizatnim podlogama koji stvaraju stresnu okolinu

za kvasac, čiji metabolizam se pritom primarno okreće proizvodnji šećernih alkohola kako bi mogao preživjeti u inhibirajućoj okolini.

5. ZAKLJUČCI

1. Kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru dobivene su tekuća faza (hidrolizat) i čvrsta faza. Predobrada se provodila u temperaturnom rasponu od 160 °C do 200 °C te vremenima zadržavanja od 1 minute do 10 minuta.
2. Maksimalni prinos ukupnih ugljikohidrata (glukoza, ksiloza, arabinoza) u hidrolizatu postignut je pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute. Udio arabinoze u ukupnim ugljikohidratima, određen pri navedenim uvjetima iznosi 80,60 %.
3. Svi hidrolizati dobiveni predtretmanom sadrže značajan udio arabinoze te se kao takvi mogu koristiti za proizvodnju etanola i šećernih alkohola s pomoću odgovarajućih ne-*Saccharomyces* kvasaca. Čvrsta faza sadrži visoki udio glukana te se nakon hidrolize može koristiti u standardnim bioprocima s pomoću mikroorganizama koji rastu na glukozu.
4. Istraživanjem rasta ne-*Saccharomyces* kvasaca *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u YPD podlogama pri mikroaerofilnim uvjetima u rasponu temperatura od 20 do 50 °C, dobivena je optimalna temperatura za rast i uzgoj istraživanih kvasaca od 30 °C. Pri navedenoj temperaturi postignuta je maksimalna produktivnost proizvodnje etanola i šećernih alkohola za oba kvasca.
5. Ne-*Saccharomyces* *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 kvasci rastu i troše sva tri ugljikohidrata (glukozu, ksilozu i arabinozu) iz modelne YP podloge i hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe dobivenih kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru pri 160 do 180 °C i vremenu zadržavanja od 5 minuta. Na ostalim dobivenim hidrolizatima rast i aktivnost ovih ne-*Saccharomyces* kvasca je zanemariva zbog prisutnosti različitih inhibitora (octena kiselina, furani i razgradni produkti lignina).

6. Kvasci *Spathaspora arborariae* CBS 11463 i *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 tijekom fermentacija osim etanola kao glavnog produkta metabolizma proizvode i šećerne alkohole, ksilitol i arabitol te tako imaju potencijalnu primjenu u biorafinerijskom konceptu proizvodnje biokemikalija na obnovljivim izvorima ugljikohidrata.

6. LITERATURA

Ahors, R., Medina, F., Constanti, M. (2018) Significance and challenges of biomass as a suitable feedstock for bioenergy and biochemical production. *Energies* **11**, 33-66.

Almeida, R. M., Modig, T., Petersson, A. (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **349**(4), 340–349.

Alonso, D. M., Wettstein, S. G., Dumesic, J. A. (2013) Gamma-valerol-actone, a sustainable platform molecule derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.* **15**, 584–595.

Anonymus (2020) Shematski prikaz dobivanja izluženih rezanaca šećerne repe iz procesa proizvodnje šećera <<http://www.secerana.hr/default.aspx?id=45>> Pristupljeno 27. listopada 2020.

Bajwa, P. K., Pinel, D., Martin, V. J., Trevors, J. T., Lee, H. (2010) Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *J. Microbiol. Methods.* **81**, 179–186.

Bajwa, P. K., Shireen, T., D'Aoust, F., Pinel, D., Martin, V.J., Trevors, J. T., Lee, H. (2009) Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hard- wood spent sulfite liquor. *Biotechnol. Bioeng.* **104**, 892–900.

Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. *Energy Convers. Manag.* **52**, 858-875.

Bicho, P. A., Runnals, P. L., Cunningham, J. D., Lee, H. (1988) Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Appl. Environ. Microb.* **54**, 50–54.

Branco, R. H., Serafim, L. S., Xavier, A. M. (2019) Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. *Ferment.* **5**(1), 4.

Cadete, R. M., Alejandro, M., Sandström, A. G., Ferreira, C., Gírio, F., Gorwa-Grauslund, M. F., Rosa, C. A., Fonseca, C. (2016) Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 1-14.

Cadete, R. M., Rosa, C. A., Alejandro, M. (2017) The yeast of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second- generation biofuel production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **188**, 375-296.

Cadete, R. M., Santos, R. O., Melo, M. A., Mouro A., Goncalves, D. L., Stambuk, B. U., Gomes, F. C. O., Lachance, M. A., Rosa, C. A. (2009) *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1338-1342.

Cadiere, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Dequin, S. (2011) Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metab. Eng.* **13**, 263–271.

Cetera, P., D'Auria, M., Mecca, M., Todaro, L. (2018) Gallic acid as main product in the water extractives of *Quercus frainetto* ten. *Nat. Prod. Res.* **14**, 1–4.

Clifton, D., Fraenkel, D. G. (1981) The gcr (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**, 13074–13078.

da Cunha-Pereira, F., Hickert, L. R., Sehnem, N. T., de Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., Ayub, M. A. Z. (2011) Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresour. Technol.* **102**, 4218-4225.

Deeba, F., Pruthi, V., Negi, Y. S. (2015) Converting paper mill sludge into neutral lipids by oleaginous yeast *Cryptococcus vishniacii* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **213**, 96–102.

Della-Bianca, B. E., Basso, T. O., Stambuk, B. U., Basso, L. C., Gombert, A. K. (2013) What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl. Micro. Biotechnol.* **97**, 979–991.

du Preez, J. C., van Driessel, B., Prior, B. A. (1989) Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved-oxygen levels. *Appl. Microbiol. Biot.* **30**, 53–58.

Duwe, A., Tippkötter, N., Ulber, R. (2019) Lignocellulose- biorefinery: ethanol-focused. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **166**, 177–215.

Fache, M., Boutevin, B., Caillol, S. (2016) Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 35–46.

Gallezot, P. (2012) Conversion of biomass to selected chemical products. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1538–1558.

Gellisen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 741–750.

Gombert, A. K., van Maris, A. J. (2015) Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast- based production processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **33**, 81–86.

Grgić, M. (2011) Millard-ove reakcije (diplomski rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek.

Gírio, F., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.*

101(13), 4775-4800.

Hafid, H. S., Rahman, N. A. A., Shah, U. K. M., Baharuddin, A. S., Ariff, A. B. (2017) Feasibility of using kitchen waste as future substrate for bioethanol production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **74**, 671-686.

Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sagiocco, F., Boucherie, H. (2001) The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 76–85.

Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmüller, H., Sinner, M., Esterbauer, H. (1993) Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. U: Bioconversion of forest and agricultural plant residues, (Saddler, J.N., ured.) CAB International, Wallingford, UK, str. 33-72.

Hawkins, G. M., Ghose, D., Russel, J., Peterson, J. (2013) Production of ethanol from high dry matter of pretreated loblolly pine by an evolved strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioremediation Biodegrad.* **4**,195.

Hector, R. E., Qureshi, N., Hughes, S. R., Cotta, M. A. (2008) Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 675–684.

Ivančić – Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem – Ind.* **65**, 25-38.

Isikgor, F. H., Becer, C. R. (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* **6**, 4497-4559.

Jönsson, L. J., Martín, C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour.*

Technol. **199**, 103-112.

Kamm, B. (2007) Production of platform chemicals and synthesis gas from biomass. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 5056–5058.

Karagoz, P., Roslyn, M. B., Ozkan, M. (2019) Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, immobilization and reactor configurations. *Renew. Energ.* **143**, 741-752.

Khan, I. U., Hafiz-Dzarfan-Othman, M., Hashim, H., Matsuura, T., Ismail, A. F., Rezaei-Dasht-Arzhandi, M., Wan Azelee, I. (2017) Biogas as a renewable energy fuel- a review of biogas upgrading, utilisation and storage. *Energy Convers. Manage.* **150**, 277–294.

Kim, S., Dale, B. E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass Bio-energ.* **26**, 361- 375.

Kordowska-Wiater, M., Kubik-Komar, A., Targonski, Z. (2012) Optimization of Arabitol Production by Karyoductant SP-K 7 of *S. cerevisiae* V30 and *P. stipitis* CCY 39501 Using Response Surface Methodology. *Pol. J. Microbiol.* **61**, 291-297.

Kumar, N., Pruthi, V. (2014) Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnol. Rep.* **4**, 86–93.

Kumar, R., Bearrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**(8), 3713-3729.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 377–391.

Kumdam, H., Murthy, S. N., Gummadi, S. N. (2014) Arabitol production by microbial fermentation - biosynthesis and future applications. *IJSAR* **1**, 1-12.

- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R. (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J. Microb. Biotech.* **100**, 507–519.
- Lange, J. P. (2007) Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* **1**, 39–48.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., Taherzadeh, M. J. (2014) Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresour. Technol.* **165**, 3–8.
- Lichtenthaler, F. W. (2002) Unsaturated O- and N-heterocycles from carbohydrate feedstocks. *Acc. Chem. Res.* **35**, 728–737.
- Liguori, R., Faraco, V. (2016) Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Biores Technol.* **215**, 13–20.
- Liyamen, A., Ricke, S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust.* **38**(4), 449-467.
- Lončar, A. (2019) Selekcija kvasaca iz rodova *Scheffersomyces*, *Candida* i *Spathaspora* za industrijsku proizvodnju biokemikalija (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Long, T. M., Su, Y. K., Headman, J., Higbee, A., Willis, L. B., Jeffries, T. W. (2012) Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5492-5500.
- Lynd, L. (2017) Cellulosic ethanol: status and innovation, *Curr. Opin. Biotechnol.* **45**, 202-211.

Madhavan, A., Srivastava, A., Kondo, A., Bisaria, V. S. (2012) Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 22–48.

Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol production from dilute-acid pre-treated wheat straw liquor hydrolysate by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32**(4), 483-499.

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

Matoković, V. (2018) Analiza životnog ciklusa (LCA) procesa proizvodnje etanola kao biogoriva iz obnovljivih izvora sirovine (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Matsuo, Y., Yanagisawa, A., Yamashita, Y. (2013) A global energy outlook to 2035 with strategic considerations for Asia and Middle East energy supply and demand interdependencies. *Energy Strategy Rev.* **2**, 79–91.

Mesbahi, G., Jamalian, J., Farahnaky, A. (2005) A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food system. *Food Hydrocolloids* **19**, 731-738.

Micard, V., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F. (1997) Influence of pretreatments on enzymatic degradation of a cellulose-rich residue from sugar-beet pulp. *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**, 284-291.

Mohan, S. V., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Reddy, C. N., Rohit, M. V., Kumar, A. N., Sarkar, O. (2016) Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. *Biores. Technol.* **215**, 2–12.

Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S. S., Thatoi, H. (2017) Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol

production from grass biomass: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **78**, 1007-1032.

Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., Aroca, G. (2014) Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impact and energy balance. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **42**, 1349.

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

Nakanishi, S. C., Soares, L. B., Biazi, L. E, Nascimento, V. M., Costa, A. C, Rocha, G. J. M, Ienczak, J. L. (2017) Fermentation strategz for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 332-348.

Nanda, S., Dalai, A.K., Kozinski, J.A. (2016) Supercritical water gasification of timothy grass as an energy crop in the presence of alkali carbonate and hydroxide catalysts. *Biomass Bio-energ.* **95**, 378–387.

Nanda, S., Dalai, A.K., Pant, K.K., Gökalp, I., Kozinski, J.A. (2018) An appraisal on biochar functionality and utility in agronomy. U: *Bioenergy and Biofuels* (Konur, O., ured.), CRC Press, Florida/SAD, str. 389–409.

Nardi, J.B., Bee, C.M., Miller, L.A., Nguyen, N.H., Suh, S.O., Blackwell, M. (2006) Communities of microbes that inhabit the changing hind gut landscape of a subsocial beetle. *Arthropod Structure and Development* **35**, 57–68.

Nguyen, N.H., Suh, S.O., Marshall, C.J., Blackwell, M. (2006) Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycological Res.* **110**, 1232-1241.

Okolie, J.A., Nanda, S., Dalai, A.K., Kozinski, J.A. (2020) Chemistry and Specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **352**, 201-222.

Parakh, P.D., Nanda, S., Kozinski, J.A. (2020) Eco-friendly transformation of waste biomass to biofuels. *Curr. Biochem. Eng.* **6**, 120–134.

Patelski, P., Berłowska, J., Dziugan, P. (2015) Utilisation of sugar beet bagasse for the biosynthesis of yeast SCP. *Journal of Food Engineering*, vol. **167**, 32–37.

Prasad, R.K., Chatterjee, S., Mazumder, P.B., Gupta, S.K., Sharma, S., Vairale, M.G. (2019) Bioethanol production from lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. *Chemosphere* **231**, 588-606.

Rahman, S.H.A., Choudhury, J.P., Ahmad, A.L., Kamaruddin, A.H. (2007) Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresour. Technol.* **98**, 554–559.

Rapagnà, S., Jand, N., Foscolo, P.U. (2002) Catalytic gasification of biomass to produce hydrogen rich gas. *Int. J. Hydrogen Energy* **23**, 551–557.

Reddy, S.N., Nanda, S., Kozinski, J.A. (2016) Supercritical water gasification of glycerol and methanol mixtures as model waste residues from biodiesel refinery. *Chem. Eng. Res. Des.* **113**, 17–27.

Rezić T., Šantek M. I., Andlar M., Pavlečić M., Šantek B. (2016). Comparison of different techniques for bioethanol production from lignocellulosic raw materials. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **11**(1/2): 6-17.

Rosales-Calderon, O., Arantes, V. (2019) A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnol. Biofuels.* **12**(1), 240.

Roy, P., Dutta, A. (2019) Life cycle assessment (LCA) of bioethanol produced from different food crops: economic and environmental impacts. U: Bioethanol Production from Food Crops, (Ray, R.C., Ramachandran, S., ured.), Elsevier Applied Science, London/New York, str. 385-399.

Ruchala, J., Kurylenko, O., Dmytruk, K.V., Sibirny, A.A. (2019) Construction of advanced producers of first-and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* **52**, 301-332.

Ryabova, O.B., Chmil, O.M., Sibirny, A.A. (2003) Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* **4**,157–164.

Saha, B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279–291.

Sarangi, P.K., Nanda, S. (2020) Biohydrogen production through dark fermentation. *Chem. Eng. Technol.* **43**, 601–612.

Shiu, P.J., Gunawan, S., Hsieh, W.H., Kasim, N.S., Ju, Y.H. (2010) Biodiesel production from rice bran by a two-step in-situ process. *Bioresour. Technol.* **101**, 984–989.

Smuga-Kogut, M., Piskier, T., Walendzik, B., Szymanowska- Powalowska, D. (2019) Assessment of wasteland derived biomass for bioethanol production. *Electron. J. Biotechn.* **41**, 1-8.

Srivastava, A., Prasad, R. (2000) Triglycerides-based diesel fuels. *Renew. Sust. Energy Rev.* **4**, 111–133.

Su, Y. K., Willis, L. B., Jeffries, T. W. (2015) Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and

Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 457-469.

Thangavelu, S. K., Ahmed, A. S., Ani, F. N. (2016) Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **56**, 820-835.

Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S. (2014) Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Environ. Chem. Eng.* **2**, 573–584.

Vrdoljak, J. (2019) Usporedba procesa kiselinske i alkalne predobrade otpadne trave u visokotlačnom reaktoru (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., Faruq, G. (2017) Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **71**, 475-501.

Zanwar, A. A., Badole, S. L., Shende, P. S., Hegde, M. V., Bodhankar, S. L. (2013) Role of gallic acid in cardiovascular disorders. *Polyphenols Hum. Heal. Dis.* **2**, 1045–1047.

Zhang, G. C., Liu, J. J., Kong, I. I., Kwak, S., Jin, Y. S. (2015) Combining C6 and C5 sugar metabolism for enhancing microbial bioconversion. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **29**, 49–57.

Zhao, Y., Damgaard, A., Christensen, T. H. (2018) Bioethanol from corn stover: a review and technical assessment of alternative biotechnologies. *Prog. Energy Combust. Sci.* **67**, 275-291.

Watson, S. A. (2003) Description, development, structure and composition of the corn kernel. *Cornea: chemistry and technology* **2**, 69–106.

Weierstall, T., Hollenberg, C. P., Boles, E. (1999) Cloning and characterization of

three genes (SUT1e3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*.
Mol. Microbiol. **31**(3), 871-883.

Wong, D. W. (2009) Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157**, 174-209.

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.

Potpis