

Uzgoj kvasaca iz roda *Spathaspora* i proizvodnja arabitola na hidrolizatu dobivenom kiselinom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe

Kelemen, Zora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:707384>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2021.

Zora Kelemen

1473/BPI

**Uzgoj kvasaca iz roda *Spathaspora* i
proizvodnja arabitola na hidrolizatu
dobivenom kiselinskom predobradom
izluženih rezanaca šećerne repe**

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

Diplomski rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta “Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina” (HRZZ-9717).

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na uloženom trudu i vremenu, riječima potpore te dobroj volji. Posebno se zahvaljujem na motivaciji i mogućnosti da se uputim u nove izazove.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Antoniji Trontel, Nenadu Marđetku mag. ing. bioproc., dr. sc. Blanki Ljubas, Marini Grubišić mag. ing. bioproc. i Igoru Livadi na pomoći, savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju. Također, zahvaljujem se prof. dr. sc. Vlatki Petravić Tominac na svim korisnim savjetima i pomoći tijekom posljednje dvije godine.

Hvala mojim roditeljima i prijateljima na podršci tijekom studija.

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

Uzgoj kvasaca iz roda *Spathaspora* i proizvodnja arabitola na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe

Zora Kelemen, 1473/BPI

Sažetak: Kvasci roda *Spathaspora* imaju sposobnost previranja heksoza i pentoza te se iz tog razloga istražuju za proizvodnju biokemikalija i biogoriva iz lignoceluloznih sirovina. U ovome radu istražen je rast kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 na arabinozi pri različitim brzinama okretaja tresilice (50, 100, 150 i 250 o min⁻¹). Također istražena je proizvodnja arabitola na hidrolizatu izluženih repinih rezanaca dobivenom kiselinskom hidrolizom. Uzgojem kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 na podlozi s arabinozom utvrđeno je da povećanjem broja okretaja iznad 100 o min⁻¹ ne dolazi do značajnog povećanja koncentracije arabitola (2,7873 g L⁻¹) dok kvascu *Spathaspora arborarie* CBS 11463 najviše pogoduje brzina od 250 o min⁻¹ za proizvodnju arabitola (4,1491 g L⁻¹). Uzgojima pri svim brzinama okretaja tresilice utvrđene specifične brzine rasta kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 su manje od kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155. Uzgojem na kiselinskom hidrolizatu kvasac *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 proizvedeno je 8,4810 g L⁻¹ arabitola ($Y_{P/S}=0,6038$ g g⁻¹, $Pr=0,1767$ g L⁻¹ h⁻¹). Na kraju uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463, koncentracija arabitola iznosila je 2,1759 g L⁻¹ ($Y_{P/S}=0,5570$ g g⁻¹, $Pr=0,0453$ g L⁻¹ h⁻¹).

Ključne riječi: arabitol, *Spathaspora*, izluženi repini rezanci, lignoceluloza

Rad sadrži: 43 stranice, 21 slika, 5 tablica, 39 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac
2. doc. dr. sc. Mario Novak
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing and Malting Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Spathaspora cultivation and arabitol production on exhausted sugar beet cossettes hydrolysate

Zora Kelemen, 1473/BPI

Abstract: *Spathaspora* yeasts have become of interest for biofuel and biochemicals production from lignocellulose because of their ability to co-ferment hexoses and pentoses. Arabinose fermentation by *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 and *Spathaspora arborarie* CBS 11463 at different agitation speeds (50, 100, 150 and 250 rpm) was explored in this thesis. In addition, arabitol production from acid hydrolysate of exhausted sugar beet cossettes was investigated. By cultivating *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 in arabinose-rich medium, it was determined that by increasing agitation speed above 100 rpm, there is not a significant increase in arabitol production ($2,7873 \text{ g L}^{-1}$) while the agitation speed of 250 rpm is favoured for arabitol production by *Spathaspora arborarie* CBS 11463 ($4,1491 \text{ g L}^{-1}$). During all cultivations, specific growth rate of *Spathaspora arborarie* CBS 11463 was lower than that of *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 at the same agitation speed. When grown on the acid hydrolysate of exhausted sugar beet cossettes, yeast *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 produced $8,4810 \text{ g L}^{-1}$ of arabitol ($Y_{P/S}=0,6038 \text{ g g}^{-1}$, $Pr=0,1767 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) while *Spathaspora arborarie* CBS 11463 produced $2,1759 \text{ g L}^{-1}$ ($Y_{P/S}=0,5570 \text{ g g}^{-1}$, $Pr=0,0453 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Keywords: arabitol, *Spathaspora*, exhausted sugar beet cossettes, lignocellulose

Thesis contains: 43 pages, 21 figures, tables, 39 references, 1 supplement

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 Vlatka Petravić Tominac, Full professor
2. PhD Mario Novak, Assistant professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Blaženka Kos, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 29, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	3
2.2. PREDOBRADA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	5
2.3. ŠEĆERNA REPA.....	7
2.4. ARABITOL.....	9
2.5. NE- <i>Saccharomyces</i> KVASCI.....	11
2.6. KVASCI RODA <i>Spathaspora</i>	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Sirovina	14
3.1.2. Radni mikroorganizmi korišteni u istraživanju	14
3.1.3. Kemikalije	15
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca <i>Spathaspora</i> sp.	15
3.1.4.1. <i>Kemijski definirane hranjive podloge</i>	15
3.1.4.2. <i>Kompleksna hranjiva podloga za uzgoj kvasaca <i>Spathaspora</i> sp. u biorektorskim sustavima</i>	16
3.1.5. Aparatura i pribor	16
3.1.5.1. <i>Bioreaktor s miješalom</i>	16
3.1.5.2. <i>Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)</i>	17
3.1.5.3. <i>UV-Vis spektrofotometar</i>	18
3.1.5.4. <i>Ostala oprema</i>	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Priprema inokuluma i podloga za uzgoj kvasaca <i>Spathaspora</i> sp.....	19
3.2.1.1. <i>Priprema inokuluma za uzgoj kvasaca <i>Spathaspora</i> sp.</i>	19
3.2.1.2. <i>Priprema hranjive podloge s arabinozom za ispitivanje kinetike rasta kvasaca <i>Spathaspora</i> sp. pri različitim brzinama okretaja tresilice</i>	19
3.2.2. Ispitivanje kinetike rasta kvasaca <i>Spathaspora</i> sp. i sinteze proizvoda u kemijski definiranoj podlozi pri različitim uvjetima aeracije	20
3.2.3. Uzgoj kvasaca <i>Spathaspora</i> sp. u hidrolizatu izluženih repinih rezanaca u biorektoru... ..	20
3.2.4. Analitičke metode.....	21
3.2.4.1. <i>Određivanje optičke gustoće podloge</i>	21
3.2.4.2. <i>Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)</i>	21
3.2.4.3. <i>Određivanje specifične potrošnje kisika u biorektoru s miješalom</i>	21
3.2.4.4. <i>Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase</i>	22
3.2.5. Proračun pokazatelja uspješnosti uzgoja	23

4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. AEROBNI UZGOJ KVASCA IZ RODA <i>Spathaspora</i> U KEMIJSKI DEFINIRANOJ PODLOZI PRI RAZLIČITIM UVJETIMA MIJEŠANJA	24
4.1.1. Uzgoj kvasca <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155 u kemijski definiranoj podlozi s arabinozom	24
4.1.2. Uzgoj kvasca <i>Spathaspora arborarie</i> CBS 11463 u podlozi s arabinozom.....	29
4.2. UZGOJ KVASACA <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155 I <i>Spathaspora arborarie</i> CBS 11463 U KISELINSKOM HIDROLIZATU IZLUŽENIH REPINIHZ REZANACA I BIOREAKTORU S MIJEŠALOM	35
4.2.1. Uzgoj kvasca <i>Spathaspora passalidarum</i> CBS 10155 u bioreaktoru u kiselinskom hidrolizatu izluženih repinihz rezanaca.....	35
4.2.2. Uzgoj kvasca <i>Spathaspora arborarie</i> CBS 11463 u bioreaktoru u kiselinskom hidrolizatu izluženih repinihz rezanaca	37
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40
PRILOZI.....	44

1. UVOD

Nedostatak prirodnih resursa, povećanje populacije, onečišćenje okoliša i globalno zatopljenje su među najvećim problemima današnjice. Problemi s resursima su pretežito posljedica prekomjerne eksploatacije, neracionalnog razvoja i pretjeranog korištenja resursa u kombinaciji s porastom stanovništva i ekonomskim razvojem. Kako bi se smanjio njihov utjecaj i osigurao dug vijek našeg ekosustava, potrebno je pronaći alternativna rješenja poput korištenja obnovljivih izvora. Obnovljivi izvori se, za razliku od neobnovljivih, ne mogu iscrpiti. Oni uključuju solarnu energiju, energiju vjetera, vode, biomasu i druge. Sunce, vjetar i drugi obnovljivi izvori energije mogu osigurati energiju, ali ne mogu stvoriti proizvod, za razliku od ugljena i nafte, koji tvore ogromnu petrokemijsku industriju i izvorišna su sirovina za tisuće kemijskih proizvoda (Chen , 2015).

Zbog zabrinutosti oko smanjenja zaliha fosilnih goriva i povećane emisije CO₂ porastao je interes za korištenjem biomase kao sirovine za proizvodnju biogoriva i biokemikalija. Biomasa može biti mikroba, životinjska ili biljna te uključuje i njihove otpatke. Biljna biomasa nastaje procesom fotosinteze. Fotosintezom se, uz energiju Sunca, uklanja CO₂ iz atmosfere te se ugljik ugrađuje u ugljikohidrate koji između ostalog čine lignocelulozu. Lignoceluloza je građena od polimera celuloze, hemiceluloze, lignina te drugih kemijskih spojeva prisutnih u manjim udjelima (Shafiei i sur., 2015). Izvori lignoceluloznih sirovina su poljoprivredni i prehrambeni otpaci, otpaci drvoprerađivačke industrije, energetske usjevi i drugi. Celuloza i hemiceluloza su ugljikohidratni polimeri čijom se fermentacijom mogu proizvesti mnogi vrijedni proizvodi, a jedan od njih je arabitol. To je poliol slatkog okusa i niske kaloričnosti koji se zbog tih karakteristika često koristi kao zaslađivač u prehrambenoj industriji (Kordowska-Wiater, 2015).

Šećerna repa je u našem dijelu svijeta najvažnija sirovina za proizvodnju saharoze. Tijekom procesa proizvodnje šećera nastaje velika količina lignoceluloznih nusproizvoda koji nisu potpuno iskorišteni. Više od 60 % mase svježe šećerne repe nakon procesa proizvodnje šećera zaostaje kao izluženi repini rezanci (Vojvodić Cebin, 2019). Oni su odličan izvor lignoceluloze te nakon predobrade daju hidrolizat bogat arabinozom, ksilozom i glukozom (Perković, 2020).

U ovom radu istražena je fermentacijska sposobnost kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 na podlozi s arabinozom kao izvorom ugljika koji je dostupan u određenim lignoceluloznim sirovinama. Praćen je rast navedenih vrsta kvasaca i proizvodi njihovog metabolizma tijekom uzgoja u manjem mjerilu. Također je proveden uzgoj oba kvasca u bioreaktoru s miješalom na kiselinskom hidrolizatu izluženih repinih reznaca s ciljem proizvodnje arabitola i ostalih biokemikalija.

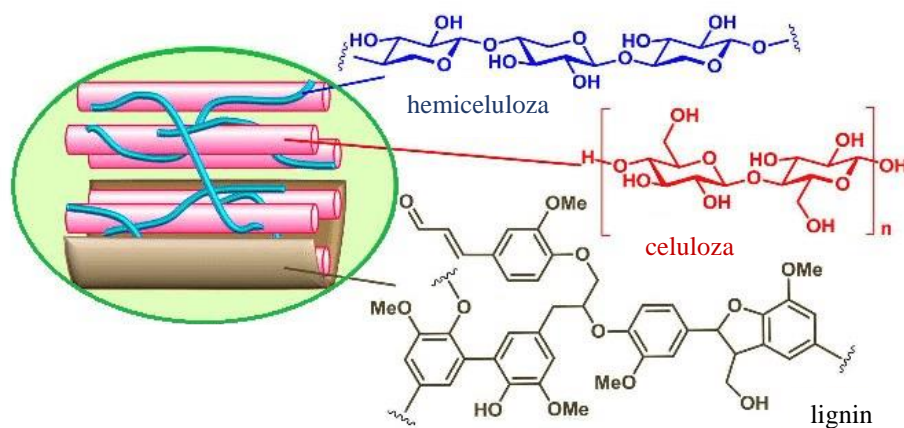
2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Pritisak na smanjenje korištenja fosilnih goriva povećao je interes za korištenjem alternativnih izvora energije. Obnovljivim izvorima energije pripadaju: solarna energija, energija vjetra i vode, energija pohranjena u biomasi i dr. Biomasa uključuje svu organsku tvar koja je nastala prilikom rasta i života organizama. U procesu fotosinteze solarna energija se skladišti unutar kemijskih veza nastalih kemijskim reakcijama. Prilikom rasta biljka uzima ugljikov dioksid iz atmosfere i koristi ga kao izvor ugljika. Najveća prednost korištenja biomase kao alternative fosilnim izvorima energije je da ne utječe na neto povećanje količine stakleničkih plinova u atmosferi (Chen, 2015). Sintezom biomase uklanja se ugljikov dioksid iz atmosfere, a njenim korištenjem se ispušta u atmosferu. Izvori biomase su vrlo različiti i uključuju različite vrste organizama: mikroorganizme, biljke i životinje te njihove otpatke. Lignocelulozna biomasa je obnovljivi organski materijal nastao rastom biljaka. Izvori lignocelulozne biomase su energetske usjevi (npr. biljke iz roda *Miscanthus*), otpaci iz poljoprivredne (stabljike i listovi biljaka, sijeno, trava, kukuruzni oklasci, slama, kukuruzovina), prehrambene i drvoprerađivačke industrije, komunalni otpadni papir i drugi (Ivančić Šantek i sur., 2016; Chen, 2015). S obzirom da nastaje procesom fotosinteze, lignoceluloza je jedna od najobnovljivijih sirovina iz prirode te se smatra alternativnom sirovinom za proizvodnju goriva i kemikalija (Pacheco i sur., 2021).

Strukturu lignoceluloze čine tri polimera: celuloza, hemiceluloza i lignin. Osim njih, lignoceluloza može sadržavati i ekstraktivne tvari (voskovi, smole i ulja), pektin te pepeo (Shafiei i sur., 2015). Celuloza je linearni polimer sastavljen od monomera glukoze koji su povezani β -1,4-glikozidnom vezom. Glukoza iz celuloze fermentabilan je šećer te se može koristiti kao izvor ugljika za rast mikroorganizama i proizvodnju biokemikalija i biogoriva (Pacheco i sur., 2021). Lanci celuloze međusobno su povezani s 3 hidroksilne skupine glukoze te čine kompaktnu strukturu celuloze. Većina celuloze je u kristaliničnom obliku dok se manji udio celuloze nalazi u amorfnom obliku (Sánchez, 2009). Kristalična struktura čini celulozu vrlo teško razgradivom stoga je potreban proces predobrade prije fermentacije. Hemiceluloza je heteropolimer amorfne strukture građena od pentoza (ksiloze i arabinoze) i heksoza (glukoze, galaktoze, manoze) te uz to može sadržavati i neke organske kiseline (van der Pol i sur., 2014). Hemiceluloza može biti acetilirana na C2- i C3- atomu osnovnog lanca ksiloze (Zhou i sur., 2016). Prilikom predobrade može doći do hidrolize acetilnih skupina te oslobađanja octene

kiseline u hidrolizat. Udio pojedinih šećera varira ovisno o uvjetima rasta i o vrsti biljke, primjerice u travi i u tvrdom drvu dominira ksiloza s nešto arabinoze. Za razliku od celuloze, hemiceluloza je razgranate strukture, a time i manje čvrstoće (Malav i sur., 2017; Shafiei i sur., 2015; Jönsson i sur., 2013). Lignin je amorfni heteropolimer koji se sastoji od aromatskih spojeva. Sačinjavaju ga tri monomera: kumaril-, koniferil- i sinapil-alkohol. Oni su međusobno povezani esterskim vezama te tvore kompleksnu, umreženu strukturu. S obzirom da lignin tvore aromatski spojevi, on pruža hidrofobnost staničnoj stijenci biljaka i pomaže transportu vode u biljaka. Uz kristaliničnu celulozu, lignin najviše pridonosi otpornosti lignoceluloze na razgradnju. Hidrolizom polimerne strukture lignina mogu se dobiti različiti spojevi: fenoli, ferulinska i vanilinska kiselina, ketoni i alkani, benzen, toluen, ksilen i drugi, od kojih mnogi mogu zamijeniti iste spojeve dobivene petrokemijskim metodama (Mardetko i sur., 2018; Chen, 2015; Shafiei i sur., 2015).



Slika 1. Prikaz građe lignoceluloze (Kuthi i sur., 2016)

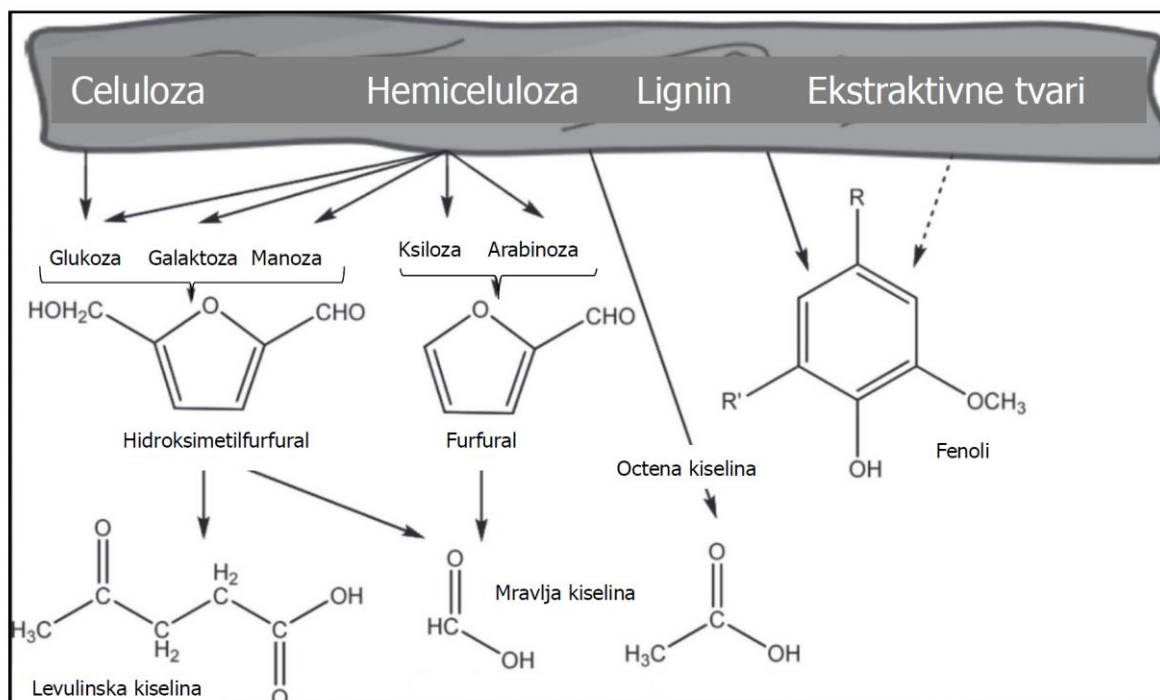
Struktura lignoceluloze je po svojoj prirodi vrlo kompleksna (slika 1). Lanci D-glukoze tvore celulozna vlakna. Celulozna vlakna čine mikrofibrile te su oni obavijeni hemicelulozom. Lance hemiceluloze dodatno učvršćuje lignin kovalentnim vezama (Zoghلامي i Paës, 2019). Lignoceluloza gradi staničnu stijenu bilja i pruža joj mehaničku čvrstoću i zaštitu od vanjskih utjecaja i patogena. Njezina čvrstoća čini ju otpornom na razgradnju kemijskim i mehaničkim metodama. Na otpornost lignoceluloze najviše utječe njen kemijski sastav te međusobna povezanost triju strukturnih polimera. Da bi se smanjila otpornost lignoceluloze na razgradnju i oslobodili fermentabilni šećeri iz strukture lignoceluloze, potrebno je napraviti predobradu lignocelulozne sirovine (Deshavath i sur., 2017; Shafiei i sur., 2015).

2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Predobrada lignoceluloze je proces smanjenja otpornosti i povećanja poroznosti lignoceluloze s ciljem lakšeg oslobađanja fermentabilnih ugljikohidrata. Prilikom predobrade smanjuje se kristaliničnost celuloze, djelomično se uklanja lignin od hemiceluloze koja se razgrađuje. Slobodni lanci celuloze mogu se nadalje hidrolizirati pomoću enzima kako bi se iz njih oslobodila glukoza (Harmsen i sur., 2013).

Predobrada lignocelulozних sirovina uključuje fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode. Idealna metoda predobrade bi trebala povećati oslobađanje šećera prilikom hidrolize, smanjiti degradaciju i gubitak šećera i stvaranje inhibicijskih spojeva te bi trebala biti isplativa. Fizikalna predobrada uključuje mehaničko usitnjavanje, ekstruziju, zračenje i pirolizu (Sun i sur., 2016; Kumar i sur., 2009). Fizikalnom predobradom lignoceluloze povećava se površina dostupna za kemijsku i/ili enzimsku hidrolizu te se smanjuje kristaliničnost celuloze. Najpoznatija fizikalno-kemijska metoda je eksplozija parom. Kod eksplozije parom, biomasa se tretira parom pri 160-200 °C pri povišenim tlakovima. Nakon određenog vremena dolazi do dekompresije i lignoceluloza bubri. Sličan proces je AFEX (engl. *Ammonia Fiber Explosion*), odnosno eksplozija vlakana gdje se umjesto pare koristi amonijak. Biološke metode predobrade uključuju korištenje organizama i/ili enzima kako bi se promijenila struktura lignoceluloze. Najčešće su to gljive (bijelog, mekog i smeđeg truljenja) i različite plijesni koje proizvode lignocelulolitičke enzime (Shafiei i sur., 2015).

Kemijskim metodama predobrade prethodi usitnjavanje sirovine kako bi se povećala površina dostupna kemikalijama. Nakon usitnjavanja, lignoceluloza se može tretirati s jednim ili više sredstava: lužinom, kiselinom, organskim otapalom, ionskim tekućinama, ozonom ili vrućom vodom. Za predobradu kiselinom koriste se klorovodična i sumporna kiselina. Za ovu metodu predobrade mogu se koristiti koncentrirane ili razrijeđene kiseline. Predobrada kiselinom uzrokuje pucanje kemijskih veza polimerne strukture lignoceluloze, a time i povećanje prinosa procesa hidrolize i fermentacije. Najveći utjecaj tijekom kiselinske predobrade imaju vrijeme zadržavanja i temperatura pri kojoj se proces odvija (Joanna i sur., 2018; Shafiei i sur., 2015).



Slika 2. Shematski prikaz porijekla inhibirajućih spojeva (Jönsson i sur., 2013)

Veliki nedostatak uporabe kiselina za predobradu lignoceluloznih sirovina je nastajanje spojeva koji djeluju inhibicijski na rast mikroorganizama. Oni nastaju degradacijom komponenata lignoceluloze pri povišenoj temperaturi i tlaku. Ksilozu oslobođenu prilikom razgradnje hemiceluloze može degradirati u furfural koji se dalje može prevesti u octenu kiselinu (slika 2). Octena kiselina se isto tako oslobađa prilikom razgradnje acetilirane hemiceluloze. Glukoza, manozu i galaktozu mogu se razgraditi u hidroksimetilfurfural koji nadalje prelazi u octenu ili levulinsku kiselinu. Aromatska struktura lignina nakon razgradnje otpušta fenolne spojeve u hidrolizat. Također, prema Chandel i sur. (2011) inhibicijsko djelovanje mogu imati i smole, tanini i terpeni iz lignocelulozne sirovine te ioni teških metala. Količina i sastav inhibitora ovisi o vrsti predobrade i vrsti sirovine. Poznato je da organske kiseline difundiraju u stanice kvasca te disociraju, a potom pada pH-vrijednost citoplazme, i time dolazi do inhibicije njihovog rasta. Ovi spojevi mogu se adsorpcijom ukloniti iz hidrolizata, ali je postupak često neisplativ, stoga je isplativije koristiti mikroorganizme koji bolje toleriraju inhibitore (Kręgiel i sur., 2017).

2.3. ŠEĆERNA REPA

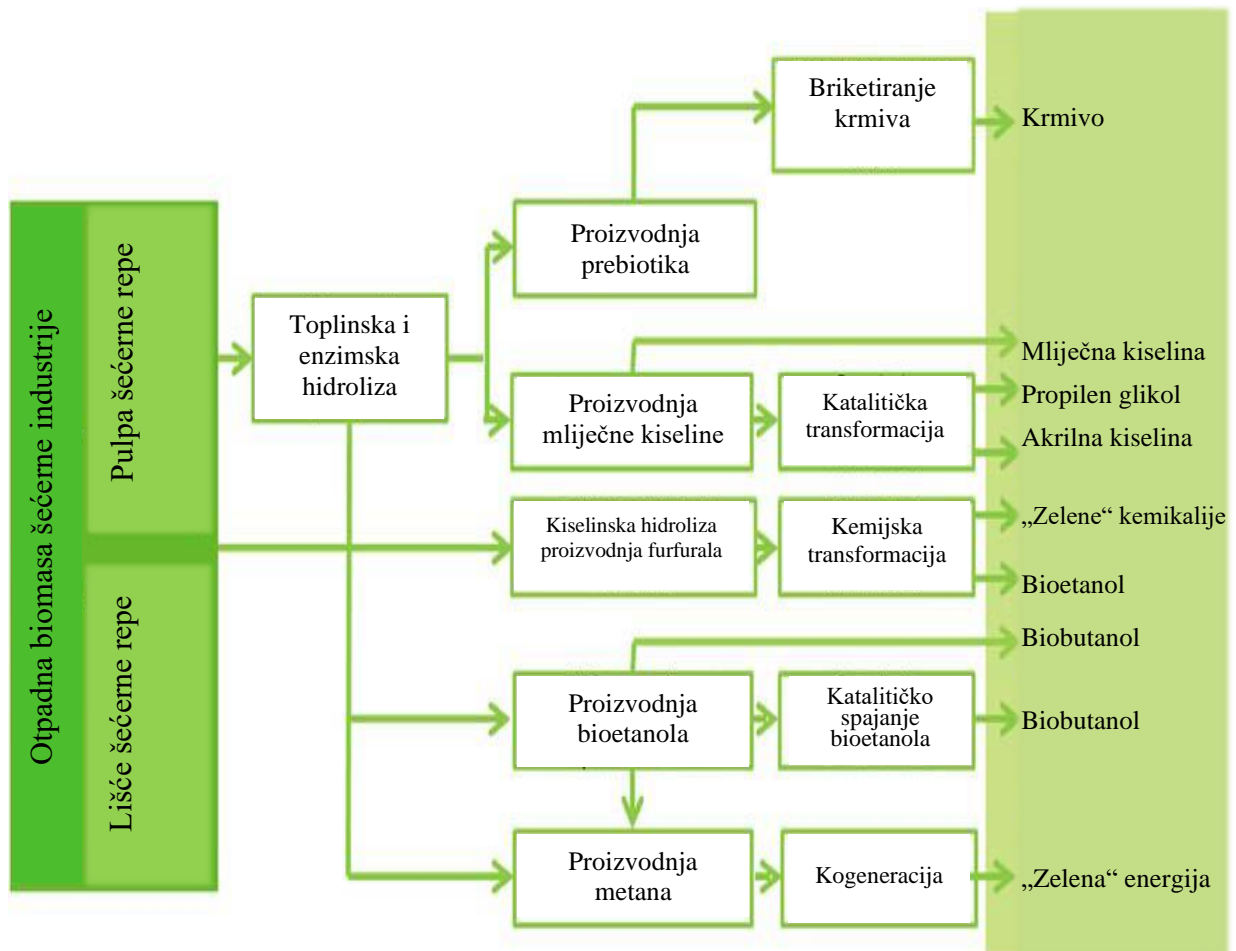
Šećerna repa (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura današnjice. Uz šećernu trsku, najvažnija je sirovina za proizvodnju saharoze. Za razliku od trske, za rast ne traži tropsku, već umjerenu klimu, što pogoduje uzgoju na širem geografskom području. Uzgaja se na 5 kontinenta, a 2016. godine svjetska proizvodnja šećerne repe iznosila je 280 milijuna tona (Vojvodić Cebin, 2019). Najveći proizvođači šećerne repe su Europska Unija (ponajviše Francuska), SAD i Rusija. Biljka ima nadzemne listove te mesnati korijen u zemlji koji skladišti saharozu (slika 3). Šećerna repa sadrži 75 % vode, 18 % šećera, 5 % celuloze i 2-3 % (w w⁻¹) ostalih tvari (Joanna i sur., 2018; Liović, 1998).



Slika 3. Šećerna repa (Anonymus, 2019)

Prerada šećerne repe za proizvodnju šećera započinje skupljanjem repe te pranjem i uklanjanjem lisnatog dijela biljke. Korijen se zatim usitnjava rezanjem na rezance kako bi se povećala površina za difuziju. Rezanci ulaze u ekstraktor te započinje protustrujna ekstrakcija vodom. Vruća voda ubrzava proces difuzije šećera iz korijena. Voda obogaćena šećerom se izdvaja i sadrži između 10 i 15 % (w w⁻¹) šećera. Nastali difuzni sok se pročišćava vapnom, a zatim koncentrira na 60 % (w w⁻¹) šećera. Nakon toga slijedi vakuum-kristalizacija te se dobiva šećer (U.S EPA, 1997). Glavni nusproizvod proizvodnje šećera su izluženi repini rezanci. Od 1000 kg svježe repe dobije se 140 kg šećera i 626 kg repinih rezanaca koji se prešaju i suše ili se direktno isporučuju farmama. Unatoč tome što je većina šećera iz repinih rezanaca ekstrahirana, oni još uvijek sadrže saharozu te mogu poslužiti kao lignocelulozna sirovina. S obzirom da se šećerna repa vadi iz zemlje nakon jedne godine rasta, vlakna unutar lignocelulozne nisu potpuno lignificirana. Manji udio lignina u strukturi olakšava preobradu rezanaca prije fermentacije. Korištenjem sekundarnih sirovina poput izluženih repinih rezanaca za proizvodnju biokemikalija i biogoriva (slika 4), ne konkurira se tržištu hrane za razliku od

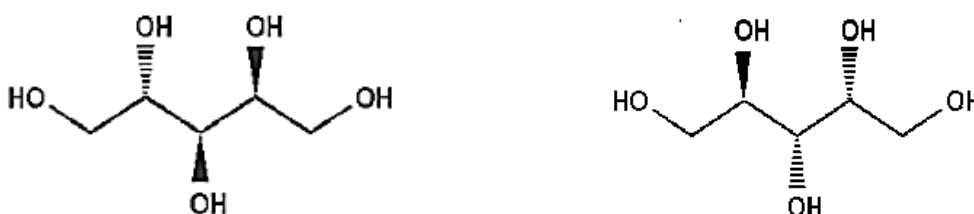
primjerice kukuruza koji se koristi za proizvodnju bioetanola (Jeleč, 2020; Vojvodić Cebin, 2019; U.S EPA, 1997).



Slika 4. Iskorištavanje otpadne šećerne repe s ciljem dobivanja vrijednih proizvoda (Joanna i sur., 2018)

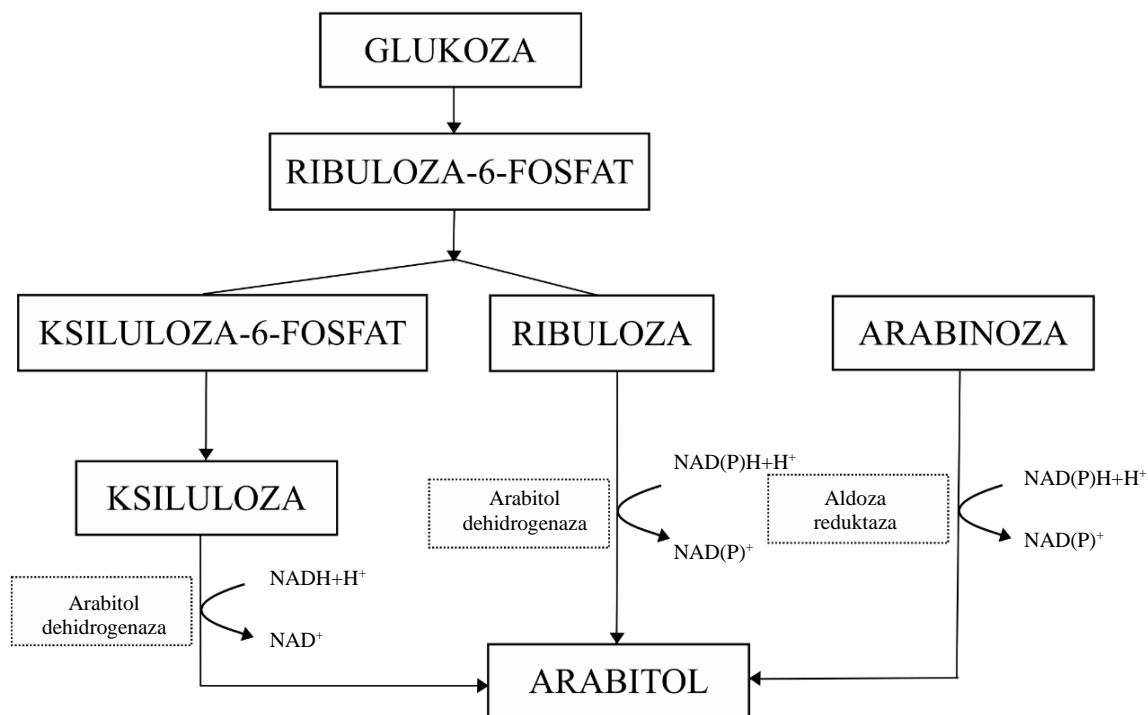
2.4. Arabitol

Arabitol je šećerni alkohol građen od pet ugljikovih atoma molekularne mase 152 Da. Bezbojan je, kristaličan i topiv u vodi. Postoje dva izomera arabitola: D- i L-izomer (slika 5) (Kumdam i sur., 2013). Slatkog je okusa pa se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zbog svoje niske kaloričnosti ($0,2 \text{ kcal g}^{-1}$) koristi se kao alternativa saharozi. Uz ksilitol, zaslađivač je žvakaćih guma jer ga bakterije usne šupljine teško metaboliziraju pa ne pridonosi stvaranju karijesa. D-arabitol se još koristi u proizvodnji: ksilitola, etilen glikola, propilena, arabinonične i ksilonične kiseline, imunosupresivnih glikolipida i herbicida (Kordowska-Wiater i sur., 2017; Kumdam i sur., 2014).



Slika 5. Kemijska struktura L-arabitola (lijevo) i D-arabitola (desno) (Carpentier i sur., 2011)

Arabitol se može proizvoditi kemijskim ili mikrobiološkim postupcima. Kemijska sinteza uključuje redukciju laktone arabinonične i ksilonične kiseline pri $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz skupi katalizator ili redukciju D-arabinoze uz Na(Hg) kao katalizator (Kumdam i sur., 2013). Mikrobiološka proizvodnja podrazumijeva redukciju arabinoze pomoću enzima aldoza reduktaza u arabitol. Osim iz arabinoze, moguća je i sinteza arabitola iz glukoze (slika 6). Ove biokemijske reakcije redukcija odvijaju se uz pomoć kofaktora NADH i NADPH stoga ovise o njihovoj regeneraciji. Prilikom uzgoja na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, glavni supstrati za proizvodnju arabitola su hemiceluloze koje sadrže heksoze (glukoza, manoza) te pentoze (arabinoza, ksiloza). Mikrobna biotransformacija ima prednost u odnosu na kemijsku sintezu jer je sam proces jeftiniji i povoljniji za okoliš zato što nema potrebe za korištenjem kemijskih katalizatora (Kordowska-Wiater, 2015).



Slika 6. Shematski prikaz metabolizma arabinoze i glukoze u proizvodnji arabitola (Kumdam i sur., 2014)

Arabitol proizvode kvasci, bakterije i neke plijesni. Kvasci iz roda *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* i *Zygosaccharomyces* proizvode polirole poput arabitola, ksilitola, eritrita, glicerola i manitola kada su izloženi osmotskom stresu. Navedeni šećerni alkoholi pomažu održavanju osmotskog pritiska na staničnoj membrani. Također, primijećeno je da kvasac *C. albicans* proizvodi arabitol prilikom oksidacijskog i temperaturnog stresa (Kumdam i sur., 2014; Koganti i sur., 2010).

2.5. NE-*Saccharomyces* KVASCI

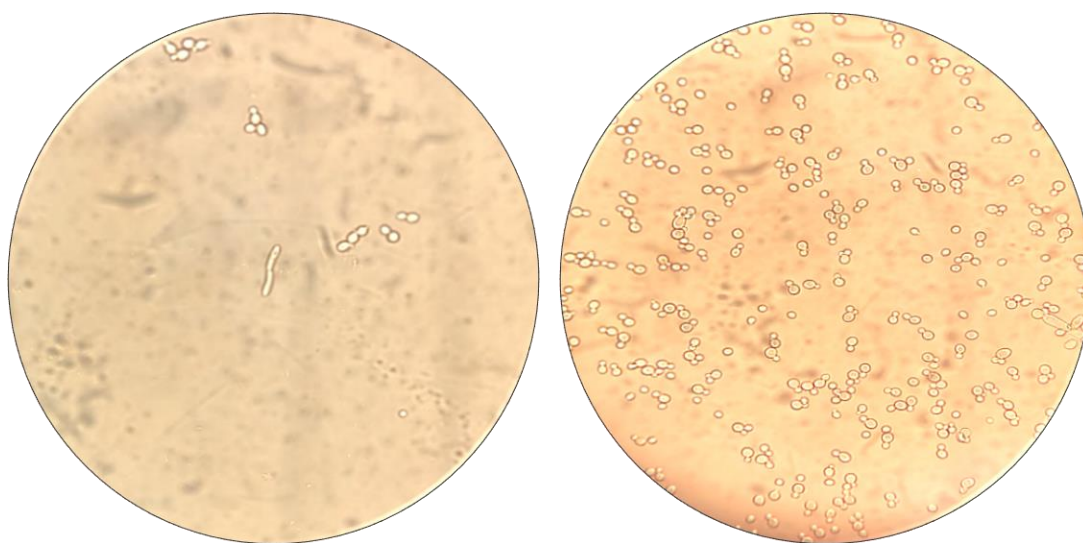
Najpoznatiji kvasac u biotehnološkoj proizvodnji je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Modelni je organizam jer je eukariot, brzo se razmnožava, lako se genetski modificira te ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. Već se stoljećima koristi u proizvodnji piva, vina, kruha, etanola i sl. (Steward, 2014). Međutim, noviji biotehnološki procesi zahtijevaju rast mikroorganizama u različitim uvjetima, na različitim izvorima ugljika i energije te rast u prisutnosti inhibitora. Jedan od načina unaprjeđenja procesa je istraživanje novih vrsta kvasaca koji se mogu bolje prilagoditi na tražene uvjete te posljedično, pronaći industrijsku primjenu. Do nedavno su se ne-*Saccharomyces* kvasci smatrali nepoželjnima jer uzrokuju kvarenje hrane i pića, ali je pritisak novih tehnologija potaknuo otkrivanje njihovih prednosti (Kręgiel i sur., 2017; Padilla i sur., 2016).

Ne-*Saccharomyces* kvasci čine većinu vrsta kvasca te je poznato više od 1500 vrsta. Neki od njih su zanimljivi jer posjeduju neobična svojstva poput korištenja metanola, *n*-alkana, celuloze, rafinoze, arabinoze, ksiloze, šećernih alkohola i škroba kao izvora ugljika; izlučivanja velikih količina proteina i druga (Kręgiel i sur., 2017; Sibirny i Scheffers, 2002). Široka primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazuje njihovu bioraznolikost. Kvasci roda *Kluyveromyces* proizvode bioetanol rastom na otpadnim vodama mljekarske industrije, kvasci roda *Brettanomyces* počinju se koristiti u industriji pića s manjim udjelom alkohola te kvasci rodova *Meyerozyma*, *Spathaspora* i *Wickerhamomyces* mogu proizvesti ksilitol dok kvasac *Yarrowia lipolytica* može proizvesti antioksidans astaksantin (Wendland, 2019). Jedna od najvećih prednosti ne-*Saccharomyces* kvasaca u odnosu na *Saccharomyces* kvasce je njihova mogućnost fermentacije i pentoza, a ne samo heksoza. Pronađeno je više od 22 vrste koje mogu proizvesti etanol rastom na ksilozi, a od njih je 6 proizvelo značajne količine etanola: *Brettanomyces naardenensis*, *Candida shehatae*, *C. tenuis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia segobiensis* i *Pichia stipitis*. Ne-*Saccharomyces* kvasci otporniji su od *Saccharomyces* kvasaca na okolišne izvore stresa poput: povećanog osmotskog pritiska, visokih koncentracija etanola, povišene temperature i prisutnost toksičnih spojeva. Još jedna dobra kvaliteta je i njihov GRAS (engl. **Generally Recognized As Safe**) status koji ih čini poželjnima za rukovanje (Kręgiel i sur., 2017).

2.6. KVASCI RODA *Spathaspora*

Rodu *Spathaspora* pripadaju razni kvasci poput *Spathaspora arborarie*, *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora gorwiae*, *Spathaspora hagerdaliae*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora suhii* te *Spathaspora xylofermentans*, od kojih mnogi proizvode bioetanol (Selim i sur., 2020). Poznato je da je kvasac *Spathaspora passalidarum* izoliran iz utrobe kornjaša *Odontotaenius disjunctus* nastanjenog u SAD-u. Autori Nguyen i sur. (2006) smatraju da ti kvasci žive na kori trulog drveta, a da ne čine mikrobiotu utrobe kukca zato što su u većem broju istraživanja kvasci pronađeni na površini drva.

Kvasac *Spathaspora passalidarum* (slika 7) raste na glukozu, galaktozi, maltozi, trehalozu, celobiozi, ksilozi, arabinozi, etanolu, glicerolu i manitolu (Nguyen i sur., 2006). Trenutačno se smatra da je kvasac *Spathaspora passalidarum* među kvascima koji najviše troše ksilozu za rast biomase. U anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima brzo troši ksilozu te proizvodi 0,48 g g⁻¹ bioetanola (Selim i sur., 2020). Prema radu Su i sur. (2015), primijećeno je simultano trošenje ksiloze, celobioze i glukoze prilikom proizvodnje bioetanola što ukazuje da glukoza ne inhibira transport drugih izvora ugljika.



Slika 7. Mikroskopska slika kvasaca *Spathaspora arborarie* (lijevo) i *Spathaspora passalidarum* (desno) (vlastita fotografija)

Kvasac *Spathaspora arborarie* (slika 7) izoliran je s površine trulog drva u tropskim šumama Brazila. Ovaj kvasac, poput kvasca *Spathaspora passalidarum*, stvara askospore. Također, može fermentirati ksilozu do etanola. *Spathaspora arborarie* se razlikuje od *S. passalidarum* jer može asimilirati L-sorbozu i rasti na 50 % (w w⁻¹) glukoze, što nije zapaženo kod *S. passalidarum*. Nije primijećen rast kvasca *Spathaspora arborarie* na laktozi, rafinozi, topivom škrobu, mliječnoj i limunskoj kiselini, metanolu, acetonu ni etil-acetatu. S obzirom da oba kvasca mogu trošiti ksilozu, koja čini i do 20 % mase lignoceluloze, oni mogu imati povoljan utjecaj na povećanje iskorištenja procesa fermentacije hidrolizata lignocelulozne biomase (Pacheco i sur., 2021; Cadete i sur., 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Za pripremu hranjivih podloga za uzgoj u bioreaktoru korišten je tekući hidrolizat dobiven kiselinom hidrolizom izluženih reznaca šećerne repe. Rezanci su dobiveni iz pogona za proizvodnju šećera Sladorana Županja, a njihov sastav određen je u radu Perković (2020). Sastav izvorne sirovine prikazan je u tablici 1, a sastav tekućeg hidrolizata naveden je u tablici 2.

Tablica 1. Sastav izluženih repinih reznaca

Tvar	glukani	ksilani	arabinani	mravlja kiselina	octena kiselina	lignin topljiv u kiselini	lignin netopljiv u kiselini i pepeo
Maseni udio [%]	2,09	11,25	11,09	5,32	0,87	23,15	38,04

Tablica 2. Sastav tekućeg hidrolizata dobivenog kiselinom predobradom

Tvar	Koncentracija [g L ⁻¹]
glukoza	1,6164
arabinoza	14,0468
ksiloza	2,6083
mravlja kiselina	0,2139
octena kiselina	2,0951

3.1.2. Radni mikroorganizmi korišteni u istraživanju

Radni mikroorganizmi u ovom radu bili su kvasci *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva. Radne kulture oba kvasca čuvane su na agar YPD hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama na 4°C.

3.1.3. Kemikalije

U tablici 3 prikazane su korištene kemikalije, njihov stupanj čistoće i proizvođač.

Tablica 3. Kemikalije korištene u istraživanju

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
agar	tehnički	Liofilchem, Italija
arabinoza	≥ 99 %	Acros Organics, SAD
činkov sulfat heptahidrat	99 %	Merck KGaA, Njemačka
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kvašičev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KGaA, Njemačka
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
sumporna kiselina	96 %	Merck KGaA, Njemačka

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca *Spathaspora* sp.

3.1.4.1. *Kemijski definirane hranjive podloge*

Za uzgoj inokuluma kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 korištena je YPD podloga sa 20 g L⁻¹ glukoze, 20 g L⁻¹ peptona i 10 g L⁻¹ kvašičevog ekstrakta.

Uzgoji kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 pri različitim uvjetima aeracije provedeni su u tikvicama s odbijačima na hranjivoj podlozi s arabinozom čiji je sastav opisan u tablici 4.

Tablica 4. Kemijski sastav hranjive podloge za uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463

Tvar	Koncentracija [g L⁻¹]
arabinoza	10
pepton	20
kvašćev ekstrakt	10

3.1.4.2. *Kompleksna hranjiva podloga za uzgoj kvasaca Spathaspora sp. u bioreaktorskim sustavima*

Za uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 u bioreaktorima korištena je tekuća faza dobivena kiselinskom predobradom izluženih rezanaca repe. Priprema podloge opisana je u Poglavlju 3.2.3., a sastav podloge za uzgoj u bioreaktorskim sustavima nalazi se u tablici 2.

3.1.5. Aparatura i pribor

3.1.5.1. *Bioreaktor s miješalom*

Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) (slika 8) korišten je za uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 na hranjivoj podlozi dobivenoj kiselinskom hidrolizom izluženih repinih rezanaca. Izrađen je od nehrđajućeg čelika. Ukupni volumen reaktora iznosi 30 L. Bioreaktor ima miješalo s tri turbine, a svaka turbina ima 6 ravnih lopatica. Snaga elektromotora za pokretanje miješala iznosi 0,9 kW. Prilikom korištenja bioreaktora mogu se regulirati pH-vrijednost, brzina okretaja miješala, protok zraka, temperatura te parcijalni tlak kisika u podlozi pomoću polarografske kisikove elektrode. Zrak koji ulazi te zrak koji izlazi iz reaktora prolaze kroz membranski filter. Reaktor se sterilizira preko plašta, vodenom parom. Peristaltičke pumpe, koje su uklopljene u uređaj, koriste se za prepumpavanje različitih otopina i inokuluma u reaktor.



Slika 8. Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (vlastita fotografija)

3.1.5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, (Santa Clara, SAD) (slika 9) za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti u ovom istraživanju korišten je za analizu supernatanta uzoraka. Sadrži uzorkivač (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnicu, crpku (G7104A 1290 Flexible Pump), analitičku kolonu (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalni program za obradu izmjerenih podataka (OpenLAB CDS). Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL . Korištena mobilna faza bila je 0,0025 M otopina H_2SO_4 protoka 0,6 mL min^{-1} .



Slika 9. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) (vlastita fotografija)

3.1.5.3. *UV-Vis spektrofotometar*

Za mjerenje optičke gustoće hranjive podloge korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, SAD) koji radi pri valnim duljinama od 190 do 900 nm. Homogenizirani uzorci prebačeni su u staklene kivete tvrtke Hellma Optik GmbH (Njemačka) te je određena optička gustoća podloge pri valnoj duljini od 600 nm. Rezultati mjerenja spremaju se u „Cary WinUV software”.

3.1.5.4. *Ostala oprema*

Ostalu opremu korištenu tijekom istraživanja čine: analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka), pH-metar, mikrocentrifuga Witeg CF-10 (Njemačka), centrifuga Thermo Scientific SL 8R (SAD), sušionik Instrumentaria ST-50 (Hrvatska), termostat Instrumentaria ST-50 (Hrvatska), autoklav tvrtke Sutjeska (Jugoslavija), hladnjak i zamrzivač Gorenje. Uzgoj u tikvicama proveden je na tresilici RM 71 (B. Braun Biotech International, Sartorius group). Vrtložna miješalica Vortex VM-10 (Witeg, Njemačka) korištena je za homogenizaciju uzoraka prije analize.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema inokuluma i podloga za uzgoj kvasaca *Spathaspora* sp.

3.2.1.1. *Priprema inokuluma za uzgoj kvasaca Spathaspora* sp.

Priprema inokuluma kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 započeta je precjepeljivanjem prethodno porasle kulture s čvrste YPD podloge s 20 g L⁻¹ agara u Petrijevim zdjelicama u dvije epruvete s 5 mL YPD podloge po epruveti. Kultura je uzgajana preko noći bez miješanja pri 28 °C. Svih 10 mL tako porasle prekonoćne kulture korišteno je kao inokulum za uzgoj u tikvicama (Poglavlje 3.2.2.).

Inokulum za uzgoj u reaktoru pripremljen je na isti način s tim da je uzgojeno 5 mL kulture u tri epruvete koje su zatim služile kao inokulum za tri tikvice s 200 mL YPD podloge. Uzgoj u tri Erlenmeyerove tikvice s odbijačima odvijao se na tresilici tijekom 24 h na 28 °C uz miješanje od 250 o min⁻¹. Za inokulaciju reaktora (Poglavlje 3.1.5.1.) korišteno je 500 mL kulture.

3.2.1.2. *Priprema hranjive podloge s arabinozom za ispitivanje kinetike rasta kvasaca Spathaspora* sp. *pri različitim brzinama okretaja tresilice*

Za uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 korištena je kemijski definirana podloga čiji je sastav opisan u tablici 4. Priprema se tako da se izračunata masa potrebnih tvari iz tablice 4 doda u Erlenmeyerove tikvice s odbijačima od 500 mL te se nadoda 200 mL demineralizirane vode. Podloga se sterilizira u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C.

3.2.1.3. *Priprema podloge za šaržni uzgoj kvasaca Spathaspora* sp. *u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom izluženih repinih rezanaca*

Dobivena tekuća faza nakon kiselinske hidrolize izluženih repinih rezanaca (0,5 %-tnom sumpornom kiselinom) korištena je kao hranjiva podloga za rast kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463. Za uzgoj u reaktoru korišteno je 4,6 L hidrolizata. Sterilizacija hranjive podloge provedena je *in situ* u bioreaktoru pri 121 °C tijekom 20 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja, u reaktoru je podešena pH-vrijednost podloge 6 pomoću 2 M otopine NaOH. Zatim je podloga inokulirana s 500 mL inokuluma čija je priprema opisana u Poglavlju 3.2.1.1.

3.2.2. Ispitivanje kinetike rasta kvasaca *Spathaspora* sp. i sinteze proizvoda u kemijski definiranoj podlozi pri različitim uvjetima aeracije

Kako bi se istražila kinetika rasta kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 i sinteza proizvoda na podlozi s arabinozom, kvasci su uzgajani u različitim uvjetima aeracije. Nacijepljeno je 10 mL inokuluma (Poglavlje 3.2.1.1.) u 200 mL podloge s arabinozom kao izvorom ugljika. Uzgoj se provodio 48 h na 28 °C, bez regulacije pH-vrijednosti, uz konstantno miješanje na tresilici. Provedena su 4 istraživanja pri različitim brojem okretaja na tresilici: 50, 100, 150 i 250 o min^{-1} . Tijekom uzgoja praćene su pH-vrijednost i koncentracija otopljenog kisika u podlozi. Sterilno uzorkovanje provodilo se u određenim vremenskim intervalima. Uzorcima je određena optička gustoća podloge, koncentracija biomase gravimetrijski i kemijski sastav podloge određen je UPLC analizom supernatanta uzorka.

3.2.3. Uzgoj kvasaca *Spathaspora* sp. u hidrolizatu izluženih repinih rezanaca u bioreaktoru

Uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS .11463 u hidrolizatu dobivenom kiselinskom hidrolizom izluženih repinih rezanaca proveden je u bioreaktoru Biostat Cplus (Poglavlje 3.1.5.1.). Sastav podloge naveden je u tablici 2. Sterilizirana hranjiva podloga volumena 4,6 L inokulirana je s 500 mL inokuluma. Inokulum je pripremljen prema metodi opisanoj u Poglavlju 3.2.1.1. Uzgoj je trajao 48 h pri 28 °C i pH-vrijednosti 6. Protok zraka iznosio je 2,5 L min^{-1} , a brzina miješala 550 o min^{-1} . Regulacija pH-vrijednosti podloge provedena je dodatkom 2 M H_2SO_4 odnosno 2 M NaOH. Sterilno uzorkovanje provodilo se u određenim vremenskim intervalima. Praćeni su optička gustoća podloge, suha tvar biomase gravimetrijski te kemijski sastav podloge UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja uzorka.

3.2.4. Analitičke metode

Prilikom uzgoja kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 praćena je optička gustoća podloge mjerenjem apsorbancije pri 600 nm valne duljine, koncentracija biomase gravimetrijski te kemijski sastav podloge UPLC analizom.

3.2.4.1. Određivanje optičke gustoće podloge

Uzorak uzet tijekom fermentacije je homogeniziran na vrtložnoj miješalici te je 2,5 mL uzorka prebaćeno u staklenu kivetu. Optička gustoća podloge određena je spektrofotometrom „Cary 100“ (Poglavlje 3.1.5.3.) pri 600 nm (OD_{600}).

3.2.4.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Za pripremu uzorka za UPLC analizu izdvojeno je 750 μ L supernatanta uzoraka i dodano je 750 μ L 10%-tne otopine $ZnSO_4$ (taloži proteine i nečistoće). Otopina je izmiješana i ostavljena 10 minuta. Potom je uzorak centrifugiran na 13 500 $o\ min^{-1}$ pri 5 min. Nakon centrifugiranja 1,5 mL supernatanta filtrira se kroz mikrobiološki filter (0,2 μ m, Sartorius) u staklenu vijalu. Uzorak pripremljen na taj način unosi se u uređaj za UPLC. Mobilna faza je 0,0025 M otopina H_2SO_4 protoka 0,6 $mL\ min^{-1}$. Volumen injektiranog uzorka iznosi 10 μ L. Temperatura kolone iznosi 60 °C. U programu OpenLab CDS analiziraju se dobiveni kromatogrami. Iz kromatograma su izračunate koncentracije tvari korištenjem baždarnih pravaca koji prikazuju ovisnosti koncentracije tvari o odzivu (tablica 6).

3.2.4.3. Određivanje specifične potrošnje kisika u bioreaktoru s miješalom

Specifična brzina potrošnje kisika tijekom uzgoja u bioreaktoru s miješalom određena je tzv. direktnom metodom. U 6. i 10. satu uzgoja prekinuta je dobava zraka u bioreaktor i brzina miješanja je smanjena na 50 $o\ min^{-1}$. U vremenskom periodu od 80 sekundi, svakih 5 sekundi zabilježena je vrijednost postotka zasićenja podloge kisikom. Aeracija je ponovno pokrenuta prije nego što je postignuta kritična vrijednost koncentracije otopljenog kisika u podlozi nakon koje specifična brzina respiracije (q_{O_2}) prestaje biti konstantna. Vrijednost specifične brzine potrošnje kisika opisana je jednadžbom :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_S - C_L) - q_{O_2} X \quad [1]$$

pri čemu je C_L koncentracija otopljenog kisika u podlozi [mol ili g O₂ m⁻³]; K_{La} volumni koeficijent prijenosa kisika [h⁻¹]; t vrijeme [h]; C_S koncentracija zasićenja podloge kisikom [mol ili g O₂ m⁻³]; q_{o2} specifična brzina potrošnje kisika [mol ili g O₂ h⁻¹ g⁻¹]; X koncentracija biomase [g L⁻¹]. Prijenos kisika iz zraka u podlogu opisuje prvi član jednadžbe, a drugi potrošnju kisika stanica kvasca koju tijekom rasta. S obzirom da je tijekom prekida aeracije potrošnja kisika u sustavu ($-qX$) konstantna, dobiva se linearna ovisnost koncentracije kisika u podlozi o vremenu. Nagib pravca predstavlja potrošnju kisika u sustavu, a specifična brzina potrošnje kisika se odredi na temelju koncentracije biomase (X) u satu u kojem je proveden prekid aeracije.

3.2.4.4. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase

U osušene i izvagane kivete otpipetirano je 5 mL uzorka izuzetog tijekom uzgoja. Biomasa je izdvojena centrifugiranjem pri 8000 o min⁻¹ tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, biomasa se nalazila u talogu, dok se supernatant odlio i pohranio za UPLC analizu. Kivete s biomasom sušene su na 50 °C do konstantne mase, ohladile u eksikatoru i izvagane na analitičkoj vagi. Koncentracija biomase u uzorku (X) izračunala se prema jednadžbi 2 koristeći izvagane mase taloga:

$$X_{g/L} = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad [2]$$

m_{ok} - masa kivete s osušenom biomasom,

m_{pk} - masa prazne kivete,

V_{uz} - volumen uzorka

3.2.5. Proračun pokazatelja uspješnosti uzgoja

Na temelju jednadžbi prikazanih u tablici 5 izračunati su pokazatelji uspješnosti uzgoja.

Tablica 5. Pokazatelji uspješnosti uzgoja

Potrošnja supstrata Y_S [g L⁻¹]	$Y_S = S_0 - S$
Prinos produkta Y_P [g L⁻¹]	$Y_P = P - P_0$
Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt $Y_{P/S}$ [g g⁻¹]	$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} = \frac{P-P_0}{S_0-S}$ [g g ⁻¹]
Specifična brzina rasta mikroorganizma (μ) [h⁻¹]	$\ln X = \ln X_0 + \mu * t$
Maksimalna brzina potrošnje supstrata (r_S) [h⁻¹]	$\ln S = \ln S_0 + r_S * t$
Specifična brzina respiracije (q_{O_2}) [g O₂ h⁻¹ g⁻¹]	$pO_2 = -q_{O_2} * X$

gdje je:

S_0 - početna koncentracija supstrata [g L⁻¹],

S - konačna koncentracija supstrata [g L⁻¹],

P_0 - početna koncentracija produkta [g L⁻¹],

P - konačna koncentracija produkta [g L⁻¹],

X_0 - početna koncentracija biomase [g L⁻¹],

X - konačna koncentracija biomase [g L⁻¹]

pO_2 - postotak zasićenja podloge kisikom [%].

4. REZULTATI I RASPRAVA

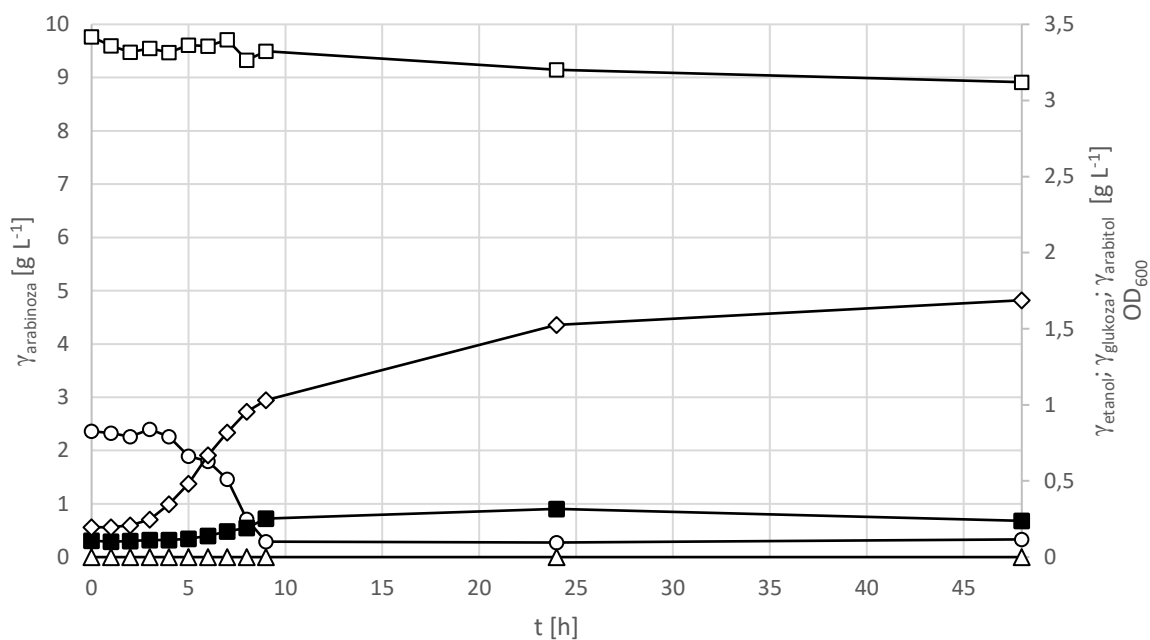
U ovom radu proveden je uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 na dvije različite podloge. Najprije su uzgajani na kemijski definiranoj podlozi s arabinozom (Poglavlje 3.2.2.). Arabinoza je odabrana kao izvor ugljika koji je prisutan unutar hemiceluloze nekih lignoceluloznih sirovina. Potom je proveden uzgoj u kiselinskom hidrolizatu izluženih repinih rezanaca (Poglavlje 3.2.3.). Određeni su glavni produkti metabolizma ovih kvasaca te je uspoređen sastav hranjivih podloga tijekom uzgoja (slike 10-21). Pokazatelji uspješnosti procesa izračunati su na temelju dobivenih rezultata.

4.1. AEROBNI UZGOJ KVASCA IZ RODA *Spathaspora* U KEMIJSKI DEFINIRANOJ PODLOZI PRI RAZLIČITIM UVJETIMA MIJEŠANJA

U ovom istraživanju, prvotno je određena kinetika rasta kvasaca te sinteza proizvoda *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 u kemijski definiranoj hranjivoj podlozi s arabinozom kao izvorom ugljika (Poglavlje 3.1.4.1.). Cilj navedenih eksperimenata bio je odrediti optimalne uvjete za proizvodnju arabitola pomoću navedenih kvasaca. Rezultati uzgoja prikazani su na slikama 10-19. Eksperimenti su provedeni prema protokolu iz poglavlja 3.2.2.

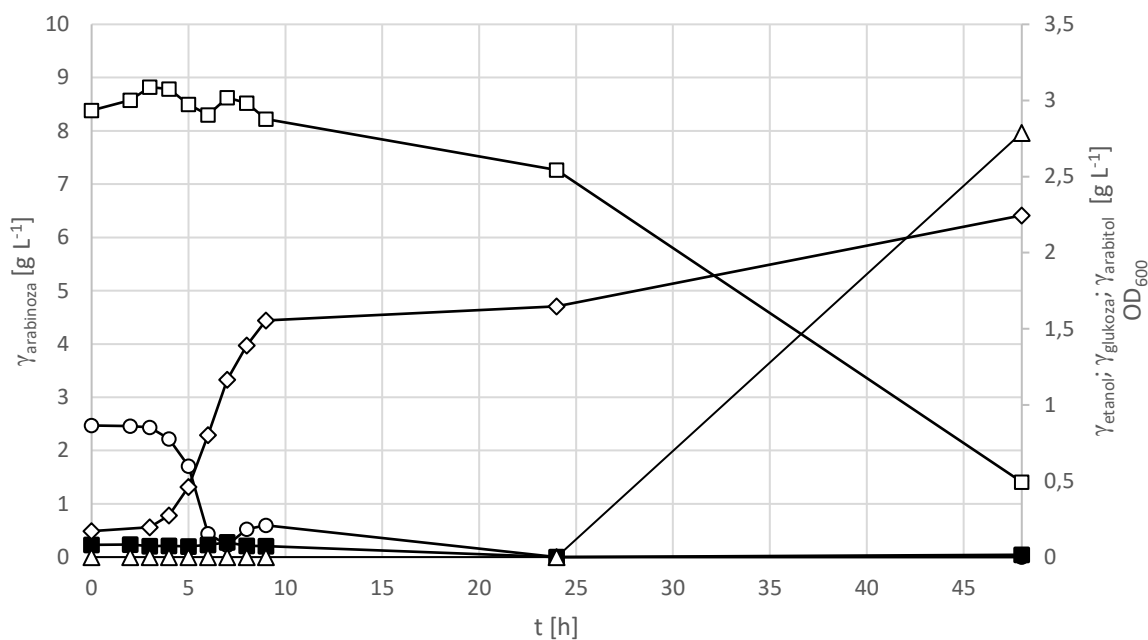
4.1.1. Uzgoj kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u kemijski definiranoj podlozi s arabinozom

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 na podlozi s arabinozom koja je pripravljena prema protokolu opisanom u Poglavlju 3.2.1.2. Na slikama 10-13 prikazani su rezultati uzgoja provedenih pri brzini 50, 100, 150 i 250 o min^{-1} .



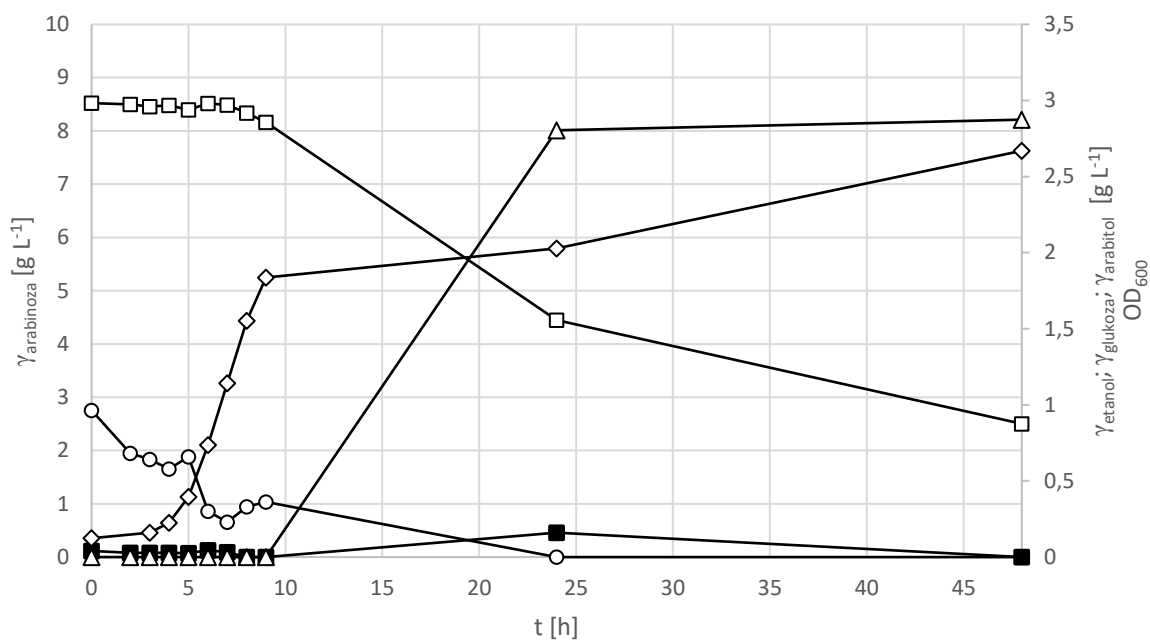
Slika 10. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, etanola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 pri brzini okretaja od 50 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —■— etanol, —◇— OD₆₀₀, —△— arabitol)

Kvasac *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 je prilikom uzgoja pri 50 o min⁻¹ (slika 10) ušao u eksponencijalnu fazu rasta nakon 3. sata, a stacionarna faza nastupila je u 10. satu. S obzirom da nije došlo do značajnog utroška arabinoze (8,7 % početne koncentracije), pretpostavlja se da je kvasac trošio glukozu iz inokuluma za svoj rast. Njezin potpuni utrošak poklapa se s ulaskom kvasca u stacionarnu fazu rasta. Krajnja vrijednost OD₆₀₀ bila je 1,6875. Miješanjem brzinom od 50 o min⁻¹ odvijao se rast limitiran kisikom pa je kao proizvod metabolizma nastao etanol u koncentraciji od 0,2391 g L⁻¹, a arabitol nije identificiran.



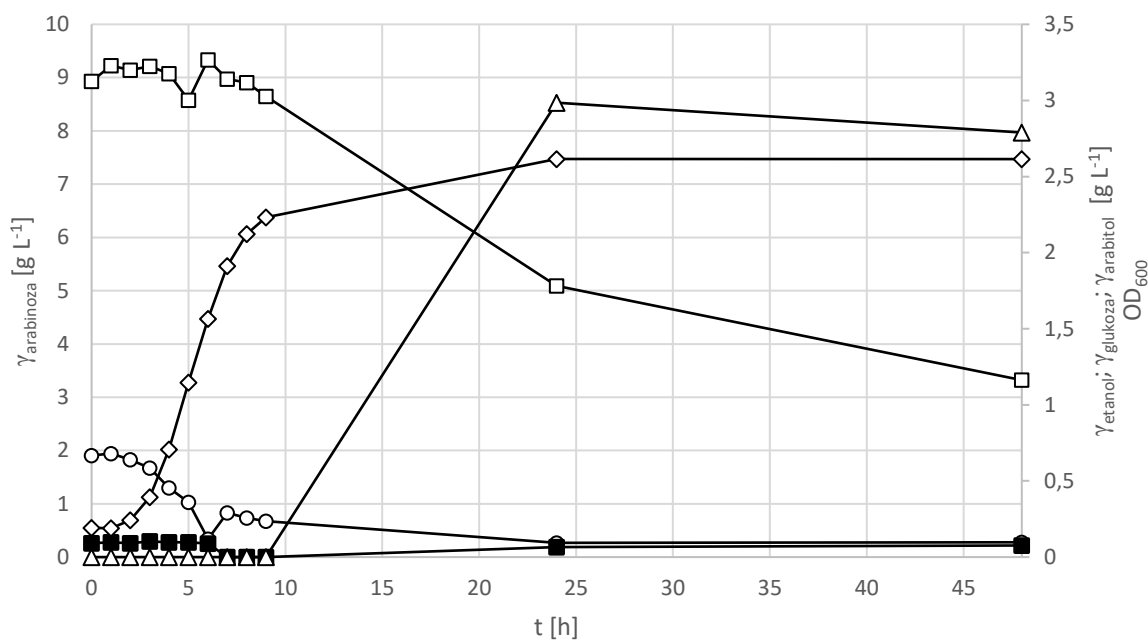
Slika 11. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, arabitola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 pri brzini okretaja od 100 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —△— arabitol, —◇— OD₆₀₀, —■— etanol)

Uzgojem kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 pri 100 o min⁻¹ (slika 11) došlo je do 50 % povećanja vrijednosti OD₆₀₀ u odnosu na vrijednost ostvarenu uzgojem pri 50 o min⁻¹ (2,5445 naspram 1,6875) jer je u podlozi otopljeno više kisika koji je potreban za rast biomase. Specifična brzina rasta bila je dva puta veća od one ostvarene uzgojem pri upola manjem broju okretaja (0,2730 naspram 0,1426 h⁻¹). Eksponencijalna faza započela je nakon 2. sata i trajala je do 9. sata uzgoja te se odvijala paralelno sa trošenjem glukoze iz inokuluma. Nakon što se glukoza potpuno utrošila, započelo je trošenje arabinoze. Za razliku od uzgoja pri 50 o min⁻¹ gdje se utrošilo 8,7% arabinoze, prilikom uzgoja pri 100 o min⁻¹ utrošilo se 83 % početne koncentracije arabinoze (1,4084 g L⁻¹ od početnih 8,3852 g L⁻¹). Sinteza arabitola započela je nakon 24. sata uzgoja kada se kvasac nalazio u stacionarnoj fazi rasta. Krajnja koncentracija arabitola iznosila je 2,7873 g L⁻¹.



Slika 12. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, arabitola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 pri brzini okretaja od 150 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —△— arabitol, —◇— OD₆₀₀, —■— etanol)

Uzgojem kvasca pri 150 o min⁻¹ (slika 12) ostvarena je najviša vrijednost OD₆₀₀ tijekom svih uzgoja od 2,8504 koja je 12 % viša od OD₆₀₀ koja je izmjerena tijekom uzgoja pri 100 o min⁻¹. Također, zabilježena je i najviša vrijednost specifične brzine rasta ovog kvasca, na podlozi s arabinozom, od 0,3392 h⁻¹. Eksponecijalna faza trajala je od 3. do 9. sata uzgoja. Trošenje arabinoze započinje u 8. satu uzgoja i odvija se djelomično paralelno s trošenjem glukoze. Tijekom uzgoja utrošilo se 70 % početne koncentracije arabinoze (2,5023 od 8,5212 g L⁻¹). Proizvodnja arabitola započela je nakon 9. sata te se njegova koncentracija nije značajnije mijenjala nakon 24. sata uzgoja (kada je iznosila 97 % konačne). Na kraju uzgoja iznosila je 2,874 g L⁻¹ što je 3 % više u odnosu na koncentraciju arabitola dobivenog uzgojem pri 100 o min⁻¹.

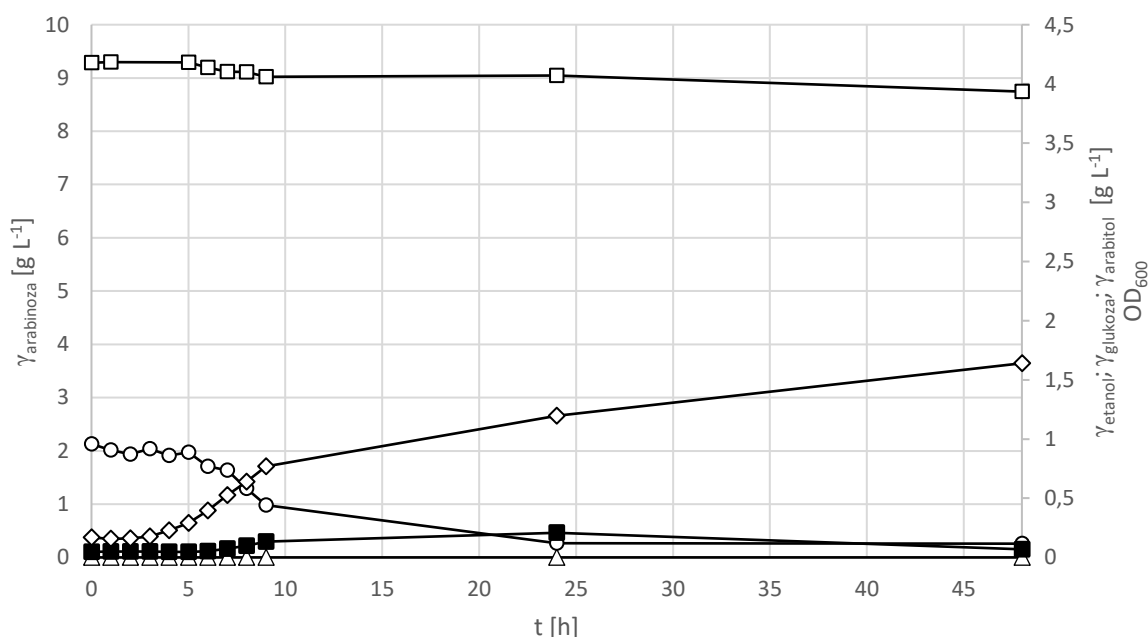


Slika 13. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, arabitola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 pri brzini okretaja od 250 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —△— arabitol, —◇— OD₆₀₀, —■— etanol)

Uzgojem pri najvišem broju okretaja od 250 o min⁻¹ (slika 13) postignuta je 8 % niža vrijednost OD₆₀₀ u odnosu na vrijednost postignutu uzgojem pri 150 o min⁻¹ i 2,7 % viša vrijednost od one dobivene uzgojem pri 100 o min⁻¹ (2,6150 naspram 2,8504 i 2,5445). Specifična brzina rasta bila je 8,3 % niža u odnosu na brzinu postignutu uzgojem pri 150 o min⁻¹ (0,3112 naspram 0,3392 h⁻¹). Sukladno tome, pretpostavlja se da povećanjem broja okretaja tresilice iznad 100 o min⁻¹ ne dolazi do značajnog povećanja vrijednosti OD₆₀₀ te rasta biomase kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155. Također, uzgojem pri 250 o min⁻¹ proizvedeno je 2,7901 g L⁻¹ arabitola, što je 3 % niža koncentracija u odnosu na onu ostvarenu uzgojem pri 150 o min⁻¹ te se praktično ne razlikuje od koncentracije dobivene uzgojem pri 100 o min⁻¹ (2,8738 i 2,7873 g L⁻¹). Pretpostavlja se da povećanjem broja okretaja tresilice iznad 100 o min⁻¹ ne dolazi do značajnog povećanja proizvodnje arabitola (slika 19).

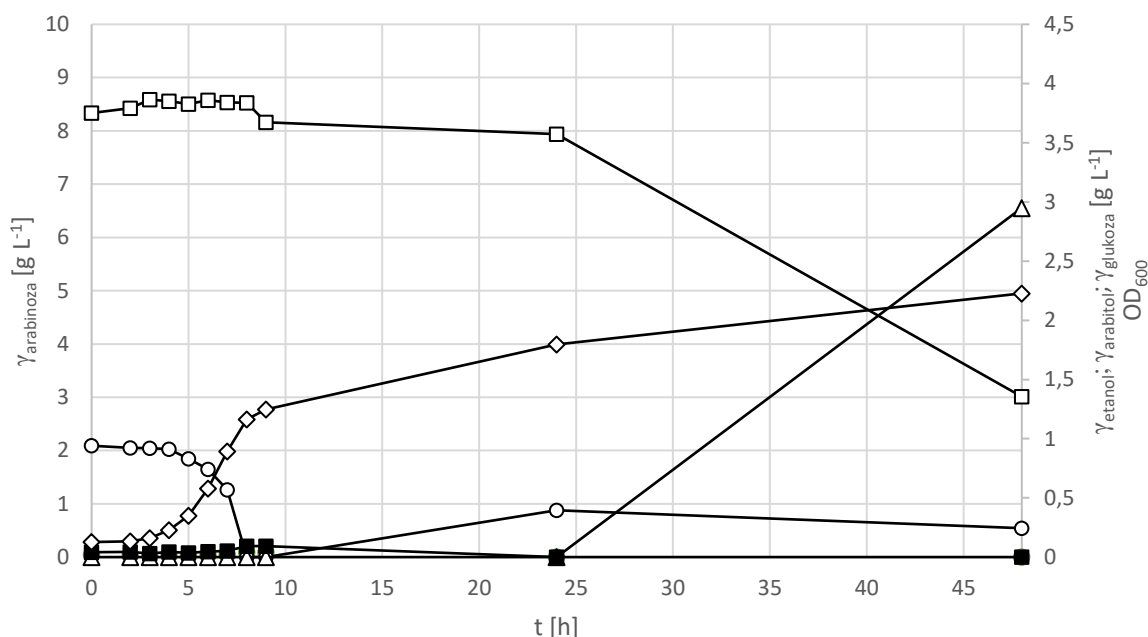
4.1.2. Uzgoj kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 u podlozi s arabinozom

Uzgoj kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 proveden je na podlozi s arabinozom pri četiri različite brzine okretaja tresilice: 50, 100, 150 i 250 o min⁻¹, tj. četiri različita intenziteta aeracije. Rezultati uzgoja prikazani su na slikama 14-17.



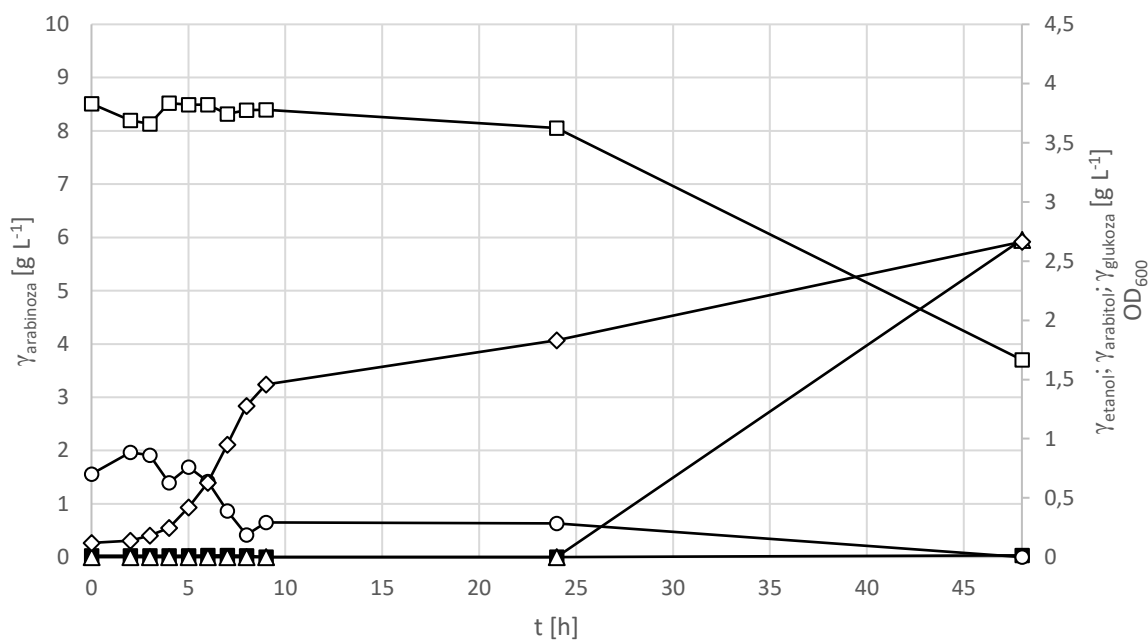
Slika 14. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, etanola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 pri brzini okretaja od 50 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —■— etanol, —◇— OD₆₀₀, —△— arabitol)

Pri najnižoj brzini od 50 o min⁻¹ (slika 14), biomasa kvasca rasla je na glukozi koja potječe iz inokuluma te stoga nije došlo do značajnog utroška arabinoze (5,8 %, odnosno 8,7439 od početnih 9,2853 g L⁻¹). Eksponencijalna faza rasta započela je nakon 4. sata uzgoja, a specifična brzina rasta iznosila je 0,1111 h⁻¹. Vrijednost OD₆₀₀ postignuta u 48. satu uzgoja iznosi 1,6400, što je 2,8 % manje od rezultata postignutog pri jednakoj aeraciji prilikom uzgoja *S. passalidarum* CBS 10155 pri istom broju okretaja. Također, osim slične vrijednosti optičke gustoće podloge, uzgojima pri 50 o min⁻¹ zajednička je i mala koncentracija proizvedenog etanola (0,0697 g L⁻¹) te odsutnost proizvodnje arabitola.



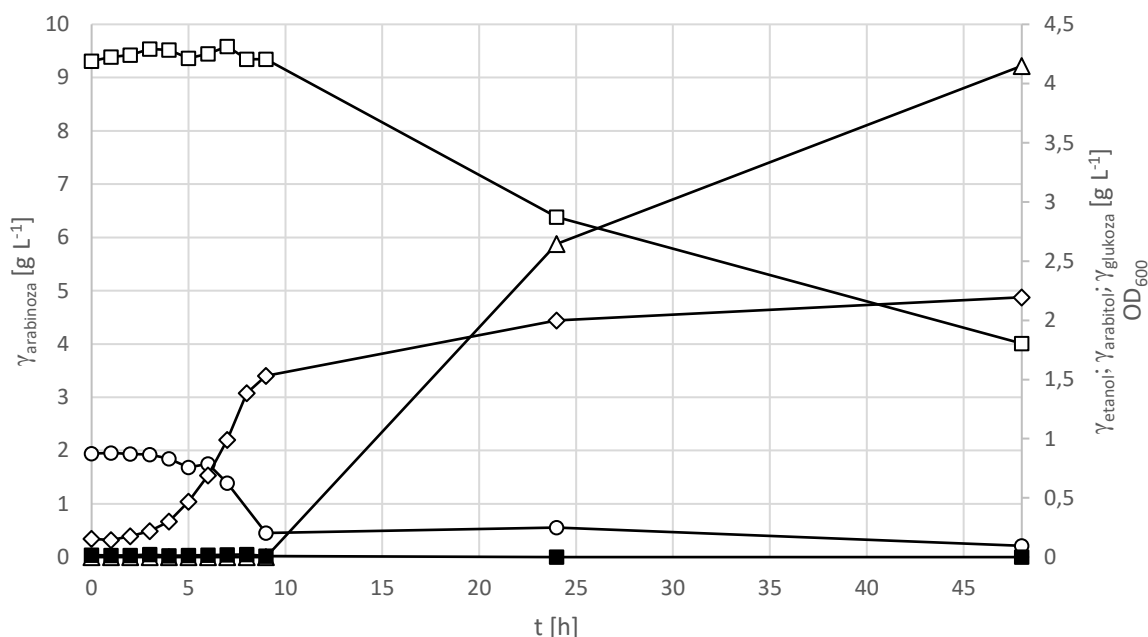
Slika 15. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, arabitola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 pri brzini okretaja od 100 o min⁻¹ (—□— arabinoza, —○— glukoza, —△— arabitol, —◇— OD₆₀₀, —■— etanol)

Uzgojem kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 pri 100 o min⁻¹ (slika 15) ostvarena je vrijednost OD₆₀₀ od 2,2274, što je 87,5 % vrijednosti OD₆₀₀ ostvarene uzgojem *S. passalidarum* CBS 10155 pri istom broju okretaja (2,5445), a 35,8 % viša od vrijednosti dobivene uzgojem *S. arborarie* CBS 11463 pri 50 o min⁻¹. Eksponencijalna faza rasta započela je nakon 3. sata, a trajala je do 8. sata uzgoja. Specifična brzina rasta iznosila je 0,2241 h⁻¹, što je dva puta više od brzine postignute rastom pri upola manjoj brzini okretaja (50 o min⁻¹). Arabinoza se počela trošiti nakon ulaska kvasca u stacionarnu fazu rasta te je na kraju uzgoja utrošeno 83,2 % početne koncentracije arabinoze (preostalo je 1,4084 od 8,3851 g L⁻¹). Proizvodnja arabitola započela je nakon 24. sata uzgoja, odnosno nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta. Koncentracija arabitola u posljednjem satu uzgoja iznosila je 2,9493 g L⁻¹ što je 5,8 % više od koncentracije arabitola dobivene uzgojem kvasca *S. passalidarum* CBS 10155 pri istom broju okretaja (2,7873 g L⁻¹).



Slika 16. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, arabitola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 pri brzini okretaja od 150 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —△— arabitol, —◇— OD₆₀₀; —■— etanol)

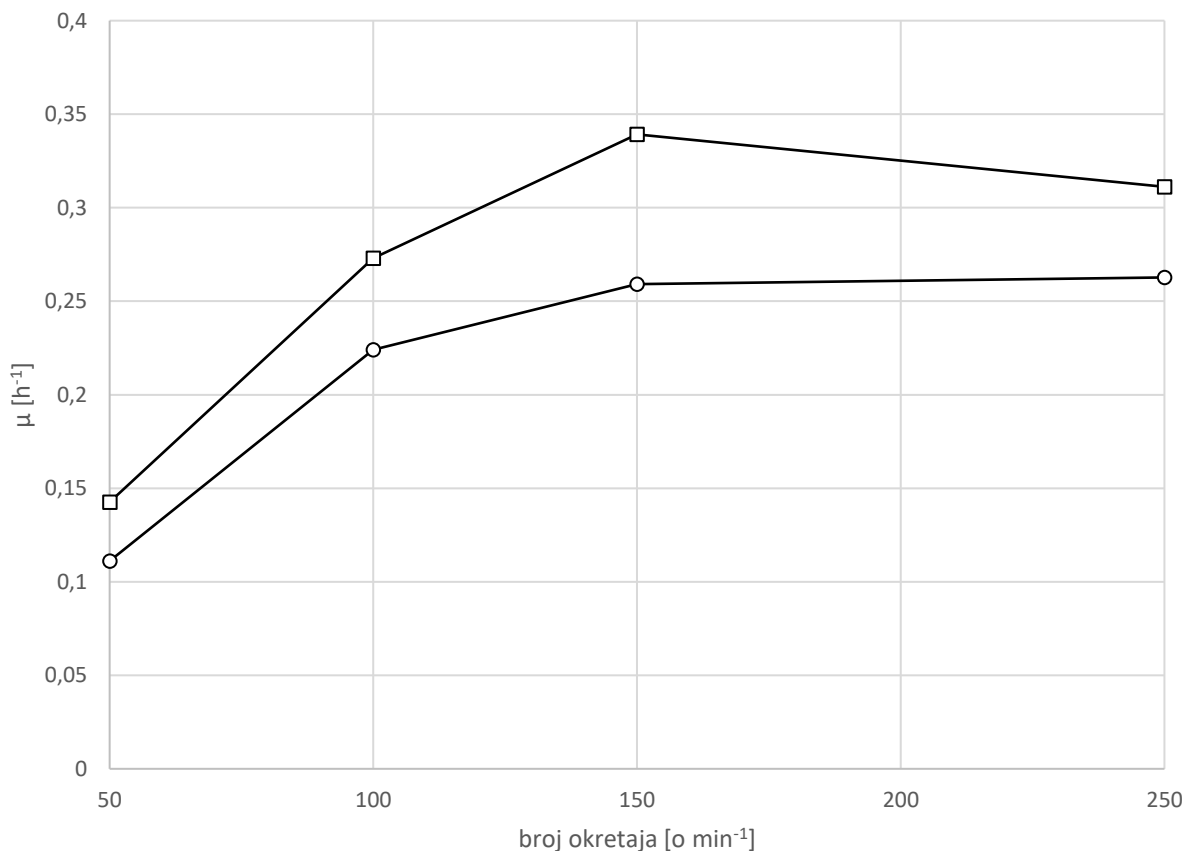
Uzgojem kvasca *S. arborarie* CBS 11463 pri 150 o min⁻¹ (slika 16) ostvarena je specifična brzina rasta od 0,2591 h⁻¹ (slika 18) te je zabilježena krajnja vrijednost OD₆₀₀ od 2,6637. Izmjerena vrijednost OD₆₀₀ pri 150 o min⁻¹ najveća je vrijednost postignuta uzgojem kvasca *S. arborarie* CBS 11463 na podlozi s arabinozom, te je 20 % je veća od vrijednosti izmjerene pri 100 i pri 250 o min⁻¹. Prilikom uzgoja utrošeno je 70 % arabinoze (6,0189 g L⁻¹) što je 13 % manje nego kod uzgoja pri 100 o min⁻¹. Uz to što se trošilo manje arabinoze, nastalo je i 10 % manje arabitola (2,6816 g L⁻¹ naspram 2,9493 g L⁻¹ kod uzgoja pri 100 o min⁻¹). U usporedbi s uzgojem kvasca *S. passalidarum* CBS 10155 pri istom broju okretaja, proizvedeno je 7 % manje arabitola u podlozi (2,6816 naspram 2,8738 g L⁻¹).



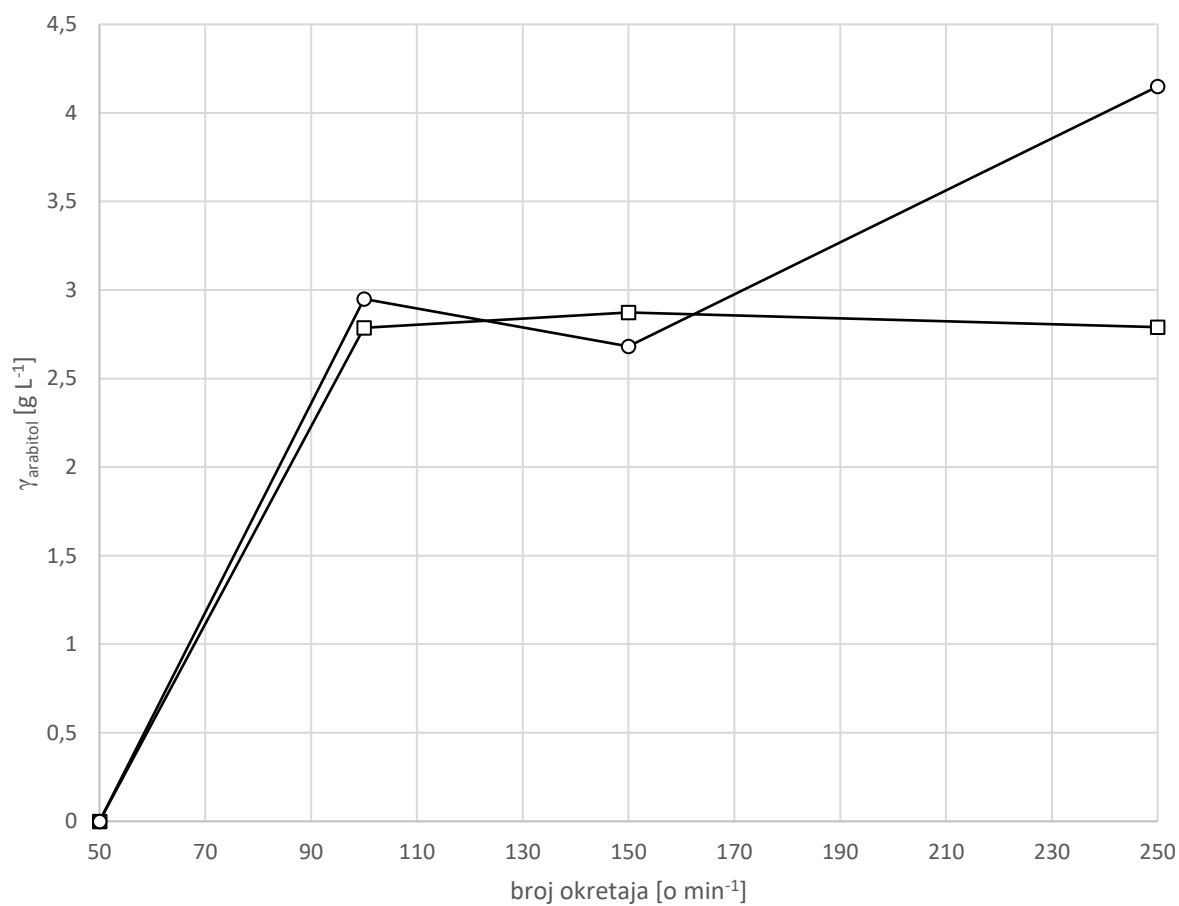
Slika 17. Promjena optičke gustoće podloge i koncentracije arabinoze, arabitola i glukoze tijekom 48-satnog uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 pri brzini okretaja od 250 o min⁻¹ (—□—arabinoza, —○— glukoza, —△— arabitol, —◇— OD₆₀₀; —■— etanol)

Tijekom uzgoja pri 250 o min⁻¹ (slika 17) zabilježena je najveća specifična brzina rasta za ovaj kvasac, od 0,2627 h⁻¹ koja je 15,8 % manja od brzine rasta kvasca *S. passalidarum* CBS 10155 pri istoj brzini okretaja tresilice (0,3112 h⁻¹). Tijekom uzgoja oba kvasca pri svim intenzitetima aeracije zamijećen je diauksičan rast sa preferencijom za glukozu. Su i sur. (2015) navode da kvasac *S. passalidarum* može istovremeno metabolizirati glukozu i ksilozu (koja spada u pentoze) dok je u radu Cadete i sur. (2009) navedeno da kvasac *S. arborarie*, kao i ostali kvasci koji konzumiraju pentoze, preferiraju glukozu. Zbog kontradiktornih literaturnih podataka nije moguće točno definirati mogu li ovi kvasci istovremeno trošiti heksoze i pentoze i u kojim uvjetima, što treba razjasniti prije primjene na lignoceluloznim sirovinama koje sadrže obje vrste ugljikohidrata. Iz rezultata prikazanih na slici 18, vidljivo je da pri svim istraženim brzinama okretaja tresilice kvasac *S. arborarie* CBS 11463 na podlozi s arabinozom ima manju specifičnu brzinu rasta od kvasca *S. passalidarum* CBS 10155. Glavni proizvod dobiven uzgojem kvasca *S. arborarie* CBS 11463 pri 250 o min⁻¹ je arabitol. Detektiran je u 24. satu te je njegova koncentracija iznosila 2,6442 g L⁻¹ što je blisko koncentracijama postignutim pri nižim brojevima okretaja, ali u posljednjem (48.) satu uzgoja. Također, slična je konačnim vrijednostima koncentracije arabitola ostvarenim uzgojem kvasca *S. passalidarum* CBS 10155 na istoj podlozi, pri 100, 150 i 250 o min⁻¹ (slika 19). Aeracija postignuta pri 250 o min⁻¹ pokazala se optimalnom za proizvodnju arabitola te je u zadnjem satu uzgoja njegova

koncentracija iznosila $4,1491 \text{ g L}^{-1}$, što je preko 50 % više od vrijednosti dobivene uzgojem pri 150 o min^{-1} . Za razliku od kvasca *S. passalidarum* CBS 10155, koji povećanjem broja okretaja iznad 100 o min^{-1} nije proizvodio značajno više arabitola, kvascu *S. arborarie* CBS 11463 je za proizvodnju arabitola pogodovala brzina okretaja od 250 o min^{-1} (slika 19). Pored arabitola, tijekom uzgoja oba kvasca pri $100, 150$ i 250 o min^{-1} proizvedene su i male koncentracije etanola ($< 0,1 \text{ g L}^{-1}$), koje se nisu značajno mijenjale produženjem trajanja procesa.



Slika 18. Ovisnost maksimalne specifične brzine rasta o aeraciji prilikom uzgoja kvasaca *S. passalidarum* CBS 10155 i *S. arborarie* CBS 11463 na tresilici u podlozi sa arabinozom (—○— *S. arborarie* CBS 11463; —□— *S. passalidarum* CBS 10155)



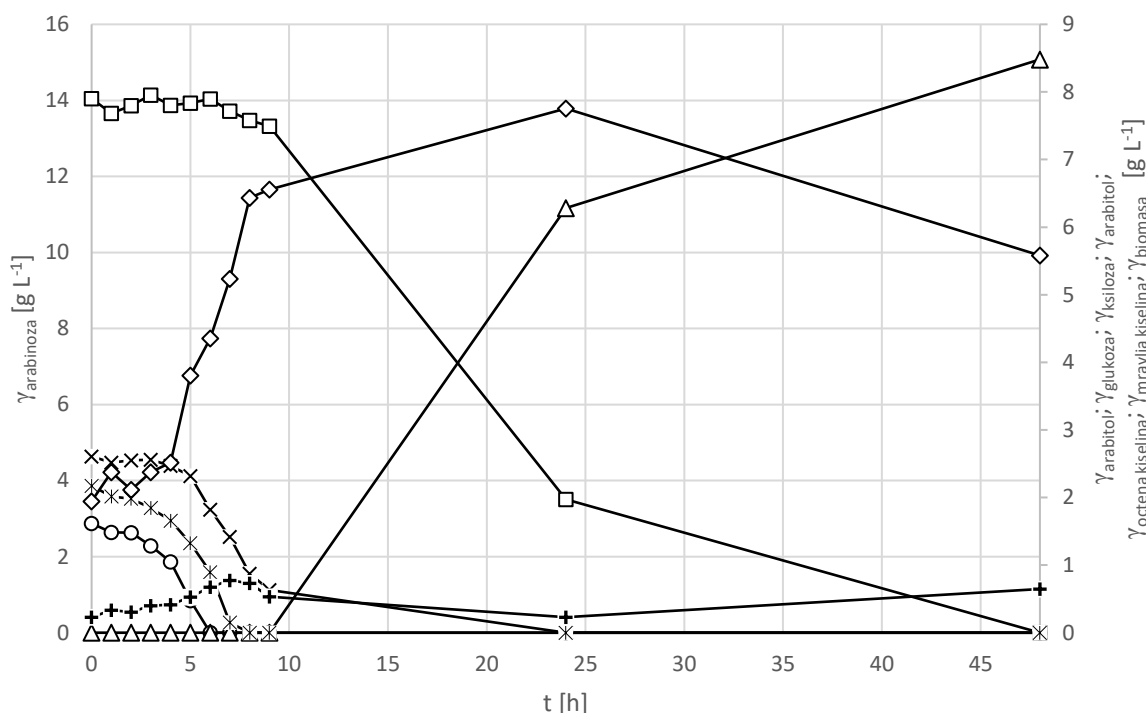
Slika 19. Prikaz ovisnosti konačne koncentracije arabitola dobivene uzgojima o broju okretaja tresilice (—○— *S. arborarie* CBS 11463; —□— *S. passalidarum* CBS 10155)

4.2. UZGOJ KVASACA *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 I *Spathaspora arborarie* CBS 11463 U KISELINSKOM HIDROLIZATU IZLUŽENIH REPINIH REZANACA I BIOREAKTORU S MIJEŠALOM

U ovom istraživanju proveden je uzgoj kvasaca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 na kiselinskom hidrolizatu izluženih repinih rezanaca. Hranjiva podloga je dobivena miješanjem prethodno proizvedenih hidrolizata kiselinski predobrađenih izluženih rezanaca šećerene repe u visokotlačnom reaktoru. Hidrolizati su dobiveni u istraživanju u sklopu projekta “Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina” (HRZZ-9717) pri 180 i 160 °C te 5 i 10 min. Podloga je sadržavala najviše arabinoze, zatim glukozu i ksilozu (tablica 2). Osim ugljikohidrata, u podlozi su bile prisutne i organske kiseline (octena i mravlja kiselina). Uzgoj je vođen kroz 48 sati u bioreaktoru s miješalom pri 28 °C i pH-vrijednosti 6 (Poglavlje 3.2.3). Protok zraka iznosio je 2,5 L min⁻¹, a brzina miješala 550 o min⁻¹. U određenim vremenskim intervalima sterilno se uzimao uzorak kojemu je određen sastav UPLC metodom te je gravimetrijski određena koncentracija biomase.

4.2.1. Uzgoj kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u bioreaktoru u kiselinskom hidrolizatu izluženih repinih rezanaca

Hranjiva podloga je u 0. satu uzgoja u bioreaktoru sadržavala 14,05 g L⁻¹ arabinoze, 2,61 g L⁻¹ ksiloze, 1,62 g L⁻¹ glukoze te 2,10 g L⁻¹ octene i 0,21 g L⁻¹ mravlje kiseline (slika 20). Zabilježene koncentracije navedenih organskih kiselina ne inhibiraju rast kvasca *Spathaspora passalidarum*. Prema Pacheco i sur. (2021) ovaj kvasac ne može fermentirati podlogu s 2,5 g L⁻¹ octene i 1 g L⁻¹ mravlje kiseline koje djeluju inhibicijski na njihov rast.

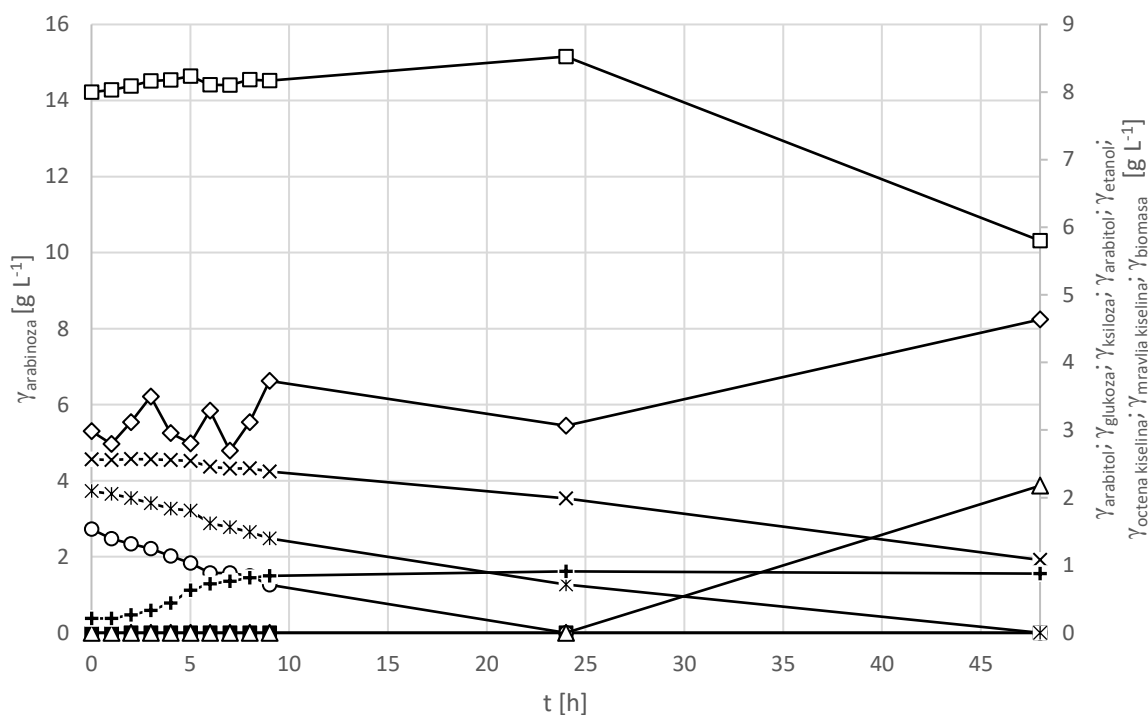


Slika 20. Uzgoj kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u bioreaktoru na kiselinskom hidrolizatu izluženih repinih reznaca (—□—arabinoza, —○— glukoza, —×— ksiloza —△— arabitol, —◇— biomasa, —+— mravlja kiselina, —*—octena kiselina, —■— etanol)

Tijekom uzgoja kvasac je imao na raspolaganju glukožu, ksilozu i arabinozu kao izvore ugljika. Glukoza je potpuno utrošena u 6. satu uzgoja, ksiloza u 24. satu, a arabinoza je bila potpuno utrošena tek u 48. satu. Primijećen je diauksični rast jer je trošenje arabinoze i ksiloze započelo nakon potpunog iscrpljivanja glukoze iz podloge. Maksimalna brzina trošenja glukoze iznosila $0,496 \text{ h}^{-1}$, a arabinoze $0,0862 \text{ h}^{-1}$. Specifična brzina respiracije u 6. satu uzgoja iznosila je $0,2110 \text{ g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dok je u 10. satu uzgoja bila upola manja, odnosno $0,1156 \text{ g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (rezultati nisu prikazani). Kvasac je ušao u eksponencijalnu fazu rasta u 4. satu uzgoja, a u stacionarnu fazu nakon 10. sata. Nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta, započela je sinteza arabitola. Detektiran je u podlozi nakon 24. sata kada je njegova koncentracija ($6,2800 \text{ g L}^{-1}$) iznosila 74 % od maksimalno postignute u posljednjem satu uzgoja ($8,4810 \text{ g L}^{-1}$). Etanol nije detektiran tijekom ovog uzgoja. Koncentracija octene kiseline dosegla je svoj maksimum u 7. satu uzgoja ($0,7749 \text{ g L}^{-1}$) i potom pala za 93 % do eksponencijalne faze rasta ($0,1511 \text{ g L}^{-1}$ od početnih $2,1758 \text{ g L}^{-1}$) te se nakon 8. sata uzgoja nije mogla detektirati u podlozi. Koeficijent konverzije supstrata (arabinoze) u arabitol iznosi $Y_{P/S} = 0,6038 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost $0,1767 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

4.2.2. Uzgoj kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 u bioreaktoru u kiselinom hidrolizatu izluženih repinih reznaca

Kvasac *Spathaspora arborarie* CBS 11463 uzgojen je u bioreaktoru na kiselinom hidrolizatu izluženih repinih reznaca. Sastav podloge nalazi se u tablici 2, a rezultati istraživanja prikazani su na slici 21.



Slika 21. Uzgoj kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 u bioreaktoru na kiselinom hidrolizatu izluženih repinih reznaca (—□—arabinoza, —○— glukoza, —×— ksiloza —△— arabitol, —◇— biomasa, —+— mravlja kiselina, —*— octena kiselina, —■— etanol)

Prilikom uzgoja, od sva tri ugljikohidrata, u potpunosti je utrošena samo glukoza i to tek nakon 9. sata uzgoja. Koncentracija ksiloze smanjila se za 58 % (preostalo je $1,0771 \text{ g L}^{-1}$ od početnih $2,5675 \text{ g L}^{-1}$). Maksimalna brzina potrošnje glukoze iznosila je $0,0798 \text{ h}^{-1}$, a arabinoze $0,0160 \text{ h}^{-1}$. Na kraju uzgoja u podlozi je ostalo $10,3134 \text{ g L}^{-1}$ arabinoze što znači da je utrošeno 27,5 % početne koncentracije arabinoze. Sukladno manjem rastu i utrošku arabinoze, proizvedeno je i manje arabitola. Na kraju uzgoja koncentracija arabitola iznosila je $2,1759 \text{ g L}^{-1}$, što je oko 4 puta manje od koncentracije arabitola dobivene uzgojem kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 na istoj podlozi. Koeficijent konverzije supstrata (arabinoze) u arabitol iznosio je $Y_{PS} = 0,5570 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost $0,0453 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Koncentracija mravlje kiseline u podlozi rasla je do 8. sata uzgoja te je dostigla vrijednost od

0,8133 g L⁻¹, a do kraja uzgoja se nije značajno promijenila. Specifična brzina respiracije u 6. satu uzgoja iznosila je 0,2744 g O₂ h⁻¹ g⁻¹, a zatim je u 10. satu uzgoja opala više od tri puta, na 0,0715 g O₂ h⁻¹ g⁻¹. Koncentracija octene kiseline u podlozi opada linearno do 24. sata uzgoja, a na kraju uzgoja nije detektirana u podlozi. Količina octene kiseline koja se nalazila u podlozi nakon 24 sata uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 bila je jednaka onoj u 6. satu uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155. S obzirom da su oba kvasca rasla na istoj podlozi, može se pretpostaviti da je kvasac *Spathaspora arborarie* CBS 11463 osjetljiviji na prisutne inhibitore jer je slabije rastao te sporije metabolizirao octenu kiselinu iz podloge. Također, moguće je da je manja koncentracija biomase odgovorna za nižu koncentraciju proizvedenog arabitola.

5. ZAKLJUČCI

1. Za istraživanje proizvodnje arabitola na hidrolizatu dobivenom kiselinskom hidrolizom izluženih rezanaca šećerne repe odabrane su dvije vrste ne-*Saccharomyces* kvasca: *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463.
2. Istraživanjem rasta kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 u hranjivoj podlozi s arabinozom pri različitim brzinama okretaja tresilice (50-250 o min⁻¹) dobivene su različite koncentracije arabitola. Maksimalna koncentracija dobivena je uzgojem pri 150 o min⁻¹ te je iznosila 2,8738 g L⁻¹. Navedena vrijednost se značajno ne razlikuje od koncentracije arabitola proizvedene pri 100 i pri 250 o min⁻¹ te se iz toga može pretpostaviti da dodatna aeracija ne doprinosi povećanju proizvodnje arabitola pri broju okretaja iznad 100 o min⁻¹.
3. Proizvodnja arabitola pomoću kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463 odvijala se u hranjivoj podlozi s arabinozom pri različitim brzinama okretaja tresilice. Najveća konačna koncentracija arabitola primijećena je pri najvećem broju okretaja. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da kvascu *S. arborarie* CBS 11463, za proizvodnju arabitola, pogoduje brzina okretaja od 250 o min⁻¹ pri kojoj je zabilježeno 4,1491 g L⁻¹ arabitola što je 50 % više od postignute uzgojem istog kvasca pri 150 o min⁻¹.
4. Za sve istražene brzine okretaja tresilice, kvasac *S. arborarie* CBS 11463 je imao oko 20 % manju specifičnu brzinu rasta od kvasca *S. passalidarum* CBS 10155 u istim uvjetima uzgoja.
5. Kiselinskom hidrolizom izluženih repinih rezanaca dobiven je hidrolizat s 14,05 g L⁻¹ arabinoze, 2,61 g L⁻¹ ksiloze, 1,62 g L⁻¹ glukoze te 2,10 g L⁻¹ octene i 0,21 g L⁻¹ mravlje kiseline koji je korišten za uzgoj obaju kvasaca u bioreaktoru. Istraživanjem rasta ne-*Saccharomyces* kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 i *Spathaspora arborarie* CBS 11463 na navedenoj hranjivoj podlozi, zabilježen je arabitol kao glavni produkt. Tijekom uzgoja kvasca *Spathaspora passalidarum* CBS 10155 konačna koncentracija arabitola u podlozi iznosila je 8,4810 g L⁻¹. Koeficijent konverzije supstrata (arabinoze) u arabitol iznosio je $Y_{P/S} = 0,6038 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost 0,1767 g L⁻¹ h⁻¹. Na kraju uzgoja kvasca *Spathaspora arborarie* CBS 11463, koncentracija arabitola iznosila je 2,1759 g L⁻¹. Niža koncentracija arabitola u podlozi vjerojatno je posljedica manje koncentracije biomase kvasca. Koeficijent konverzije supstrata u produkt iznosio je $Y_{P/S} = 0,5570 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost 0,0453 g L⁻¹ h⁻¹.
6. U oba kvasca primijećen je diauksični rast jer je potrošnja arabinoze i ksiloze započela nakon potpuno iscrpljenja glukoze iz podloge. Etanol nije detektiran tijekom oba uzgoja na kiselinskom hidrolizatu izluženih repinih rezanaca.

6. LITERATURA

Anonymous (2019) Slika šećerne repe, <<https://antropocene.it/en/2019/07/12/beta-vulgaris-var-saccharifera/>>. Pristupljeno 3. kolovoza 2021.

Cadete, R., Santos, R., Melo, M., Mouro, A., Goncalves, D., Stambuk, B., Gomes, F., Lachance, M. and Rosa, C. (2009) *Spathaspora arborarie* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Research*, **9**(8), 1338-1342.

Carpentier, L., Paluch, M., Pawlus, S. (2011) Dielectric studies of the mobility in pentitols. *J. Phys. Chem. B*. **115**(5), 1062-6.

Chandel, A. K., da Silva, S. S., Singh, O. V. (2011) Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. U: *Biofuel production—recent developments and prospects* (Dos Santos Bernardes, M.A., ured.), IntechOpen, str. 226-246.

Chen, H. (2015) *Lignocellulose Biorefinery Engineering*. Woodhead Publishing, Cambridge.

Deshavath, N., Mohan, M., Veeranki, V., Goud, V., Pinnamaneni, S., Benarjee, T. (2017) Dilute acid pretreatment of sorghum biomass to maximize the hemicellulose hydrolysis with minimized levels of fermentative inhibitors for bioethanol production. *3 Biotech* **7**(2), 139.

Harmsen, P., Lips, S., Bakker, R. (2013) Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid. Wageningen Food & Biobased Institute Research, Wageningen.

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

Jeleč, Z. (2020) Utjecaj temperature na dinamiku proizvodnje bioplina iz siliranog repinog rezanca, (diplomski rad), Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Joanna, B., Michal, B., Piotr, D., Agnieszka, W., Dorota, K., Izabela, W. (2018) Sugar beet pulp as a source of valuable biotechnological products. U: *Advances in Biotechnology for Food Industry, Handbook of Food Bioengineering* (Holban, A.M., Grumezescu, A.M., ured.), Elsevier, **14**, str. 359-392.

- Jönsson, L. J., Alriksson, B., Nilvebrant, NO. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 16.
- Koganti, S., Kuo, T., Kurtzman, C., Smith, N., Ju, L. (2010) Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**(1), 257-267.
- Kordowska-Wiater, M. (2015) Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. *J. Appl. Microbiol.* **119**(2), 303-314.
- Kordowska-Wiater, M., Kuzdraliński, A., Czernecki, T., Targoński, Z., Frąc, M., Oszust, K. (2017) The production of arabitol by a novel plant yeast isolate *Candida parapsilosis* 27RL-4. *Open Life Sci.* **12**(1), 326-336.
- Kręgiel, D., Pawlikowska, E., Antolak, H. (2017) Non-conventional yeasts in fermentation processes: potentialities and limitations, U: *Old Yeasts - New Questions* (Lucas C., Pais C., ured.), IntechOpen.
- Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M., Stroeve, P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**(8), 3713-3729.
- Kumdam, H., Narayana Murthy, S., Gummadi, S. N. (2013) Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB Expr.* **3**, 23.
- Kumdam, H., Narayana Murthy, S., Gummadi, S. N. (2014) Arabitol production by microbial fermentation - biosynthesis and future applications. *IJSBAR* **1**(1), 01-12.
- Kuthi, F. A. A., Rabbi, N., Norzali, A., Haji Badri, K. (2016) Thermal Characteristics of microcrystalline cellulose from oil palm biomass. *Malaysian J. Anal. Sci.* **20**(5), 1112-1122.
- Liović, I. (1998) Istraživanje i proizvodnja šećerne repe u SAD. *Sjemenarstvo*, **15**(5), 309-317.
- Malav, M., Sushil Kumar Kharia, S., K. R. Sheetal, S., Kannojiya, S. (2017) Furfural and 5-HMF: Potent fermentation inhibitors and their removal techniques. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **6**(3), 2060-2066.

- 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**, 483–499.
- Nguyen, N., Suh, S., Marshall, C., 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 Research*, **110**(10), 1232-1241.
- Pacheco, T., Machado, B., de Moraes Júnior, W., Almeida, J., Gonçalves, S. (2021) Enhanced tolerance of *Spathaspora passalidarum* to sugarcane bagasse hydrolysate for ethanol production from xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **193**(7), 2182-2197.
- Padilla, B., Gil, J. V., Manzanares, P. (2016) Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* **7**, 411.
- Perković, L. (2020) Proizvodnja etanola s pomoću kvasaca iz roda *Spathaspora* na hidrolizatima dobivenim kiselinom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe, (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* **27**(2), 185-194.
- Selim, K., Easa, S., El-Diwany, A., (2020) The xylose metabolizing yeast *Spathaspora passalidarum* is a promising genetic treasure for improving bioethanol production. *Fermentation* **6**(1), 33.
- Shafiei M., Kumar R., Karimi K. (2015) Pretreatment of lignocellulosic biomass. U: *Lignocellulose-Based Bioproducts. Biofuel and Biorefinery Technologies* (Karimi K., ured.), 1. izdanje, Springer, Switzerland.
- Sibirny, A., Scheffers, L. (2002) Biochemistry, genetics, biotechnology and ecology of non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research* **2**(3), 293.
- Stewart, G. G. (2014) *Saccharomyces cerevisiae*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology* (Batt, C.A., Tortorello, M.L., ured.), Elsevier, str. 309–315.

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.

Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **199**, 49-58.

U.S EPA (1997) *Dokumentacija emisijskih faktora za AP-42; Sugarbeet processing*
U.S EPA - U. S. Environmental Protection Agency

van der Pol, E., Bakker, R., Baets, P., Eggink, G. (2014) By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**(23), 9579-9593.

Vojvodić Cebin, A. (2019) Oligosaharidi iz sekundarnih biljnih sirovina - izdvajanje, karakterizacija i primjena u razvoju funkcionalnih konditorskih proizvoda (doktorska disertacija) Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Wendland, J. (2019) Non-Conventional Yeasts: Genomics and Biotechnology. *Microorganisms*, **8**(1), 21.

Zhou, X., Li, W., Mabon, R., Broadbelt, L. (2016) A Critical Review on Hemicellulose Pyrolysis. *Energy Technol.* **5**, 52-79.

Zoghلامي, A., Paës, G. (2019) Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front. Chem.* **7**, 874.

PRILOZI

Prilog 1. Standardi korišteni za UPLC analizu

Tvar	RT (min)	Jednadžba kalibracijskog pravca	R ²
mliječna kiselina	6,632	$y = 61091x + 8832,5$	0,9934
mravlja kiselina	7,11	$y = 47328x + 53,595$	1,0000
arabinoza	5,604	$y = 128443x + 3314,1$	0,9997
etanol	11,072	$y = 55421x + 1343$	1,0000
octena kiselina	7,816	$y = 57358x + 697,25$	1,0000
glukoza	4,821	$y = 135278x - 3377$	0,9997
arabitol	5,85	$y = 127741,79 + 1700,63$	1,0000
ksiloza	5,164	$y = 129878x - 627,53$	0,9998

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

 Umm Zora
