

Određivanje optimalne pH vrijednosti za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Vukoje, Kristina

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:159:644575>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

Kristina Vukoje
1490/BPI

**ODREĐIVANJE OPTIMALNE pH
VRIJEDNOSTI ZA RAST I
PROIZVODNJU ETANOLA S
POMOĆU KVASCA *Kluyveromyces
marxianus* NBRC 1777**

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

Diplomski rad je izrađen u okviru projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (šifra projekta: IP-2018-01-9717) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

Ovim putem zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Antoniji Trontel, na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada, uloženom trudu i vremenu, brojnim savjetima i pomoći prilikom izrade i pisanja rada. Također se zahvaljujem asistentima Nenadu Marđetku, mag. ing. bioproc. i Marini Grubišić, mag. ing. bioproc. te docentu doc. dr. sc. Mariu Novaku na svim savjetima i pomoći pruženoj tijekom izrade rada. Veliko hvala i tehničaru Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Igoru Livadi, na tehničkoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada. Hvala i svim drugim djelatnicima laboratorija, koji su pomagali u izradi eksperimenata.

Htjela bih se zahvaliti svim prijateljima i kolegama koji su mi tijekom školovanja pomagali te pokazali strpljenje i razumijevanje.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima, sestrama i zaručniku na ukazanom strpljenju, ljubavi i podršci tijekom dosadašnjeg školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje optimalne pH vrijednosti za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca

Kluyveromyces marxianus NBRC 1777

Kristina Vukoje, 1490/BPI

Sažetak:

U zadnje vrijeme intenzivno se proučava proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovinama s pomoću različitih vrsta mikroorganizama. Hidrolizom lignoceluloznih sirovina dobivaju se fermentabilni šećeri - pentoze i heksoze. Poznato je da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ne može metabolizirati pentoze, te su stoga istraživanja usmjerena na pronalaženje mikroorganizama koji uz uspješno metaboliziranje pentozna, toleriraju visoke koncentracije etanola i niske pH vrijednosti kakve su prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima nakon kiselinskog predtretmana. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* pokazao se kao zadovoljavajuća alternativa kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u procesu proizvodnje etanola. Termotolerantni kvasac *Kluyveromyces marxianus* može rasti i proizvoditi etanol i pri vrlo niskim pH vrijednostima podloge od 2,3 jedinice. U ovom radu su u svrhu pronalaženja optimalne pH vrijednosti i koncentracije inokuluma za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provedeni uzgoji u YPD (yeast extract pepton dextrose) podlozi pri pH vrijednostima od 2, 3, 4 i 5 jedinica te uz koncentracije inokuluma od 2,5; 5 i 10 % (vol/vol). Unutar svih testiranih pH vrijednosti, najveća specifična brzina rasta ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$) te najveća produktivnost proizvodnje etanola ($Pr_{\text{etanol}} = 1,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i koeficijent konverzije glukoze u etanol ($Y_{\text{etanol/glukoza}} = 0,50 \text{ g g}^{-1}$), određeni su pri pH vrijednosti od 4 jedinice. Pri pH vrijednosti od 2 jedinice ovaj soj kvasca raste vrlo sporo i proizvodi minimalne količine etanola uz vrlo nisku produktivnost procesa proizvodnje etanola ($Pr_{\text{etanol}} = 0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Ključne riječi: pH vrijednost, koncentracija inokuluma, etanol, glukoza, *Kluyveromyces marxianus*

Rad sadrži: 43 stranice, 12 slika, 5 tablica, 43 literaturne reference, 15 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Antonija Trontel

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

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Datum obrane: 21. srpnja, 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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Determination of optimal pH value for growth and ethanol production by yeast *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777
Kristina Vukoje, 1490/BPI

Abstract:

Recently, the production of bioethanol by microorganisms on lignocellulosic raw materials has been intensively studied. Hydrolysis of lignocellulosic raw materials yields fermentable sugars, pentoses and hexoses. As the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cannot metabolize pentoses, the research is aimed at finding a microorganism that, in addition to successfully metabolizing pentose sugars, tolerates high concentrations of ethanol and low pH values that predominate in hydrolysates after acid pretreatment. The yeast *Kluyveromyces marxianus* is a suitable alternative to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the ethanol production process. Thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* can grow and produce ethanol even at low pH values of the medium of 2.3 units. In this work, in order to find the optimal pH value and inoculum concentration for growth and ethanol production using yeast *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, cultivation was performed in YPD (yeast extract peptone dextrose) medium at pH values of 2, 3, 4, and 5 units and with inoculum concentrations of 2.5; 5 and 10 % (vol/vol). Within all tested pH values, the highest specific growth rate ($\mu = 0.43 \text{ h}^{-1}$) and the highest productivity of ethanol production ($Pr_{\text{ethanol}} = 1.51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) plus the conversion coefficient of glucose to ethanol ($Y_{\text{ethanol/glucose}} = 0.50 \text{ g g}^{-1}$), were determined at a pH of 4 units. At a pH value of 2 units, this yeast strain grows very slowly and produces minimal amounts of ethanol with very low ethanol process productivity ($Pr_{\text{ethanol}} = 0.41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Keywords: pH value, inoculum concentration, ethanol, glucose, *Kluyveromyces marxianus*

Thesis contains: 43 pages, 12 figures, 5 tables, 43 references, 15 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Antonija Trontel, Assistant professor

Technical support and assistance: MSc Nenad Marđetko

Reviewers:

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

Paper defended: 21st July, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KVASCI	2
2.2. KVASAC <i>Kluyveromyces marxianus</i>	3
2.3. METABOLIZAM KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i>	4
2.3.1. Supstrati u metabolizmu	4
2.3.2. Produkti metabolizma	5
2.4. PROIZVODNJA BIOETANOLA	8
2.4.1. Bioetanol kao biogorivo	9
2.5. TERMOTOLERANTNOST	9
2.6. MEHANIZAM PREŽIVLJAVANJA NA NISKIM pH VRIJEDNOSTIMA	10
2.7. GENETIČKE MODIFIKACIJE KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i>	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Radni mikroorganizam	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Hranjive podloge	14
3.1.4. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Priprema hranjivih podloga	17
3.2.2. Uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777	18
3.3. ANALITIČKE METODE	18
3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka	18
3.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca	18
3.3.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata fermentacije UPLC metodom	19
3.3.4. Određivanje udjela živih i mrtvih stanica	20
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI	20
3.4.1. Prinos biomase (Y_X)	20
3.4.2. Prinos produkta (Y_P)	20
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)	21
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)	21
3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_{glc})	21
3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_P)	21
3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)	21
3.4.8. Produktivnost (Pr)	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22

4.1. UTJECAJ KOLIČINE INOKULUMA NA POTROŠNJU SUPSTRATA, RAST BIOMASE I PRINOSE PRODUKATA TIJEKOM UZGOJA KVASCA <i>K. marxianus</i> NBRC 1777	23
4.1.1. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 2,5 % inokuluma	23
4.1.2. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 5 % inokuluma	25
4.1.3. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 10 % inokuluma	26
4.2. UTJECAJ pH VRIJEDNOSTI PODLOGE NA POTROŠNJU SUPSTRATA, RAST BIOMASE I PRINOSE PRODUKATA TIJEKOM UZGOJA KVASCA <i>K. marxianus</i> NBRC 1777	29
4.2.1. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 5 jedinica	29
4.2.2. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 4 jedinice	31
4.2.3. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 3 jedinice	33
4.2.4. Uzgoj kvasca <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 2 jedinice	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Kvasci imaju široku primjenu i u tradicionalnoj i u modernoj biotehnologiji za proizvodnju hrane, pića, enzima, finih kemikalija i farmaceutskih reagensa. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i srodne vrste su posebno dobro poznati zbog njihove važnosti u proizvodnji fermentiranih pića (pivo, vino, jabukovača). Ipak, postoji velika raznolikost među kvascima između i unutar rodova *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debarromyces* i *Yarrowia* koji imaju važnu ulogu u biotehnologiji (Lane i Morrissey, 2010). Kvasci se također upotrebljavaju u moderne biotehnološke svrhe zbog svoje velike brzine rasta te jednostavnosti upravljanja genima što doprinosi razumijevanju brojnih posttranslacijskih modifikacija karakterističnih za eukariote kao što su glikozilacija, proteoliza, formiranje disulfidnih mostova i dr. (Mogmenga i sur., 2019).

Sa sve većim interesom za uporabu novih mikroorganizma u biotehnološke svrhe, koriste se nova znanja i tehnologije kako bi se istražili „nekonvencionalni“ kvasci (Lane i Morrissey, 2010). Dobro je poznato da je jedan od najučinkovitijih mikroorganizama za proizvodnju etanola *Saccharomyces cerevisiae* zbog visoke produktivnosti u procesu proizvodnje etanola. Međutim, divlji tip kvasca *S. cerevisiae* nije u mogućnosti metabolizirati šećere pentoze za rast ili fermentaciju zbog nedostatka aktivnih metaboličkih puteva za ove šećere (Bušić i sur., 2018).

Proizvodnja etanola na visokim temperaturama poželjan je postupak fermentacije zbog mnogih prednosti poput smanjenja troškova hlađenja i smanjenog rizika od kontaminacije. *Kluyveromyces marxianus* je izrazito perspektivan termotolerantni kvasac za takav postupak. Mnogi sojevi kvasca *K. marxianus* rastu na temperaturama u rasponu 45 - 52 °C, na kojima je njihova fermentacijska učinkovitost slična onoj kvasca *S. cerevisiae* na 30 °C. Također, ovaj kvasac može učinkovito proizvoditi etanol iz glukoze na temperaturama iznad 40 °C (Goshima i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je provesti uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 s različitim početnim koncentracijama inokuluma (2,5 %, 5 % i 10 % vol/vol) i pri različitim pH vrijednostima (2, 3, 4 i 5 jedinica) u YPD podlozi u anaerobnim uvjetima. Na temelju dobivenih rezultata izračunati su osnovni biokinetički parametri rasta i proizvodnje etanola za sve testirane pH vrijednosti te je iz dobivenih podataka određena optimalna pH vrijednost za provođenje bioprocasa proizvodnje etanola u većem mjerilu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KVASCI

Jedna od prvih primjena kvasaca je ona u proizvodnji fermentiranih pića iz tekućina koje su sadržavale fermentabilne šećere. Kvasci provode konverzije različitih šećera u alkohol (etanol) i ugljikov dioksid u procesu zvanom fermentacija. Prvi zapisi o morfologiji kvasca datiraju iz 17. stoljeća, a opis uloge kvasca u fermentacijama objavljen je u 19. stoljeću. Nakon toga, kvasci su se sve više počeli primjenjivati u industrijske svrhe. Problem koji se javlja prilikom takve proizvodnje je niska tolerancija kvasaca na povišene koncentracije etanola. Do danas je istražen velik broj kvasaca koji toleriraju različite koncentracije alkohola u različitim proizvodima (Seo i sur., 2020).

Najvažniji izvor nutrijenata za kvasce su ugljikohidrati koji služe kao izvor ugljika i energije. Kvasci mogu fermentirati samo nekoliko vrsta šećera, među kojima su najčešće heksoze. Mogućnost metaboliziranja pentoza prisutna je kod manjeg broja vrsta. Među pentozama, najviše se istražuje metaboliziranje ksiloze za industrijsku proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina (Türker, 2014).

Kvasci mogu tolerirati širok raspon pH vrijednosti, a rastu i u relativno niskom pH području gdje većina bakterija ne može rasti (Türker, 2014). Johnson (1998, 2008) je definirao mikroorganizme koji rastu na pH vrijednostima od 3 i manje jedinica kao ekstremnim acidofilima. Acidofili imaju važnu ulogu u izluživanju metala, bioremedijaciji, proizvodnji električne energije i enzima koji se koriste u prehrambenoj industriji.

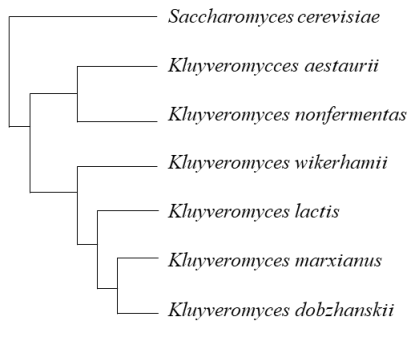
Rast na niskim pH vrijednostima iskazuju i ne-*Saccharomyces* kvasci kojima pripada kvasac *Kluyveromyces marxianus*. Ne-*Saccharomyces* kvasci klasificirani su kao askomicete i bazidomicete, a razlikuje ih raspon primjene u industrijskim biotehnoškim procesima. Dugo su se smatrali kvascima kvarenja, a danas su našli svoju primjenu u brojnim biotehnoškim procesima kao što su proizvodnja hrane i etanola, proizvodnja proteina i enzima, bioremedijacija te kao modelni organizmi za genetičke transformacije (Radecka i sur., 2015; Johnson, 2013).

2.2. KVASAC *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus je homotaličan kvasac koji pripada podrazredu hemiaskomiceta (Lane i Morrissey, 2010). Nekonvencionalni je kvasac koji može učinkovito metabolizirati širok raspon ugljikohidrata (Martynova i sur., 2016a). *Kluyveromyces marxianus* je perspektivna vrsta kvasca za proizvodnju etanola te je dobar domaćin za ekspresiju heterolognih proteina (Tavares i sur., 2019). Prema filogenetskim značajkama srodan je kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, a sestrinska je vrsta kvascu *Kluyveromyces lactis*. Glavna zajednička značajka kvasaca *K. lactis* i *K. marxianus* je sposobnost asimilacije i metaboliziranja šećera laktoze kao izvora ugljika. Zbog toga se često izolacija ovih kvasaca vrši iz mliječnih izvora, kao što su fermentirano mlijeko, jogurt i sirevi.

K. marxianus je bolje prihvaćen u industriji zato što posjeduje osobine poželjne za primjenu u biotehnologiji (slika 1). To uključuje asimilaciju širokog spektra supstrata, među kojima su i laktoza i inulin; izrazito velika brzina rasta s prosječnim generacijskim vremenom od ~70 min; termotolerantnost koja omogućuje rast kvasca na temperaturama do 52 °C te velik kapacitet sekrecije proteina (Lane i Morrissey, 2010).

Njegova stanična membrana također je vrlo otporna na toksične spojeve poput inhibitora fermentacije i može ih asimilirati kako bi ublažila efekt inhibicije (Demiray i sur., 2020). Ovaj kvasac je dobio GRAS (eng. Generaly Regarded As Safe) i QPS (eng. Qualified Presumption of Safety) status, a kao rezultat, njegova biomasa može se koristiti kao hrana ili dodatak hrani (Martynova i sur., 2016b). Takva primjena sa sobom donosi određena ograničenja, ali i uvelike poboljšava potencijal u biotehnološkom sektoru (Lane i Morrissey, 2010).



	Rast na laktozi	Proizvodnja inulinaza	μ_m	Fermentacije glukoze	Maksimalna temperatura rasta
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	0,37	+	35°C
<i>Kluyveromyces aestaurii</i>	-	-	n.d.	+	35°C
<i>Kluyveromyces nonfermentas</i>	-	-	n.d.	-	42°C
<i>Kluyveromyces wikerhamii</i>	-	-	0,43	+	37°C
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	0,50	+	37°C
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	0,60	+	52°C
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	-	-	n.d.	+	35°C

n.d., nije dostupno

Slika 1. Prikaz filogenetskog odnosa kvasaca iz roda *Kluyveromyces* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (prema Lane i Morrissey, 2010)

2.3. METABOLIZAM KVASCA *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus je aerobni kvasac kod kojeg je izražen respiratorno-fermentativni metabolizam kojemu je glavna značajka stvaranje etanola u aerobnim uvjetima. Ova pojava česta je kod hemiascomicetnih kvasaca i pojavljuje se s najvećom regulacijom u kvascu *S. cerevisiae*. Nekoliko regulatornih procesa pridonose učinkovitom fermentacijskom kapacitetu kvasca *S. cerevisiae*, ponajviše *Crabtree* efekt, koji je posljedica kataboličke represije ugljikom (glukozom) gena koji kodiraju respiratorne enzime i slabi *Pasterov* učinak, koji opisuje inhibiciju fermentacijskog metabolizma kisikom. *K. lactis* i *K. marxianus* klasificiraju se kao *Crabtree* negativni kvasci, što znači da se prilikom njihovog uzgoja ne postiže maksimalna učinkovitost konverzije šećera u etanol (Lane i sur., 2011).

2.3.1. Supstrati u metabolizmu

Kvasac *K. marxianus* može rasti na glukozu, fruktozi, ksilozi, galaktozi, laktozi, manozu i inulinu kao jedinim izvorima ugljika prisutnim u hranjivoj podlozi (slika 2, Pentjuss i sur., 2017; Martynova i sur., 2016b). Uspješno metabolizira šećere koji se oslobađaju nakon hidrolize celuloze i hemiceluloze te asimilira razne izvore ugljika, uključujući i arabinozu (Martynova i sur., 2016a; Matsuzaki i sur., 2012). Zbog fiziološke i metaboličke raznolikosti

unutar vrste *K. marxianus*, razni sojevi imaju različitu sposobnost metaboliziranja navedenih ugljikohidrata (Martynova i sur., 2016b).

Glukoza, fruktoza i njihovi polisaharidi su važna skupina supstrata u industrijskoj primjeni. Melasa šećerne repe ili šećerne trske, škrob, saharoza i inulin su karakteristični primjeri sirovina/supstrata u industriji. Laktoza je glavni ugljikohidrat u sirutki koji služi kao jeftina sirovina za rast mikroorganizama, a dostupna je u velikim količinama (Pentjuss i sur., 2017). Celuloza je najzastupljeniji obnovljivi resurs na zemlji i njegova učinkovita pretvorba u etanol predstavlja izvor za zamjenu fosilnih goriva (Matsuzaki i sur., 2012).

Metabolizam laktoze u kvascu omogućen je zahvaljujući genima LAC12, koji kodira enzim laktoza permeazu potrebnu za transport laktoze u stanicu i LAC4, koji kodira enzim β -galaktozidazu zaslužnu za hidrolizu laktoze u glukozu i galaktozu. Kvasac *K. marxianus* može hidrolizirati inulin na glukozu i fruktozu zahvaljujući aktivnosti ekstracelularne inulinaze. Ksilozu se u metabolizmu kvasca razgrađuje pentoza-fosfatnim putem pomoću ksiloza-reduktaze, ksilitol-dehidrogenaze i ksiluloza-kinaze. Mutanti kvasca ne mogu metabolizirati ksilozu (Pentjuss i sur., 2017). Biokonverzija celuloze u etanol sastoji se od tri važna koraka: proizvodnje celulaza, hidrolize polisaharida i fermentacije jednostavnih ugljikohidrata. Budući da je najskuplji korak u tom postupku proizvodnja enzima, za fermentaciju celuloze u etanol primjenjuje se kvasac *K. marxianus* koji izlučuje heterologne celulaze (Matsuzaki i sur., 2012).

2.3.2. Produkti metabolizma

Kluyveromyces marxianus može metabolizirati laktozu, inulin (fruktozu), glukozu i ksilozu do etanola. Maksimalni teoretski omjer pretvorbe supstrata u etanol za laktozu iznosi 4, za inulin/glukozu 2 te za ksilozu 1,6.

Octena kiselina je jedna od prvih proizvoda industrijski proizvedenih pomoću mikroorganizama. *K. marxianus* je potencijalni proizvođač octene kiseline, iako je prinos octene kiseline za komercijalne svrhe izrazito nizak. Do akumulacije octene kiseline dolazi tijekom eksponencijalne faze rasta, a smatra se nepoželjnim nusproduktom fermentacije.

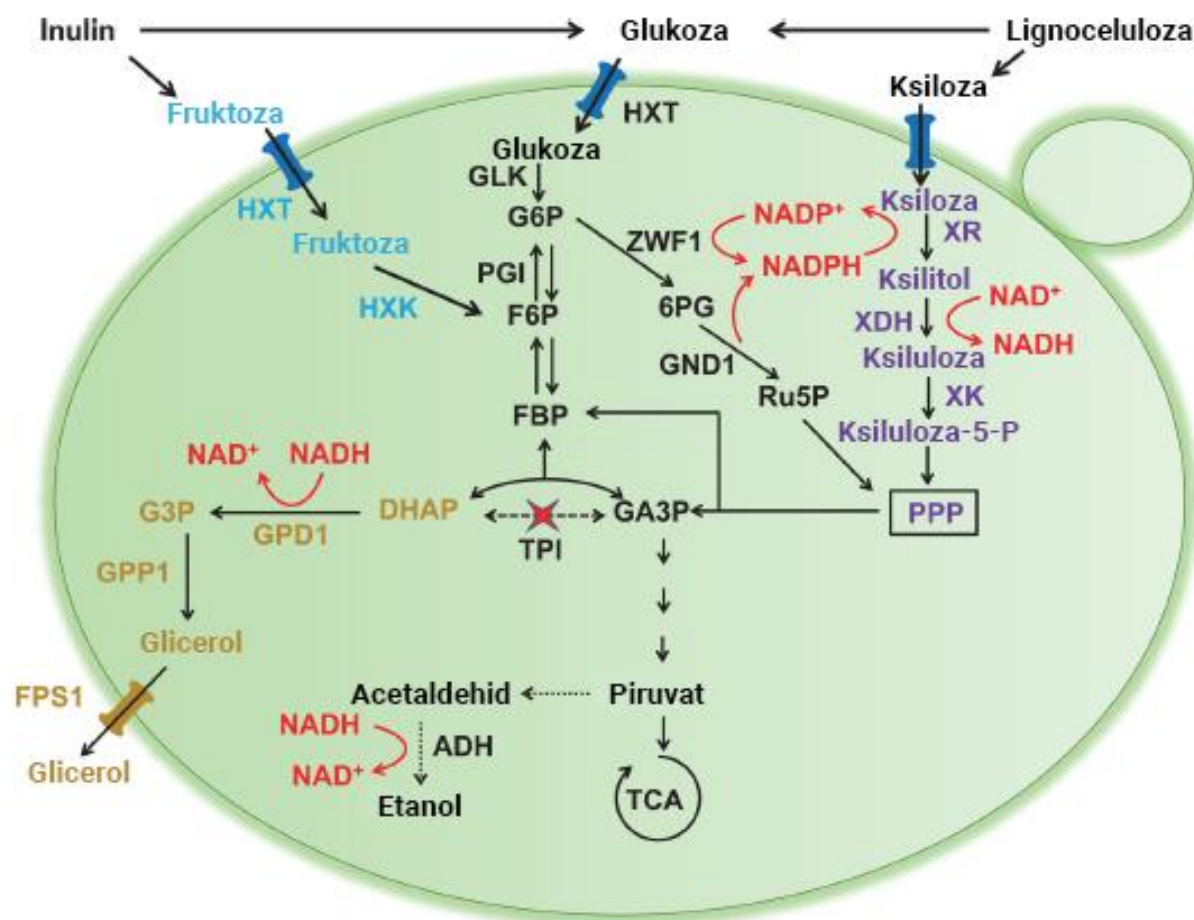
Mliječna kiselina uvelike se koristi u prehrambenoj industriji te se primjenjuje kao monomer u biorazgradivoj plastici. Proizvodnja mliječne kiseline mikrobnim putem jedna je

od opcija za dobivanje L-mliječne kiseline u količinama dostatnim za industrijske potrebe. *K. marxianus* proučavan je kao potencijalni proizvođač mliječne kiseline zbog velike brzine proizvodnje i GRAS statusa. Kako kvasci ne posjeduju enzim laktat dehidrogenazu, za uspješnu proizvodnju mliječne kiseline bilo bi potrebno konstruirati rekombinantni soj koji eksprimira izvanstaničnu L-laktat dehidrogenazu te time ima mogućnost konverzije piruvata u laktat (Pentjuss i sur., 2017; Ishida i sur., 2005).

Glicerol je, uz octenu kiselinu, glavni nusprodukt tijekom proizvodnje etanola pomoću kvasca. Stvara se kao odgovor na potrebu za ostvarivanje ravnoteže oksidacije citosolnog koenzima NADH. Naime, kada oksidacija NADH u respiratornom lancu nije moguća (tijekom uzgoja je prisutno malo kisika), dolazi do nakupljanja reduciranog oblika koenzima i glicerola. Proizvodnja glicerola pomoću mikroorganizama nema značajnu upotrebu u industrijskoj biotehnologiji, ali se smatra jednim od glavnih metabolita koji služi kao izvor ugljika i energije za stanicu.

Etil acetat je lako hlapljiva, polarna molekula koja se koristi kao organsko otapalo. Koristi se za proizvodnju kozmetičkih pripravaka, elektroničkih naprava, a ima i potencijalnu primjenu u proizvodnji biodizela kao akceptor acilne skupine umjesto metanola. Trenutno se etil acetat proizvodi u petrokemijskoj industriji, ali se može proizvesti i biotehnološkim putem uzgojem kvasaca. *K. marxianus* se smatra jednim od najučinkovitijih proizvođača etil acetata (Pentjuss i sur., 2017).

Trenutno se kvasac *K. marxianus* u industriji najviše koristi za proizvodnju enzima kao što su inulinaza, β -galaktozidaza i pektinaza. Velika brzina rasta i lakoća rada s kvascem, čine ga boljim kandidatom za proizvodnju enzima nego što su to plijesni. Proizvodnja inulinaze je izrazito zanimljiva budući da nije zastupljena u velikom broju drugih kvasaca ili plijesni. Enzim β -galaktozidaza ključan je za razgradnju laktoze koja se nalazi u otpadu industrije proizvodnje sira. Sirutka je štetan nusprodukt koji predstavlja jeftinu sirovinu za proizvodnju etanola i biomase s pomoću kvasca *K. marxianus*. Tako dobivena biomasa može se koristiti kao stočna hrana ili kao kvašćev ekstrakt u prehrambenoj industriji (Lane i Morrissey, 2010).



Slika 2. Prikaz stanice i pripadajućih reakcija u metabolizmu kvasca *K. marxianus* (prema Zhang i sur., 2020). Kratice: HXT, transportni sustav za heksoze; HXK, heksokinaza; XR, ksiloza reduktaza, XDH, ksiloza dehidrogenaza; XK, ksiluloza kinaza; PPP, put pentoza fosfata; GLK, glukoza kinaza; PGI, fosfogluco izomeraza; TPI, triozafosfat izomeraza; ZWF1, glukoza-6-fosfat-1 dehidrogenaza; GND1, 6-fosfogluconat dehidrogenaza; TCA, ciklus linumske kiseline; ADH, alkohol dehidrogenaza; GPD1, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza; GPP1, glicerol-3-fosfataza; FPS1, transportni sustav za glicerol.

2.4. PROIZVODNJA BIOETANOLA

Među svim postupcima za proizvodnju bioetanol iz lignoceluloznih sirovina, simultana saharifikacija i fermentacija (SSF) pokazala se kao najbolja opcija (Tomás-Pejó i sur., 2009). Bioprocesi u kojima se simultano provodi saharifikacija i fermentacija, u jednom bioreaktoru, imaju veliki potencijal za industrijsku primjenu jer se izbjegava pojava inhibicije supstratom (ili drugim sastojcima hidrolizata sirovine). Ovakvim načinom provedbe bioprocasa smanjeni su rizici od kontaminacija te je moguće postići više prinose etanola jer se jednostavni šećeri ne akumuliraju već izravno fermentiraju (McIntosh i sur., 2017). Nadalje, postoje i druge prednosti poput uštede energije smanjenjem troškova hlađenja, veći prinosi saharifikacije, značajno smanjeni rizik od kontaminacije i mogućnost kontinuiranog uklanjanja etanola (Tomás-Pejó i sur., 2009). Osnovni nedostatak ovog postupka proizvodnje su različiti optimalni uvjeti za enzimsku hidrolizu supstrata i alkoholnu fermentaciju (Rezić i sur., 2016). Dok saharifikacija ima optimalnu temperaturu oko 50 °C, većina fermentirajućih kvasca ima optimalnu temperaturu u rasponu od 30 do 37 °C. Stoga bi bilo povoljno koristiti termotolerantni mikroorganizam kao što je *Kluyveromyces marxianus*, koji može rasti i provoditi fermentaciju s dobrim prinosima na temperaturama iznad 40 °C (Tomás-Pejó i sur., 2009).

Bioreaktor za proizvodnju etanola najčešće se koristi u šaržnom načinu rada ili šaržnom s pritokom supstrata. Šaržni ugoj s pritokom supstrata provodi se tako da se supstrat dodaje povremeno tijekom fermentacije i jedna je od metoda koja se najviše koristi u industriji. Prema podacima iz literature, najbolje je provoditi šaržni uzgoj s pritokom supstrata jer je tada učinkovitost proizvodnje etanola, u smislu koncentracije etanola i prinosa proizvoda, najveća. Poboljšana učinkovitost proizvodnje etanola postiže se kontroliranjem različitih parametara tijekom uzgoja, među kojima su najvažniji temperatura, pH i koncentracija supstrata (Hadiyanto i sur., 2014). Uz to, pokazalo se da je šaržni uzgoj s pritokom supstrata najbolja opcija i kada se etanol proizvodi iz različitih sirovina kao što su kukuruzni ostaci, slatki sirak, smreka i ostatak dobiven nakon recikliranja papira. Frakcija ostataka netopljivih u vodi i cijela kaša dobivena nakon predobrade koriste se kao supstrat za SSF postupak (Tomás-Pejó i sur., 2009).

2.4.1. Bioetanol kao biogorivo

Neobnovljiva goriva glavni su izvor transporta i energetskog sektora. Koriste se u iznosu od 60 % svjetske potrošnje prilikom čega dolazi do znatne emisije ugljikovog monoksida (CO) i ugljikovog dioksida (CO₂) (Demiray i sur., 2020). Bioetanol kao biogorivo je obnovljiv i ekološki neškodljiv te se zbog toga smatra obećavajućom alternativom za naftna goriva (Yuan i sur., 2008). Bioetanol proizveden fermentacijom sirovina na bazi šećera, poput kukuruza, pšenice ili šećerne repe, poznat je kao prva generacija bioetanola, dok je bioetanol proizveden hidrolizom lignoceluloze u biljnoj biomasi poznat kao druga generacija bioetanola (Demiray i sur., 2020). Trenutno, najkorištenije sirovine za proizvodnju etanola su žitarice poput kukuruza i pšenice što je nepovoljno zbog njihove bitne uloge u prehrani stanovništva, kao i nemogućnosti uzgoja dovoljne količine zbog smanjivanja obradive površine uslijed brze industrijalizacije

Lignoceluloza je jedna od slabo iskorištenih sirovina na Zemlji, a njena niska cijena i dostupnost čine je privlačnom sirovinom za proizvodnju obnovljive energije. Zadnjih godina je sve više istraživanja usmjereno na proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina zbog visoke cijene nafte. Najveći problemi koji se moraju prevladati prilikom takve proizvodnje su: predobrada sirovine, proizvodnja enzima (celulaza) te hidroliza i fermentacija šećera (Yuan i sur., 2008).

Iako je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* još uvijek glavna vrsta za proizvodnju bioetanola, istraživanja su usmjerena na različite mikroorganizme koji proizvode bioetanol. Po svim, do sada navedenim značajkama, *K. marxianus* je povoljan kandidat za proizvodnju bioetanola (Demiray i sur., 2020).

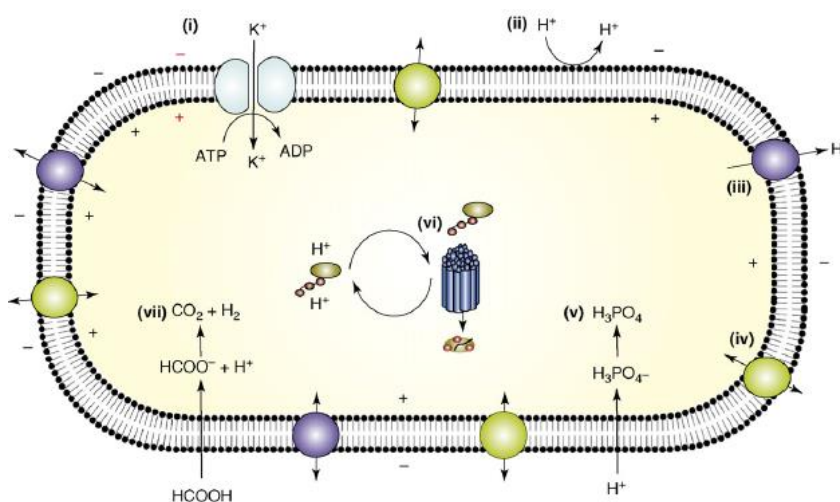
2.5. TERMOTOLERANTNOST

Optimalna temperatura rasta za većinu kvasaca, kreće se između 25 i 35 °C što kvasce svrstava u mezofilne mikroorganizme (Techaparin i sur., 2017; Türker, 2014). Prema Boyleu i sur. (1997), *K. marxianus* može rasti na temperaturama između 45 – 52 °C i proizvoditi etanol na temperaturama između 45 – 50 °C. Prednosti proizvodnje etanola pri višim temperaturama u industrijskom mjerilu uključuju smanjeni rizik od kontaminacije i olakšan postupak hlađenja kako bi se temperatura zadržala između 25 – 35 °C.

Termotolerancija kvasca *K. marxianus* zanimljiva je osobina koja se istražuje u proizvodnji etanola, jer je uklanjanje proizvoda lakše na višim temperaturama. U tom slučaju, osim što može pojednostaviti proces izolacije i pročišćavanja proizvoda, problem s inhibicijom proizvoda mogao bi se smanjiti smanjenjem koncentracije alkohola u podlozi (Tavares i sur., 2019). Hong i sur. (2007) uzgajali su kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na različitim temperaturama pri čemu je uočen rast i proizvodnja etanola na temperaturi od 45 °C (Yanase i sur., 2010). Iako kvasci mogu rasti na povišenim temperaturama, iznad 40 °C, optimalna temperatura za proizvodnju etanola kreće se oko 30 °C (Techaparin i sur., 2017).

2.6. MEHANIZAM PREŽIVLJAVANJA NA NISKIM pH VRIJEDNOSTIMA

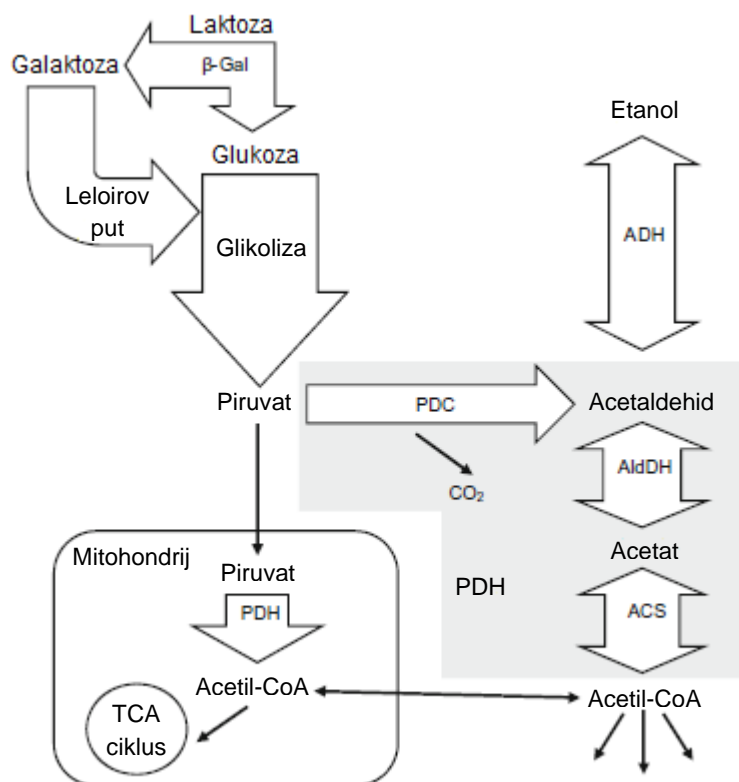
Kako bi preživjeli kisele uvjete, acidofili su razvili poseban mehanizam održavanja unutarstanične pH vrijednosti neutralnom što znači da se na staničnoj membrani stvara gradijent pH vrijednosti od nekoliko jedinica. Nastali gradijent može se, teoretski, koristiti za proizvodnju velikog broja molekula ATP, no nekontrolirani unos protona u citoplazmu poremetio bi normalnu funkciju proteina i nukleinskih kiselina zbog prebrzog zakiseljavanja citoplazme što bi u konačnici dovelo do stanične smrti. Kako bi se spriječili poremećaji intracelularnih procesa kao što su transkripcija, translacija i aktivnost enzima, mora postojati mehanizam kojim se održava ravnoteža transporta protona. Kod acidofila se pretpostavlja postojanje mehanizma koji uključuje staničnu membranu nepropusnu za protone, reverzni membranski potencijal i puferski kapacitet citoplazme (slika 3; Baker-Austin i Dopson, 2007).



Slika 3. Procesi uključeni u održavanje pH homeostaze kod acidofila (Baker-Austin i Dopson, 2007)

Slabe organske kiseline inhibiraju rast i metabolizam stanica, čineći tako biokonverziju manje učinkovitom. Glavni mehanizam toksičnosti slabih kiselina temelji se na unutarstaničnom zakiseljavanju i nakupljanju aniona. Kad je srednja vrijednost pH niža nego pKa dane kiseline, nastajanje molekula nedisocirane kiseline u prednosti je nad disocijacijom kiseline na anione i protone. Nenabijene molekule kiseline mogu prolaziti kroz plazmu membrane lakše od ionskih oblika istih kiselina. Kako je pH citosola viši od vrijednosti pKa većine karboksilnih kiselina, molekule koje su ušle u stanicu disociraju na ione. Ti su ioni tada zarobljeni u stanicama zbog svog naboja. Disocijacija molekula kiseline pomiče gradijent koncentracije nedisocirane kiseline, što dodatno olakšava unos molekula kiseline. Kao rezultat dolazi do zakiseljavanja citosola i povećanja koncentracije aniona kiseline što dovodi do inhibicije različitih metaboličkih procesa. pKa octene kiseline i njenih soli je 4,76. Takve vrijednosti pH mogu se pojaviti u biotehnološkim procesima u kojima se stanice kvasca izlažu riziku stresa uzrokovanog slabim kiselinama zbog prekomjernog unosa acetata.

Svako nakupljanje acetata i drugih organskih kiselina može također biti rezultat drugih metaboličkih procesa. U kvascima, octena kiselina se sintetizira iz acetaldehida djelovanjem enzima piruvat dehidrogenaze (PDH). *Crabtree* negativni mikroorganizmi (uključujući *K. marxianus*) proizvode acetat kao rezultat nepotpune oksidacije supstrata. Kako kvasci dijele zajednički središnji metabolizam ugljika, upotrijebljene su dosadašnje spoznaje na području metabolizma filogenetski bliskih kvasaca, *K. lactis* i *S. cerevisiae*, za izgradnju metaboličke mreže kvasca *K. marxianus* (slika 4). Zbog povećane aktivnosti enzima PDH tijekom limitacije kisikom, očekuje se neželjeno nakupljanje acetata, npr. tijekom proizvodnje etanola ili pri visokim koncentracijama biomase, gdje je teško opskrbiti i distribuirati dovoljno kisika za sve stanice u bioreaktoru. U skladu s navedenim, tijekom fermentacije uz niski stupanj aeracije s *K. marxianus* dolazi do nakupljanja acetata što se podudara sa smanjenom stopom rasta i proizvodnje etanola. Do sada provedena istraživanja na kvascu *K. marxianus* bila su usredotočena na njegovu primjenu u biotehnološkim procesima, dok se manje pažnje pridavalo istraživanju fiziologije. Zapravo se vrlo malo zna o njegovim reakcijama na stres i mehanizmima prilagodbe induciranim octenom kiselinom (Martynova i sur., 2016a).



Slika 4. Shematski prikaz metabolizma acetata i laktata u kvascu *K. marxianus* (prema Martynova i sur., 2016a). Kratice: β -Gal, beta-galaktozidaza; PDH, piruvat dehidrogenaza; ADH, alkohol dehidrogenaza; AldDH, aldehyd dehidrogenaza; ACS, acetil-CoA sintetaza

2.7. GENETIČKE MODIFIKACIJE KVASCA *Kluyveromyces marxianus*

Proizvodnja i razgradnja etanola, u skoro svim organizmima, rezultat je aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* identificirano je sedam gena koji kodiraju enzim alkohol dehidrogenazu (ScADH1-7) pri čemu svaki od njih ima različitu ulogu u proizvodnji etanola. U kvascu *Kluyveromyces lactis* identificirana su četiri gena koji kodiraju enzim alkohol dehidrogenazu (KlAdh1-4) pri čemu su dva enzima citosolna, a dva mitohondrijska (Lertwattanasakul i sur., 2007).

K. marxianus se trenutno istražuje kao alternativa kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u proizvodnji etanola budući da je jednostavan domaćin za genetsku modifikaciju (Lertwattanasakul i sur., 2007; Matsuzaki i sur., 2012). Prinosi etanola koje daje većina sojeva kvasca *K. marxianus* su niži od 60 g L^{-1} kada je koncentracija glukoze 150 g L^{-1} prilikom

šaržnog uzgoja na 40 °C. Stoga je neophodno konstruirati soj kvasca *K. marxianus* koji može proizvesti veliku količinu etanola za uspješnu implementaciju u industrijskoj proizvodnji (Pang i sur., 2010). Kako bi se to postiglo, nužno je bolje poznavanje fiziologije enzima alkohol dehidrogenaza koje bi također doprinijelo boljem razumijevanju cjelokupnog metabolizma kvasca (Lertwattanasakul i sur., 2007). Uz to, *K. marxianus* sadrži gene koji kodiraju enzime potrebne za metabolizam ksiloze. Međutim, sojevi *K. marxianus* ne mogu pretvoriti ksilozu u etanol. Stoga je insercija gena koji kodiraju enzime za konverziju ksiloze u etanol nužna kako bi se kvasac mogao koristiti u industrijskoj proizvodnji bioetanola (Goshima i sur., 2013).

Iako je kvasac *K. marxianus* dobar proizvođač enzima, mnoga istraživanja usmjerena su na konstrukciju rekombinantnih sojeva koji proizvode dodatne enzime u značajnijim količinama, među kojima su najzanimljiviji enzimi uključeni u hidrolizu celuloze (Lane i Morrissey, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam u ovom radu korišten je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 iz zbirke organizama NBRC Culture Collection (NBRC, Japan), a izoliran je iz tla u Japanu.

3.1.2. Kemikalije

Popis, čistoća i podrijetlo kemikalija koje su korištene u radu nalazi se u tablici 1.

Tablica 1. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Merk, Njemačka
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merk, Njemačka
agar	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
glukoza monohidrat	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov sulfat 7-hidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
sumporna kislina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka

3.1.3. Hranjive podloge

Čista kultura kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 održavana je na čvrstim YPD hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma i za provedene uzgoje bila je YPD tekuća podloga. Sastav korištenih podloga prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Sastav tekuće i čvrste YPD podloge

Komponenta podloge	Tekuća YPD podloga	Čvrsta YPD podloga
glukoza (g L^{-1})	20	20
kvašćev ekstrakt (g L^{-1})	10	10
pepton (g L^{-1})	20	20
agar (g L^{-1})	-	20

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Bioreaktor s miješalom

Uzgoj se provodio u bioreaktoru s mješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) korisnog volumena 2 L (slika 5). Bioreaktor je opremljen pH elektrodom te pripadajućim sustavom za regulaciju pH, sustavom za izuzimanje uzoraka, temperaturnom sondom te sustavom za prepumpavanje podloge i inokulaciju. Grijanje i hlađenje podloge u reaktoru provodi se cirkuliranjem vode kroz plašt. Sterilizacija se provodi u autoklavu pri 120 °C i tijekom 20 min.



Slika 5. Bioreaktor s mješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) (vlastita fotografija)

3.1.4.2. Spektrofotometar

Za određivanje optičke gustoće ($\lambda = 600 \text{ nm}$) uzoraka izuzetih tijekom uzgoja korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Optička gustoća uzoraka određena je u staklenim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

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

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), sastoji se od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL , a protok mobilne faze (0,0025 M H₂SO₄) 0,6 mL min⁻¹.

3.1.4.4. Brojač stanica

Za određivanje ukupnog broja stanica te udjela živih i mrtvih stanica u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja korišten je automatski brojač stanica CellDrop FL (DeNovix, Wilmington, SAD). Za određivanje broja stanica kvasca bilo je potrebno uzorak pomiješati s bojom Trypan Blue CD-0.25 (DeNovix, Wilmington, SAD). Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL .

3.1.4.5. Ostala oprema

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija)
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)

- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20 μm , 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Čvrste hranjive podloge pripravljene su tako što se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana masa glukoze (20 g L⁻¹; Sigma-Aldrich, SAD), peptona (20 g L⁻¹; Merk, Njemačka), kvašćevog ekstrakta (10 g L⁻¹; Merk, Njemačka) i agara (20 g L⁻¹; Liofilchem, Italija). Hranjiva podloga se zatim sterilizirala u autoklavu (121 °C/20 minuta) i izlivala u Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima. Na ohlađenu hranjivu podlogu nacijepnjene su kulture kvasca pomoću mikrobiološke ušice.

Podloge za uzgoj inokuluma za propagaciju pripravljene su tako da se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana masa glukoze (20 g L⁻¹; Sigma-Aldrich, SAD), peptona (20 g L⁻¹; Merk, Njemačka) i kvašćevog ekstrakta (10 g L⁻¹; Merk, Njemačka). Po 10 mL podloge prebačeno je u epruvete i sterilizirano u autoklavu (121 °C/20 min).

Za uzgoj inokuluma korištena je YPD podloga. Podloga se priprema tako da se u 250 mL demineralizirane vode doda izračunata masa glukoze (20 g L⁻¹; Sigma-Aldrich, SAD), peptona (20 g L⁻¹; Merk, Njemačka) i kvašćevog ekstrakta (10 g L⁻¹; Merk, Njemačka). Pripravljene podloge steriliziraju se u autoklavu (121 °C/20 min) i služe za uzgoj inokuluma za uzgoje u većem mjerilu. Inokulum se uzgaja preko noći na tresilici pri temperaturi od 25 °C.

Za uzgoj kvasca korištena je YPD podloga. Podloga se pripremila tako da se u 1500 mL demineralizirane vode dodala izračunata masa glukoze (20 g L⁻¹; Sigma-Aldrich, SAD), peptona (20 g L⁻¹; Merk, Njemačka) i kvašćevog ekstrakta (10 g L⁻¹; Merk, Njemačka). Tako pripravljena podloga sterilizirala se u autoklavu (121 °C/20 min) i nakon toga pumpom prebacila u bioreaktor.

3.2.2. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Tekuća YPD podloga ($V = 1500$ mL; pripremljena kao što je opisano u poglavlju 3.2.1) u bioreaktoru inokulirana je s 5 % (vol/vol) inokuluma uzgojenog preko noći kada se provodio uzgoj u svrhu određivanja optimalne pH vrijednosti za rast i proizvodnju etanola pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. Uzgoj je proveden u anaerobnim uvjetima pri različitim pH vrijednostima (5, 4, 3 i 2 jedinice). Prilikom provedbe uzgoja čija je svrha bila odrediti optimalnu koncentraciju inokuluma za rast i proizvodnju etanola pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, priprema podloge provodila se na isti način kao što je to prethodno opisano, a pH vrijednost podloge iznosila je 5 jedinica. Inokulacija se vršila s 2,5 i 10 % (vol/vol) inokuluma uzgojenog preko noći.

Uzorci za analizu uzimani su u redovitim vremenskim intervalima. U izuzetim uzorcima određivana je optička gustoća pri 600 nm (poglavlje 3.3.1.), koncentracija biomase kvasca (poglavlje 3.3.2.), koncentracija supstrata i produkata fermentacije UPLC analizom (poglavlje 3.3.3.) te udio živih i mrtvih stanica (poglavlje 3.3.4.). Iz određenih vrijednosti izračunati su neki parametri bioprocesa (poglavlje 3.4.).

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka

Optička gustoća uzoraka određivana je pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}). Mjerena je optička gustoća originalnog uzorka i prvog decimalnog razrjeđenja.

3.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kvasca

Nakon izuzimanja uzorka, 10 mL preneseno je u prethodno izvaganu plastičnu kivetu te je zatim centrifugirano 10 minuta pri 6000 okretaja min^{-1} (centrifuga SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen, a talog je stavljen na sušenje pri 50 °C do konstantne mase. Nakon toga kivete su ohlađene u eksikatoru te im je izvagana masa. Koncentracije biomase kvasca, γ_x (g L^{-1}), određena je prema sljedećoj ovisnosti:

$$\gamma_X = \frac{m_{kb} - m_k}{V_{uz}} \quad [g L^{-1}] \quad [3-1]$$

gdje je

m_{kb} - masa kivete s biomasom [g]

m_k - masa prazne kivete [g]

V_{uz} - volumen uzorka [L]

3.3.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata fermentacije UPLC metodom

Koncentracije supstrata (glukoza) i produkata fermentacije (etanol, glicerol, octena kiselina) određivane su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC; poglavlje 3.1.4.2.). Uzorci za UPLC analizu pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.3.3.1. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa OpenLAB CDS, a nepoznate koncentracije detektiranih spojeva u uzorcima određene su prema jednadžbama baždarnih dijagrama (tablica 3).

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Etanol	11,1000 ± 0,0000	$A = 361299,75 \gamma_{\text{Etanol}} + 27468,6$	1,0000
Glicerol	7,0067 ± 0,0007	$A = 120817 \gamma_{\text{Glicerol}} - 3671,6$	0,9997
Glukoza	4,7000 ± 0,0000	$A = 132342 \gamma_{\text{Glukoza}} + 1503,7$	0,9999
Octena kiselina	7,7924 ± 0,0045	$A = 8664,6 \gamma_{\text{Octena kiselina}} - 67,234$	0,9992

A= površina

3.3.3.1. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (poglavlje 3.3.2.) korišten je za pripremu uzoraka za UPLC analizu. Po 750 μL supernatanta uzorka dodano je u 750 μL otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g L^{-1} . Dobivena otopina zatim se intenzivno izmiješala 20 sekundi i ostavila na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000 o min^{-1} . Centrifugiranjem su istaloženi proteini i nečistoće. Uzorci su zatim profiltrirani kroz filter s porama veličine 0,20 μm . Tako pripremljeni uzorci korišteni su za UPLC analizu.

3.3.4. Određivanje udjela živih i mrtvih stanica

Ukupan broj stanica te udio živih i mrtvih stanica određen je pomoću automatskog brojača stanica (poglavlje 3.1.4.3.). Uzorci za analizu pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.3.4.1.

3.3.4.1. Priprema uzoraka za određivanje broja stanica

Iz uzorka izuzetog tijekom uzgoja pripravljeno je prvo decimalno razrjeđenje tako da se 1 mL uzorka prebacio u 9 mL sterilne vode. Dobiveni uzorak se zatim intenzivno izmiješao te se pripravilo drugo decimalno razrjeđenje tako da se 500 μL uzorka pomiješalo s 500 μL destilirane vode. Tako dobiveni uzorak intenzivno se izmiješao te se 5 μL uzorka pomiješalo s 5 μL boje Trypan blue. Cijeli volumen pripremljenog uzorka prebacio se automatskom pipetom u za to predviđen prostor u uređaju za određivanje broja stanica.

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

3.4.1. Prinos biomase (Y_X)

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

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

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

3.4.2. Prinos produkta (Y_P)

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

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

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

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

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

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 ($Y_{P/S}$)

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

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})

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

3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_p)

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

gdje P može bit etanol (EtOH) ili glicerol

3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)

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

3.4.8. Produktivnost (Pr)

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

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

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

t_U - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja utjecaj količine inokuluma na potrošnju supstrata, rast biomase i prinose produkata, kao i određivanje optimalne pH vrijednosti na rast i prinose produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. Uzgoji su provedeni u bioreктору s miješalom u standardnoj YPD (eng. yeast extract, peptone, dextrose) podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika korištena glukoza u koncentraciji od 20 g L⁻¹. Kako bi se odredio utjecaj samo jednog parametra bioprocasa, ostali parametri održavali su se konstantnima. Praćenje procesnih parametara prikazano je grafički (prilog 7.4). U prethodnim istraživanjima utvrđena je optimalna temperatura T = 30 °C za uzgoj ovog kvasca, stoga je ona korištena prilikom svih uzgoja. Za poticanje fermentativnog metabolizma i određivanje prinosa produkata održavani su anaerobni uvjeti. Mogućnost rasta kvasca na niskim pH vrijednostima utvrđivana je kako bi se kvasac mogao uzgajati na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u kojima je proveden kiselinski predtretman.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja s pripadajućim potpoglavljima:

4.1. UTJECAJ KOLIČINE INOKULUMA NA POTROŠNJU SUPSTRATA, RAST BIOMASE I PRINOSE PRODUKATA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777

4.1.1. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 2,5 % inokuluma

4.1.2. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 5 % inokuluma

4.1.3. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 10 % inokuluma

4.2. UTJECAJ PH VRIJEDNOSTI PODLOGE NA POTROŠNJU SUPSTRATA, RAST BIOMASE I PRINOSE PRODUKATA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777

4.2.1. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 5 jedinica

4.2.2. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 4 jedinice

4.2.3. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 3 jedinice

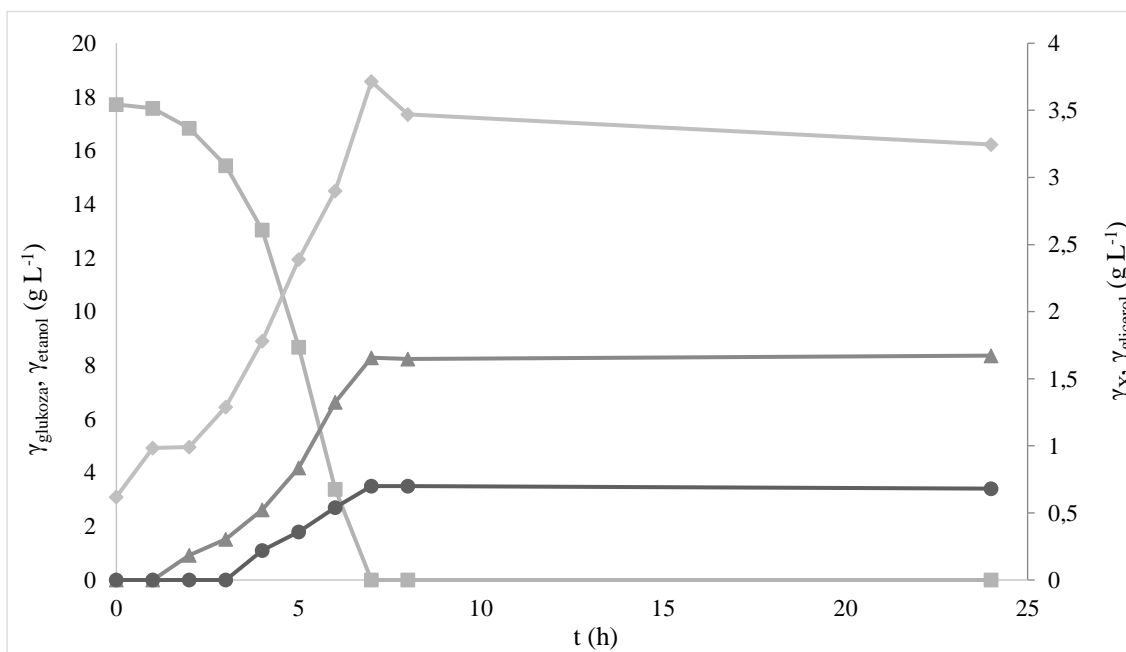
4.2.4. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 2 jedinice

4.1. UTJECAJ KOLIČINE INOKULUMA NA POTROŠNJU SUPSTRATA, RAST BIOMASE I PRINOS PRODUKATA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777

Koncentracija inokuluma uvelike utječe na brzinu fermentacije kao i na proizvodnju produkata metabolizma te različitih enzima. Istraživanja su pokazala kako veća koncentracija inokuluma rezultira većim brzinama fermentacije kojima se dobivaju veći prinosi etanola i glicerola. Također, pri niskim koncentracijama inokuluma proizvodi se manje biomase što povećava rizik od kontaminacije, dok se pri visokim koncentracijama inokuluma proizvodi previše biomase čime se reduciraju nutrijenti potrebni za proizvodnju produkata metabolizma (Karim i sur., 2020; Carrau i sur., 2010).

4.1.1. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 2,5 % inokuluma

Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 proveden je u bioreaktoru s miješalom u YPD podlozi pri temperaturi od 30 °C, pH vrijednosti od 5 jedinica i anaerobnim uvjetima. Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće podloge pri 600 nm (OD_{600} , vidi prilog 7.2.), koncentracija suhe tvari biomase (poglavlje 3.3.2.), koncentracije glukoze i produkata fermentacije (etanola, glicerola i octene kiseline) (poglavlje 3.3.3.). Slika 6 prikazuje promjenu koncentracije glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom navedenog uzgoja kvasca.



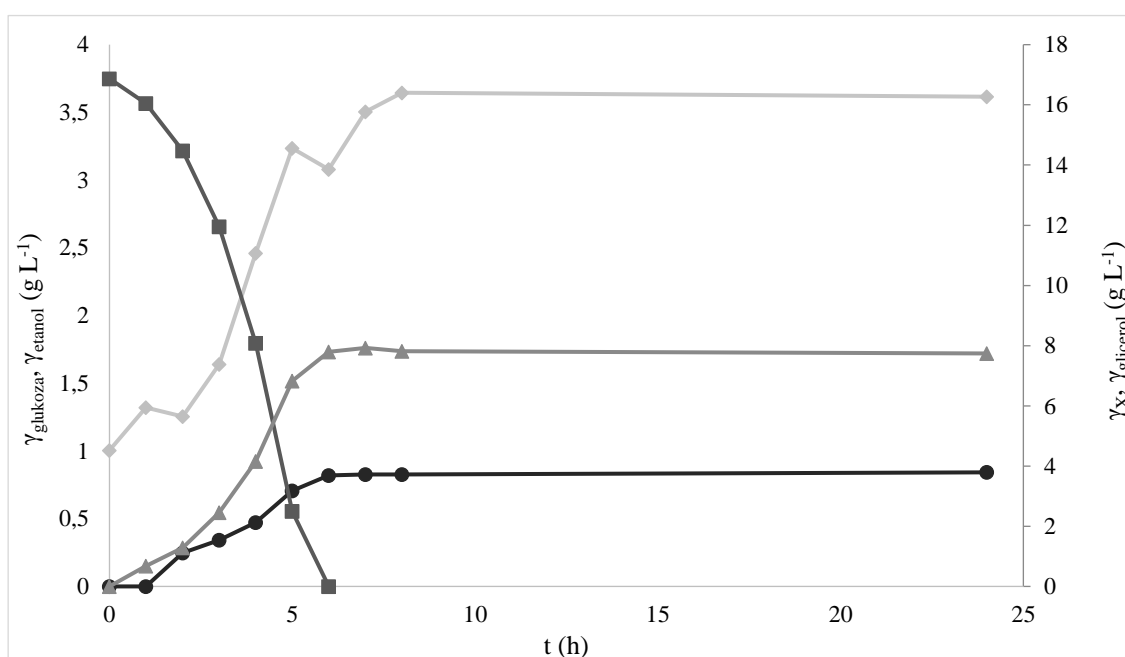
Slika 6. Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (◆), etanola (▲) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 2,5 % (vol/vol)

Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 2,5 %, može se uočiti da vrijeme trajanja faze prilagodbe $t_{lag} = 1$ h, dok je vrijeme trajanja eksponencijalne faze oko 6 h (slika 6). Maksimalna brzina rasta pritom iznosi $\mu_{maks} = 0,43$ h⁻¹. Bioproces proizvodnje etanola s pomoću ovog kvasca praćen je tijekom 24 h, unutar kojih je kvasac proizveo 8,28 g L⁻¹ etanola što je ujedno najveći postignuti prinos u odnosu na preostala dva uzgoja s većim koncentracijama inokuluma. Koeficijent konverzije glukoze u etanol iznosi 0,47 g g⁻¹, a produktivnost 1,10 g_{EtOH} L⁻¹ h⁻¹ (tablica 4). Koeficijent konverzije glukoze u glicerol ($Y_{glicerol/glukoza} = 0,03$ g g⁻¹), prinos ($Y_{glicerol} = 0,7$ g L⁻¹) i produktivnost glicerola ($Pr_{glicerol} = 0,09$ g L⁻¹ h⁻¹; slika 6, tablica 4) najniži su prilikom uzgoja s koncentracijom biomase od 2,5 % (tablica 4).

Rocha i sur. (2011) proveli su uzgoj kvasca *K. marxianus* u svrhu proizvodnje etanola. Prilikom tog uzgoja koristili su koncentraciju inokuluma od 2 % (vol/vol). Najveća dobivena koncentracija etanola iznosila je 6,37 g L⁻¹, a koeficijent konverzije glukoze u etanol iznosio je 0,27 g g⁻¹. Kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 proizveo je oko 40 % više etanola i čak 70% veću koeficijent konverzije glukoze u etanol od *K. marxianus* soja korištenog u radu Rocha i sur. (2011).

4.1.2. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 5 % inokuluma

Proveden je i uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 5 % u istim uvjetima ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH vrijednost od 5 jedinica, anaerobno). Kao i prilikom prethodnog uzgoja, praćena je promjena glukoze, biomase i produkata fermentacije (etanola i glicerola). Iz dobivenih rezultata izračunati su osnovni biokinetički parametri (tablica 4).



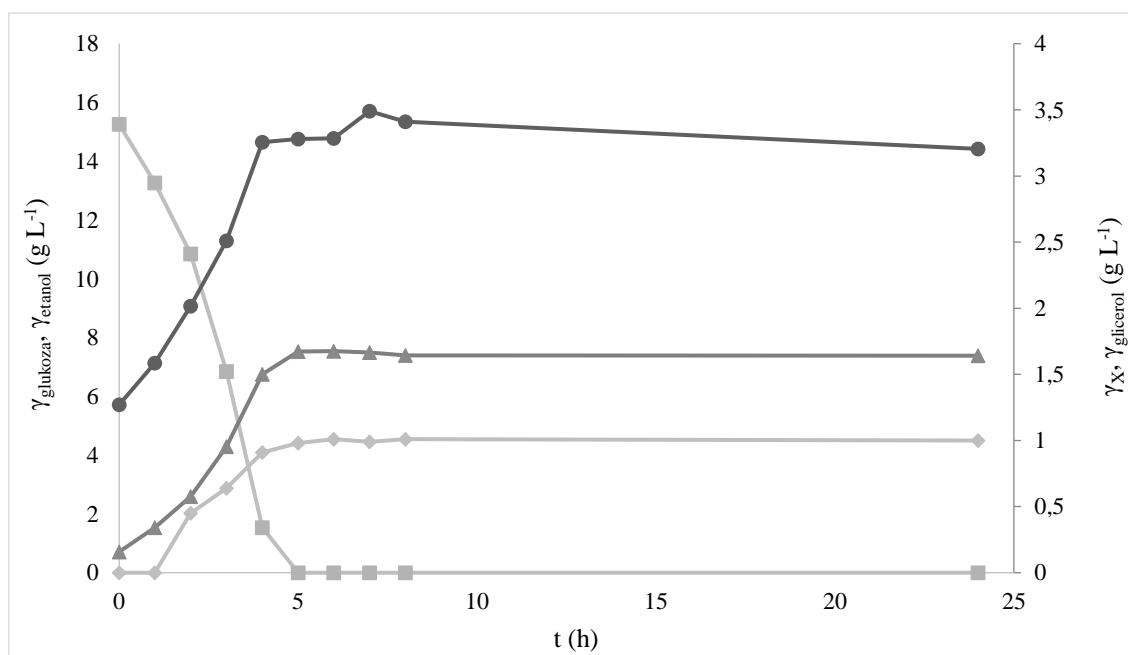
Slika 7. Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (◆), etanola (▲) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 5 % (vol/vol)

Prilikom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 5 %, utvrđeno je vrijeme trajanja faze prilagodbe oko 1 h, dok je vrijeme trajanja eksponencijalne faze oko 5 h (slika 7). Maksimalna brzina rasta pritom iznosi $\mu_{\text{maks}} = 0,31\text{ h}^{-1}$. Vrijeme trajanja bioprocasa iznosilo je 24 h, tijekom kojih je kvasac proizveo $7,80\text{ g L}^{-1}$ etanola s koeficijentom konverzije glukoze u etanol od $0,46\text{ g g}^{-1}$ te produktivnosti od $1,30\text{ g}_{\text{EtOH}}\text{ L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ (tablica 4). Osim etanola, zbilježena je i proizvodnja glicerola tijekom navedenog uzgoja prilikom čega je postignuta najveća vrijednost koeficijenta konverzije glukoze u glicerol $Y_{\text{glicerol}/\text{glukoza}} = 0,15\text{ g g}^{-1}$. Udio živih stanica u ukupnom broju stanica pokazuje kako je ova koncentracija inokuluma optimalna vrijednost za uzgoj (prilog 7.3.).

Wu i sur. (2016) proveli su istraživanje utjecaja koncentracije inokuluma na proizvodnju produkata metabolizma pomoću kvasca *K. marxianus* K21. Proveden je uzgoj s 5 % inokuluma pri čemu je uočena najveća produktivnost proizvodnje etanola ($Pr = 2,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) te maksimalni prinos etanola od $44,06 \text{ g L}^{-1}$.

4.1.3. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 10 % inokuluma

Za usporedbu utjecaja koncentracije inokuluma na potrošnju supstrata, rast biomase i prinose produkata, proveden je i uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 10 % s istim uvjetima kao u prethodno provedenim uzgojima ($T=30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH vrijednost od 5 jedinica, anaerobno). Grafički prikaz promjene koncentracije glukoze, biomase i produkata fermentacije (etanola i glicerola) dan je na slici 8. Iz dobivenih rezultata izračunati su osnovni biokinetički parametri (tablica 4).



Slika 8. Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (◆), etanola (▲) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 10 % (vol/vol)

Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi s koncentracijom inokuluma od 10 %, može se uočiti kako kvasac nema fazu prilagodbe, a vrijeme trajanja eksponencijalne faze iznosi oko 4 h (slika 8). Maksimalna brzina rasta pritom iznosi $\mu_{\text{maks}} = 0,24 \text{ h}^{-1}$, što je najniža zabilježena brzina rasta u odnosu na prethodna dva uzgoja. Povećanjem koncentracije inokuluma zabilježen je pad prinosa etanola, koji prilikom ovog uzgoja ima najnižu vrijednost od $7,54 \text{ g L}^{-1}$. Za razliku od etanola, ovaj uzgoj dao je najveći prinos glicerola koji iznosi $0,98 \text{ g L}^{-1}$. Tijekom ovog uzgoja postignute su najveće vrijednosti produktivnosti proizvodnje biomase i produkata metabolizma, $Pr_x = 0,67 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $Pr_{\text{etanol}} = 1,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $Pr_{\text{glicerol}} = 0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (tablica 4).

Ianieva i Podgorsky (2014) provele su istraživanje utjecaja koncentracije inokuluma na metaboliziranje laktoze i proizvodnju etanola. Prilikom uzgoja soja *K. marxianus* s početnom koncentracijom inokuluma od 10 %, za razliku od ovog uzgoja, zabilježeno je povećanje proizvodnje etanola od 73,5 %. Slične rezultate dobili su i Gupte i Nair (2010) kada su uzgajali kvasac *K. marxianus* na sirutki s ciljem proizvodnje etanola. Zabilježena je najveća koncentracija proizvedenog etanola u iznosu od 18 g L^{-1} kada je koncentracija inokuluma iznosila 10 %.

Tablica 4. Utjecaj količine inokuluma na potrošnju supstrata, rast biomase i prinose produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 30 °C, u anaerobnim uvjetima pri pH vrijednosti od 5 jedinica

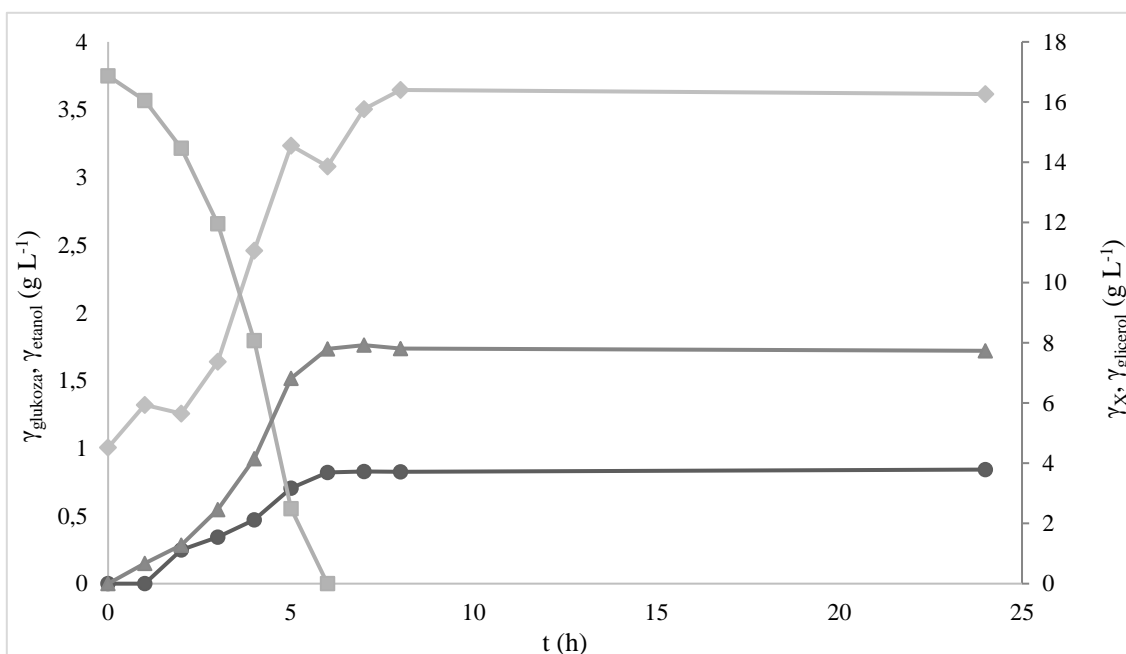
parametar		Udio inokuluma (% vol/vol)		
		2,5	5	10
t_{lag}	[h]	1	1	0
t_{eksp}	[h]	6	5	4
$\gamma_{X_{maks}}$	[g L ⁻¹]	4,03	3,63	3,34
$\gamma_{etanol_{maks}}$	[g L ⁻¹]	8,28	7,80	7,54
$\gamma_{glicerol_{maks}}$	[g L ⁻¹]	0,7	0,84	0,98
$Y_{etanol/glukoza}$	[g g ⁻¹]	0,47	0,46	0,49
Pr_{etanol}	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	1,10	1,30	1,51
$Y_{X/glukoza}$	[g g ⁻¹]	0,13	0,15	0,14
Pr_X	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,39	0,43	0,67
$Y_{glicerol/glukoza}$	[g g ⁻¹]	0,03	0,05	0,06
$Pr_{glicerol}$	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,09	0,14	0,20
μ_{maks}	[h ⁻¹]	0,43	0,33	0,23
$r_{glukoza}$	[h ⁻¹]	0,13	0,22	0,26
r_{etanol}	[h ⁻¹]	0,45	0,40	0,49
$r_{gliceorol}$	[h ⁻¹]	0,33	0,35	0,35

4.2. UTJECAJ pH VRIJEDNOSTI PODLOGE NA POTROŠNJU SUPSTRATA, RAST BIOMASE I PRINOS PRODUKATA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777

4.2.1. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 5 jedinica

Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 proveden je u YPD podlozi koja je sadržavala glukozu (20 g L^{-1}), pepton (20 g L^{-1}) i kvašćev ekstrakt (10 g L^{-1}). Uzgoj je proveden u bioreaktoru s miješalom u anaerobnim uvjetima pri temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i različitim pH vrijednostima. Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće podloge pri 600 nm (OD_{600} , vidi prilog 7.2.), koncentracija suhe tvari biomase (poglavlje 3.3.2.), koncentracije glukoze i produkata fermentacije (etanola, glicerola i octene kiseline) (poglavlje 3.3.3.).

Slika 9 prikazuje promjenu koncentracije glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom s YPD podlogom pri pH vrijednosti od 5 jedinica u anaerobnim uvjetima. Regulacija pH vrijednosti tijekom uzgoja provodila se korištenjem 2 M otopine sumporne kiseline (H_2SO_4) i natrijevog hidroksida (NaOH).



Slika 9. Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (◆), etanola (▲) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 5 jedinica u anaerobnim uvjetima

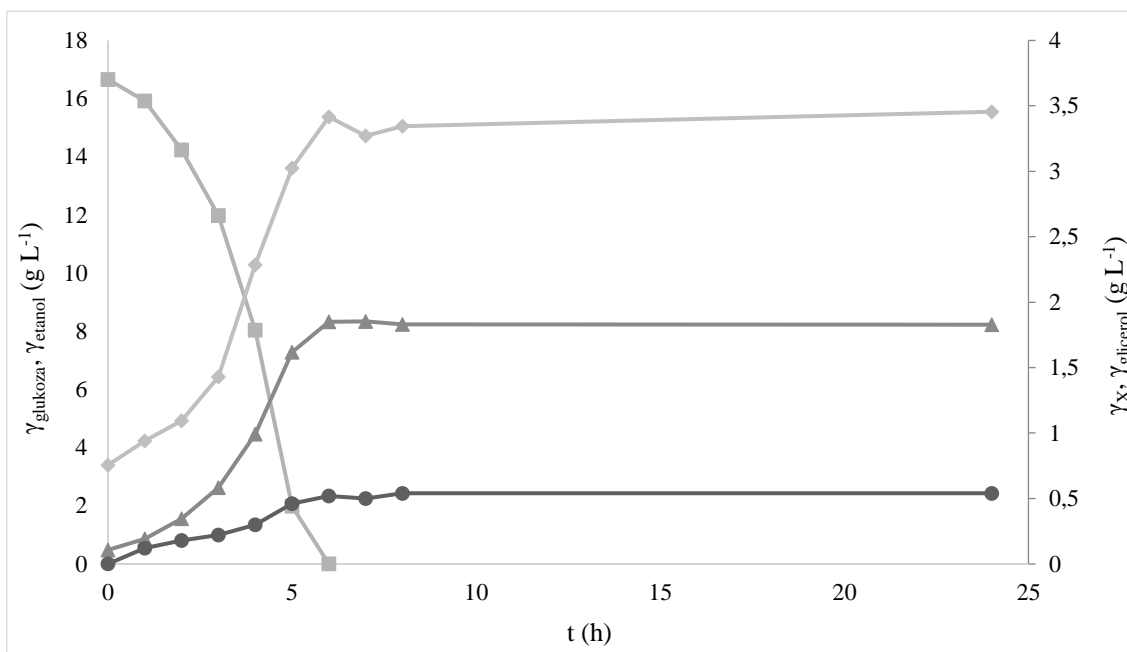
Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 5 jedinica, može se uočiti da kvasac ima relativno kratku fazu prilagodbe $t_{lag} = 1$ h, dok je vrijeme trajanja eksponencijalne faze oko 4 h (slika 9). Specifična brzina rasta pritom iznosi $\mu_{maks} = 0,31 \text{ h}^{-1}$. Bioproces proizvodnje etanola s pomoću ovog kvasca praćen je tijekom 24 h, unutar kojih je kvasac proizveo $7,8 \text{ g L}^{-1}$ etanola uz koeficijent konverzije glukoze u etanol od $0,47 \text{ g g}^{-1}$ te produktivnost od $1,3 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (tablica 5).

Lukondeh i sur. (2005) proveli su uzgoj kvasca *K. marxianus* pri jednakim parametrima uzgoja kao u ovom radu (pH = 5, T = 30 °C) uz koncentraciju 20 g L^{-1} laktoze kao izvora ugljika. Specifična brzina rasta koju su pritom dobili iznosila je $\mu_{maks} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ što je neznatno viša vrijednost u odnosu na vrijednost u ovome radu kada je kvasac uzgajan na glukozi kao izvoru ugljika.

Tijekom svih provedenih uzgoja, proizvodi se glicerol, čiji koeficijent konverzije glukoze u glicerol pri pH vrijednosti od 5 jedinica iznosi $0,05 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost $0,14 \text{ g}_{\text{glicerol}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Vrijednosti koeficijenta konverzije, produktivnosti i prinosa ($\gamma_{\text{glicerol},maks} = 0,84 \text{ g L}^{-1}$; slika 9) glicerola najveći su pri navedenoj pH vrijednosti. Octena kiselina nije detektirana tijekom ovih uzgoja.

4.2.2. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 4 jedinice

Proveden je i uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 4 jedinice u istim uvjetima ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, anaerobno). I tijekom ovog uzgoja praćena je promjena glukoze, biomase i produkata fermentacije (etanola i glicerola). Iz dobivenih rezultata izračunati su osnovni biokinetički parametri (tablica 5).



Slika 10. Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (◆), etanola (▲) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 4 jedinice u anaerobnim uvjetima

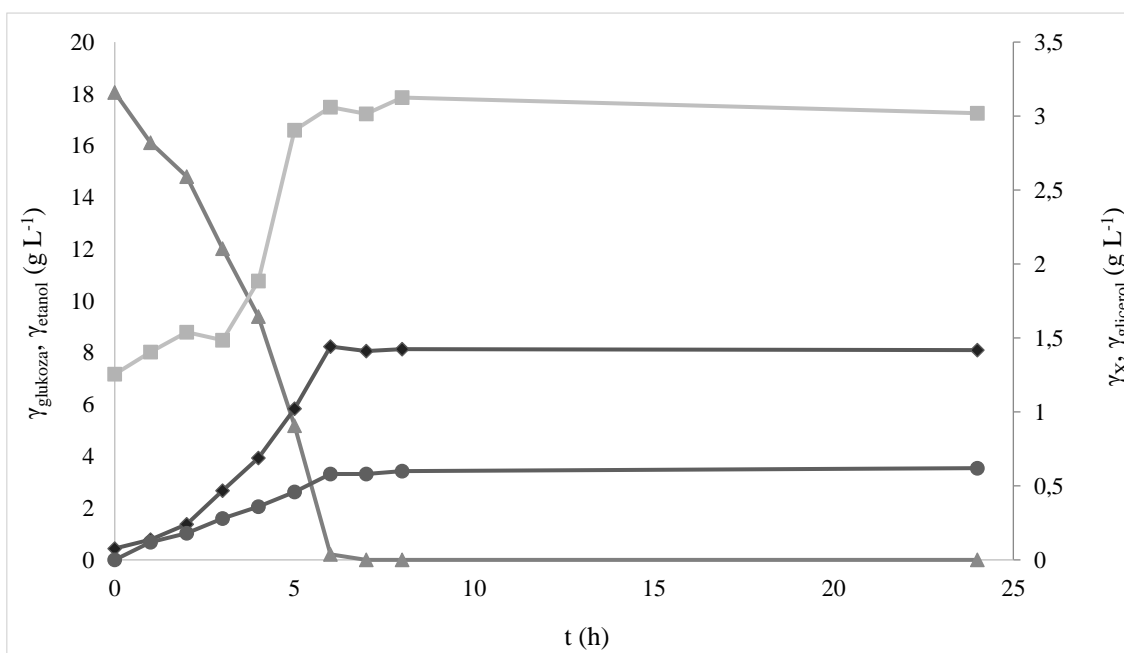
Faza prilagodbe (lag faza) trajala je 1 h dok je trajanje eksponencijalne faze iznosilo 5 h. Specifična brzina rasta postignuta tijekom ovog uzgoja iznosila je $\mu_{\text{maks}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$. Kvasac je unutar 6 sati uzgoja utrošio svu glukozu ($r_{\text{glukoza}} = 0,90 \text{ h}^{-1}$) i pritom proizveo $8,32 \text{ g L}^{-1}$ etanola (slika 10). Koeficijent konverzije glukoze u etanol tijekom uzgoja pri pH vrijednosti od 4 jedinice neznatno je veći u odnosu na prethodno provedeni uzgoj te iznosi $0,50 \text{ g g}^{-1}$ (tablica 5). Vrijednost produktivnosti od $1,51 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ veća je oko 14 % od iste vrijednosti određene tijekom uzgoja pri pH vrijednosti od 5 jedinica. Koeficijent konverzije glukoze u glicerol ($Y_{\text{glicerol/glukoza}} = 0,03 \text{ g g}^{-1}$), prinos ($\gamma_{\text{glicerol}_{\text{maks}}} = 0,52 \text{ g L}^{-1}$) i produktivnost glicerola ($Pr_{\text{glicerol}} = 0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; slika 10, tablica 5) niži su u odnosu na uzgoj pri pH vrijednosti od 5 jedinica (slika 9, tablica 5).

Vivier i sur. (1993) proveli su uzgoj kvasca *K. marxianus* kako bi utvrdili utjecaj određenih fizikalno-kemijskih parametara na rast. Prilikom uzgoja soja IP 513 pri pH vrijednosti od 4 jedinice dobivena je maksimalna brzina rasta (μ_{maks}) od $0,54 \text{ h}^{-1}$ što je otprilike 35 % više od vrijednosti dobivene uzgojem soja u ovome radu.

4.2.3. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 3 jedinice

Korištenje lignoceluloznih obnovljivih sirovina kao što su nusproizvodi poljoprivredne (izluženi rezanci šećerne repe, pšenična slama i kukuruzovina; Koller i sur., 2013) i šumarske industrije, otpadni papir i dr. (Bušić i sur., 2018) za proizvodnju bioetanol i drugih kemikalija ima veliki potencijal. Kako bi se iz kompleksne lignocelulozne sirovine dobili jednostavniji šećeri, koje radni mikroorganizam može metabolizirati, potrebno je navedene sirovine podvrgnuti određenim postupcima predobrade i hidrolize (Amin i sur., 2017). Zbog povoljne cijene anorganskih kiselina, za proces proizvodnje bioetanol najčešće se primjenjuje postupak predobrade razrijeđenim ili koncentriranim kiselinama (uglavnom H_2SO_4) (Rezić i sur., 2016). Hidrolizat tada ima niske pH vrijednosti, stoga je ispitan rast kvasca *K. marxianus* i proizvodnja etanola pri pH vrijednostima od 3 i 2 jedinice.

Slika 11 prikazuje promjenu koncentracije glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 3 jedinice u anaerobnim uvjetima.



Slika 11. Promjena koncentracije glukoze (▲), biomase (■), etanola (◆) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 3 jedinice u anaerobnim uvjetima

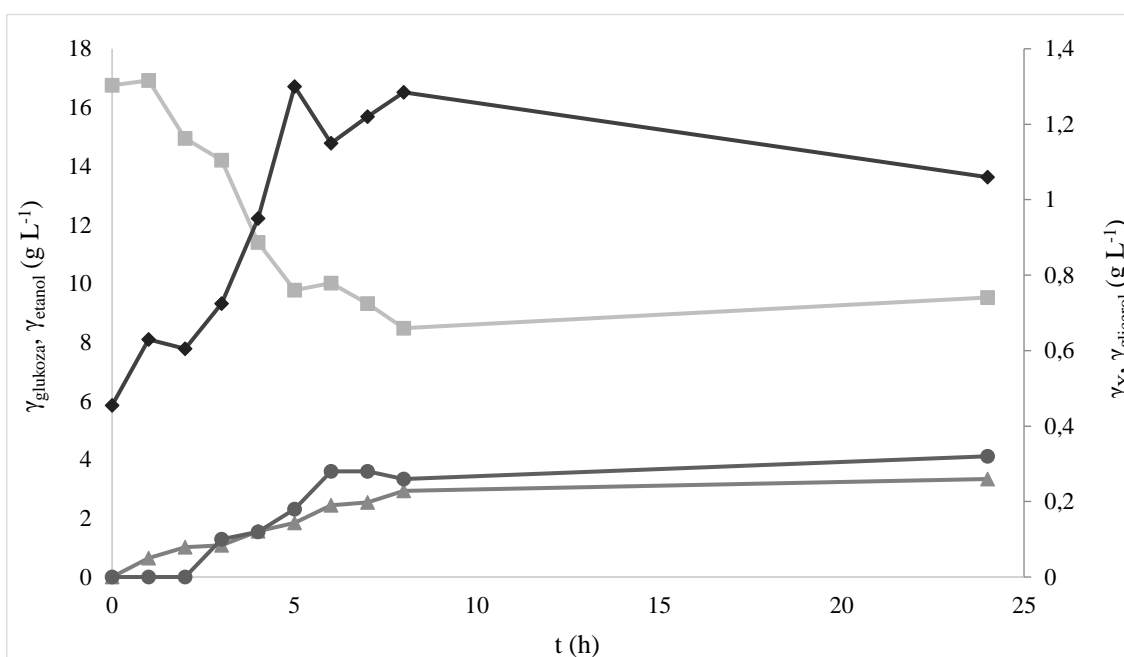
Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* pri pH vrijednosti od 3 jedinice, lag faza trajala je 2 h, a eksponencijalna faza 4 h. Specifična brzina rasta koja se pritom postiže iznosi $\mu_{\text{maks}} = 0,26 \text{ h}^{-1}$. Rast kvasca i proizvodnja etanola praćena je tijekom 24 h, a već nakon 6 h uzgoja došlo je potpunog utroška supstrata (slika 11, tablica 5) što je za 1 h duže nego kod uzgoja pri pH vrijednosti od 4 jedinice (slika 10, poglavlje 4.2.2.). Tijekom anaerobnog uzgoja kao glavni produkt metabolizma nastaje etanol uz koeficijent konverzije glukoze u etanol od $0,46 \text{ g g}^{-1}$ i produktivnost procesa od $1,37 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Osim etanola, nastaju i male količine glicerola uz prinos od $0,58 \text{ g L}^{-1}$ što je veća vrijednost od one postignute tijekom uzgoja pri pH vrijednosti od 4 jedinice.

U svom istraživanju Bajpai i Margaritis (1987), određivali su utjecaj temperature i pH na proizvodnju etanola iz ekstrakta jeruzalemske artičoke s pomoću imobiliziranih stanica kvasca *K. marxianus*. Tijekom uzgoja pri pH vrijednosti od 3 jedinice, proizvedeno je $40,06 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1}$ uz koeficijent konverzije šećera u etanol od $0,48 \text{ g g}^{-1}$.

4.2.4. Uzgoj kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri pH vrijednosti od 2 jedinice

Korištenje lignoceluloznih sirovina najviše se proučava u svrhu njihove implementacije u industriji proizvodnje biogoriva. Prilikom proizvodnje biogoriva vladaju nepovoljni uvjeti za rast mikroorganizama kao što su: niska pH vrijednost (2,5), anaerobnost i visoke koncentracije etanola (do 10 %). Madeira-Jr i Gombert (2018) uzgajali su različite sojeve kvasca *K. marxianus* u svrhu proizvodnje etanola iz šećerne trske u uvjetima kakvi vladaju u biorafinerijama, kako bi pronašli soj koji zadovoljava industrijske potrebe.

Slika 12 prikazuje promjenu koncentracije glukoze, biomase, etanola i glicerola tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH vrijednosti od 2 jedinice u anaerobnim uvjetima.



Slika 12. Promjena koncentracije glukoze (■), biomase (◆), etanola (▲) i glicerola (●) tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u YPD podlozi pri pH 2 u anaerobnim uvjetima

Tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* pri pH vrijednosti od 2 jedinice nije uočena značajna razlika u trajanju lag faze (1 h) i eksponencijalne faze (4 h) rasta u odnosu na prethodno provedene uzgoje. Specifična brzina rasta u navedenim uvjetima uzgoja iznosi $\mu_{\text{maks}} = 0,19 \text{ h}^{-1}$. Za razliku od prethodno provedenih uzgoja tijekom kojih je došlo do potpunog utroška supstrata, prilikom ovog uzgoja zabilježena je relativno konstantna vrijednost supstrata nakon 6 h uzgoja. Također, gotovo tijekom cijelog uzgoja zabilježen je veći udio mrtvih stanica u odnosu na žive (prilog 7.3.).

Uzgoj je praćen unutar 24 h tijekom kojih je kvasac kontinuirano proizvodio etanol uz prinos od $3,34 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije glukoze u etanol iznosi $0,20 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost procesa $0,41 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Osim etanola, ovaj kvasac u navedenim uvjetima proizvodi male količine glicerola ($\gamma_{\text{glicerol}} = 0,32 \text{ g L}^{-1}$), uz koeficijent konverzije glukoze u glicerol od $0,02 \text{ g g}^{-1}$ (slika 12, tablica 5).

Amrane i Prigent (1998) proveli su uzgoj kvasca *K. marxianus* kako bi utvrdili utjecaj parametara uzgoja na rast kvasca. Između ostalog, nastojali su utvrditi optimalnu pH vrijednost pri kojoj se postiže maksimalna konverzija supstrata u biomasu. Pri pH vrijednosti od 2,3 jedinice, što je najbliže vrijednosti ispitivanoj u ovome radu, dobiven je koeficijent konverzije supstrata u biomasu $Y_{X/S} = 0,35 \text{ g g}^{-1}$.

Tablica 5. Utjecaj pH vrijednosti podloge na potrošnju supstrata, rast biomase i prinose produkata tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u standardnoj YPD podlozi pri 30°C, u anaerobnim uvjetima

parametar		pH vrijednost [-]			
		5	4	3	2
t_{lag}	[h]	1	1	2	1
t_{eksp}	[h]	4	5	4	4
$\gamma_{X_{maks}}$	[g L ⁻¹]	3,63	3,42	3,1	1,2
$\gamma_{etanol_{maks}}$	[g L ⁻¹]	7,80	8,32	8,24	3,34
$\gamma_{glicerol_{maks}}$	[g L ⁻¹]	0,84	0,52	0,58	0,32
$Y_{etanol/glukoza}$	[g g ⁻¹]	0,47	0,50	0,46	0,20
Pr_{etanol}	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	1,30	1,51	1,37	0,41
$Y_{X/glukoza}$	[g g ⁻¹]	0,15	0,16	0,10	0,04
Pr_X	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,43	0,44	0,31	0,11
$Y_{glicerol/glukoza}$	[g g ⁻¹]	0,05	0,03	0,03	0,02
$Pr_{glicerol}$	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,14	0,09	0,10	0,05
μ_{maks}	[h ⁻¹]	0,31	0,35	0,26	0,19
$r_{glukoza}$	[h ⁻¹]	0,22	0,22	0,18	0,14
r_{etanol}	[h ⁻¹]	0,40	0,52	0,39	0,20
$r_{gliceorol}$	[h ⁻¹]	0,35	0,37	0,32	0,29

*početna pH vrijednost YPD podloge iznosi 6,2 ±0,1, te je na početku uzgoja pH vrijednost podloge podešena na odabranu pH vrijednost i održavana konstantnom tijekom uzgoja kvasca automatskim dodatkom 2 M otopine H₂SO₄ i 2 M otopine NaOH

5. ZAKLJUČAK

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

1. Prilikom uzgoja s različitim koncentracijama inokuluma, najveći prinos etanola postignut je s 2,5 % inokuluma ($\gamma_{\text{etanol}} = 8,28 \text{ g L}^{-1}$), dok je najveći prinos glicerola postignut s 10 % inokuluma ($\gamma_{\text{glicerol}} = 0,98 \text{ g L}^{-1}$). Najveće produktivnosti proizvodnje produkata metabolizma postignute su s 10 % inokuluma ($Pr_{\text{EtOH}} = 1,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{\text{glicerol}} = 0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Najveća specifična brzina rasta ($\mu = 0,43 \text{ h}^{-1}$) zabilježena je tijekom uzgoja s 2,5 % inokuluma.
2. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 raste u YPD podlozi, proizvodi etanol i glicerol pri svim testiranim pH vrijednostima (2, 3, 4 i 5 jedinica). Značajnije količine octene kiseline nisu detektirane tijekom navedenih uzgoja.
3. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 ima najveću specifičnu brzinu rasta ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$) te najveći prinos ($\gamma_{\text{etanol}} = 8,32 \text{ g L}^{-1}$) i produktivnost proizvodnje etanola ($Pr_{\text{EtOH}} = 1,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) pri pH vrijednosti od 4 jedinice. Ujedno se na toj pH vrijednosti postiže i najveći koeficijent konverzije glukoze u etanol, $Y_{\text{etanol/glukoza}} = 0,50 \text{ g g}^{-1}$.
4. Najveća produktivnost procesa proizvodnje glicerola ($Pr_{\text{glicerol}} = 0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) zabilježeni su na pH vrijednosti od 5 jedinica i koncentraciji inokuluma od 5 %. Pri toj pH vrijednosti postiže se i najveći prinos glicerola ($\gamma_{\text{glicerol}} = 0,84 \text{ g L}^{-1}$) te najveći koeficijent konverzije glukoze u glicerol ($Y_{\text{glicerol/glukoza}} = 0,05 \text{ g g}^{-1}$).

6. LITERATURA

Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S. U, Zhang, R., Liu, G., Chen, C. (2017) Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Expr* **7**, 72.

Amrane, A., Prigent, Y. (1998) Effect of culture conditions of *Kluyveromyces marxianus* on its autolysis, and process optimization. *Bioprocess Eng.* **18**, 383–388.

Bajpai, P., Margaritis, A. (1987) The effect of temperature and pH on ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke extract. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 306–313.

Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiol.* **15**, 165–171.

Boyle, M., Barron, N., McHale, AP. (1997) Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* imb3. *Biotechnol. Lett.* **19**, 49-51.

Bušić A., Marđetko N., Kundas S., Morzak G., Belskaya H., Ivančić Šantek M., Komes D., Novak S., Šantek B. (2018) Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review. *Food technol. biotech.* **56**, 289-311.

Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. (2010) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *Int. J. Food Microbiol.* **143**, 81–85.

Demiray, E., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. (2020) Efficient bioethanol production from pomegranate peels by newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Energ. Source Part A* **42**, 709–718.

Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., Matsushika, A. (2013) Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass by a Novel *Kluyveromyces marxianus* Strain. *Biosci. Biotech. Bioch.* **77**, 1505–1510.

Gupte, A. M., Nair, J. S. (2010) β -Galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *NCIM 355* **69**, 5.

- Hadiyanto, Ariyanti, D., Aini, A. P., Pinundi, D. S. (2014) Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-batch Fermentation Using *Kluyveromyces Marxianus*. *Enrgy. Proced.* **47**, 108–112.
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H., Tamaki, H. (2007) Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J. Biotechnol.* **130**, 114–123.
- Ianieva, O. D., Podgorsky, V. S. (2014) Whey fermentation by yeast strains *Kluyveromyces marxianus* UCM Y-2096 and UCM Y-2388. *Mikrobiol. Z.* **76**, 27-32.
- Ishida N., Saitoh S., Tokuhiko K., Nagamori E., Matsuyama T., Kitamoto K., Takahashi H. (2005) Efficient Production of L-Lactic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a Genome-Integrated L-Lactate Dehydrogenase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1964–1970.
- Johnson, D. B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**, 307–317.
- Johnson, D. B. (2008) Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *T. Nonferr. Metal. Soc.* **18**, 1367–1373.
- Johnson, E. A. (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 7563–7577.
- Karim, A., Gerliani, N., Aïder, M. (2020) *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int. J. Food Microbiol.* **333**, 108818.
- Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., Narodslawsky, M. (2013) Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey. *Resour. Conserv. Recycl.* **73**, 64–71.
- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O’Byrne, C.P., Morrissey, J.P. (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**, 507–519.

- Lane, M. M., Morrissey, J.P. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol. Rev.* **24**, 17–26.
- Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Limtong, S., Thanonkeo, P., Yamada, M. (2007) Comparison of the Gene Expression Patterns of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* and Their Physiological Functions. *Biosci. Biotech. Bioch.* **71**, 1170–1182.
- Lukondeh, T., Ashbolt, N. J., Rogers, P. L. (2005) Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *J. ind. microbial. biotechnol.* **32**, 284–288.
- Madeira-Jr, J. V., Gombert, A. K. (2018) Towards high-temperature fuel ethanol production using *Kluyveromyces marxianus*: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcane-based biorefinery. *Biomass Bioenerg.* **119**, 217–228.
- Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1.izd., Golden Marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
- Martynova, J., Kokina, A., Kibilds, J., Liepins, J., Scerbaka, R., Vigants, A. (2016a) Effects of acetate on *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 growth and metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 4585–4594.
- Martynova, J., Kokina, A., Liepins, J., Vigants, A. (2016b) Utilization of different carbohydrates by various *Kluyveromyces marxianus* strains. *J. Biotechnol.* **231**, S62.
- Matsuzaki, C., Nakagawa, A., Koyanagi, T., Tanaka, K., Minami, H., Tamaki, H., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H. (2012) *Kluyveromyces marxianus*-based platform for direct ethanol fermentation and recovery from cellulosic materials under air-ventilated conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 604–607.
- McIntosh, S., Palmer, J., Zhang, Z., Doherty, W. O. S., Yazdani, S. S., Sukumaran, R. K., Vancov, T. (2017) Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated *Eucalyptus grandis* Under High Solids Loading. *Ind. Biotechnol.* **13**, 131–140.

- Mogmenga, I., Somda, M.K., Ezeogu, L. I., Ugwuanyi, J., Traoré, A. S. (2019) Yeasts biotechnologies application and their involving in african traditional fermented foods and beverages. *Int. J. Adv. Res.* **7**, 44-62.
- Pang, Z., Liang, J., Qin, X., Wang, J., Feng, J., Huang, R. (2010) Multiple induced mutagenesis for improvement of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1847-1851.
- Pentjuss, A., Stalidzans, E., Liepins, J., Kokina, A., Martynova, J., Zikmanis, P., Mozga, I., Scherbaka, R., Hartman, H., Poolman, M. G., Fell, D. A., Vigants, A. (2017) Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **44**, 1177–1190.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., Thevelein, J. M. (2015) Looking beyond *Saccharomyces* : the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res.* **15**, 1-13.
- Rezić, T., Šantek, M. I., Andlar, M., Pavlečić, M., Šantek, B. (2016) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. *Food Technol. Biotechnol.* **12**, 6-17.
- Rocha, M. V. P., Rodrigues, T. H. S., Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B., Macedo, G. R. de, (2011) Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1099–1107.
- Seo, S.-O., Park, S.-K., Jung, S.-C., Ryu, C.-M., Kim, J.-S. (2020) Anti-Contamination Strategies for Yeast Fermentations. *Microorganisms* **8**, 274.
- Tavares, B., Felipe, M. das G. de A., dos Santos, J. C., Pereira, F. M., Gomes, S. D., Sene, L., (2019) An experimental and modeling approach for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in stirred tank bioreactor using vacuum extraction as a strategy to overcome product inhibition. *Renew. Energ.* **131**, 261–267.
- Techaparin, A., Thanonkeo, P., Klanrit, P. (2017) High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Braz. J. Microbiol.* **48**, 461–475.

Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., González, A., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2009) Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel* **88**, 2142 - 2147.

Türker, M. (2014) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* 27.

Vivier, D., Ratomahenina, R., Moulin, G., Galzy, P. (1993) Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol.* **11**, 157–161.

Wu, W.-H., Hung, W.-C., Lo, K.-Y., Chen, Y.-H., Wan, H.-P., Cheng, K.-C., (2016) Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. *Bioresour. Technol.* **201**, 27–32.

Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2010) Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 381–388.

Yuan, W. J., Zhao, X. Q., Ge, X. M., Bai, F. W. (2008) Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 2076–2083.

Zhang, B., Ren, L., Wang, Y., Xu, D., Zhang, S., Wang, Hui, Wang, Haonan, Zeng, X., Xin, B., Li, F. (2020) Glycerol production through TPI1 defective *Kluyveromyces marxianus* at high temperature with glucose, fructose, and xylose as feedstock. *Biochem. Eng. J.* **161**, 107689.

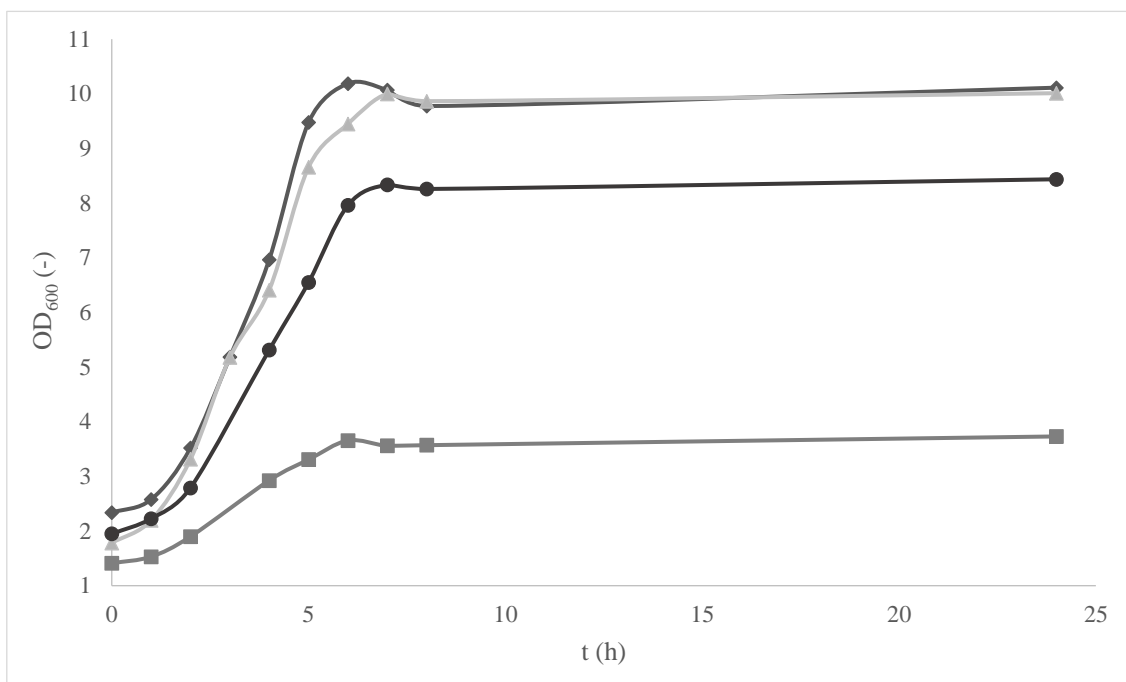
7. PRILOZI

7.1. POPIS KRATICA

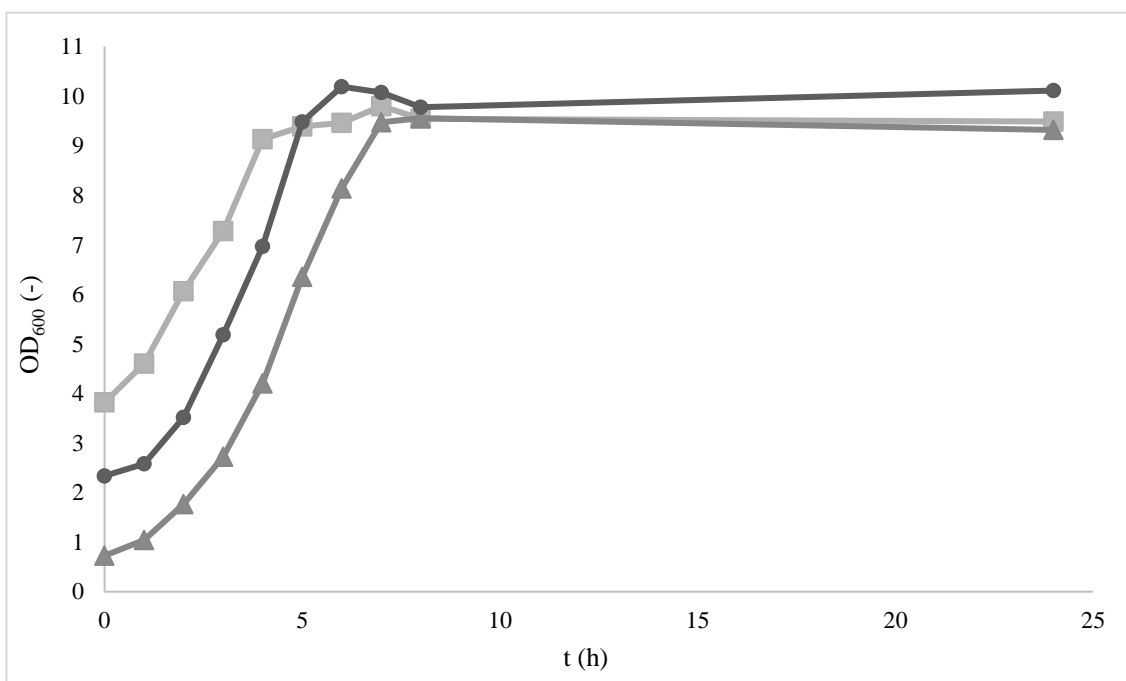
Prilog 1. Popis kratica uz navedene oznake veličine, veličine i jedinice

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
t_{lag}	lag faza rasta	[h]
t_{eksp}	eksponencijalna faza rasta	[h]
$\gamma_{X_{maks}}$	maksimalni prinos biomase	[g L ⁻¹]
$\gamma_{etanol_{maks}}$	maksimalni prinos etanola	[g L ⁻¹]
$\gamma_{glicerol_{maks}}$	maksimalni prinos glicerola	[g L ⁻¹]
$Y_{X/glukoza}$	koeficijent konverzije glukoze u biomasu	[g g ⁻¹]
$Y_{etanol/glukoza}$	koeficijent konverzije glukoze u etanol	[g g ⁻¹]
$Y_{glicerol/glukoza}$	koeficijent konverzije glukoze u glicerol	[g g ⁻¹]
Pr_X	produktivnost proizvodnje biomase	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
Pr_{etanol}	produktivnost proizvodnje etanola	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
$Pr_{glicerol}$	produktivnost proizvodnje glicerola	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
$r_{glukoza}$	brzina potrošnje glukoze	[h ⁻¹]
r_{etanol}	brzina proizvodnje etanola	[h ⁻¹]
$r_{glicerol}$	brzina proizvodnje glicerola	[h ⁻¹]
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta biomase	[h ⁻¹]

7.2. PROMJENA OPTIČKE GUSTOĆE TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777 PRI RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA

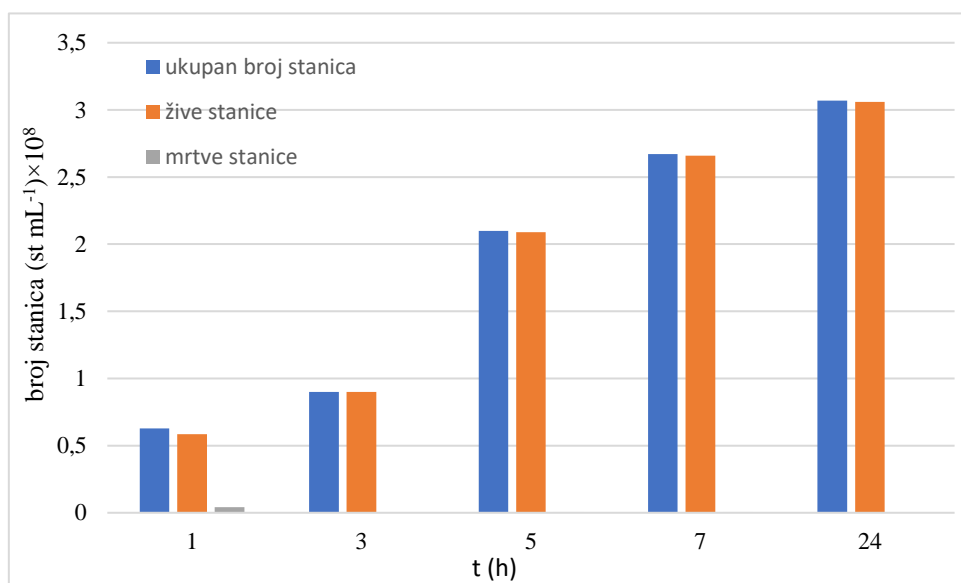


Prilog 2. Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednostima od 5 (◆), 4 (▲), 3 (●) i 2 (■) jedinice

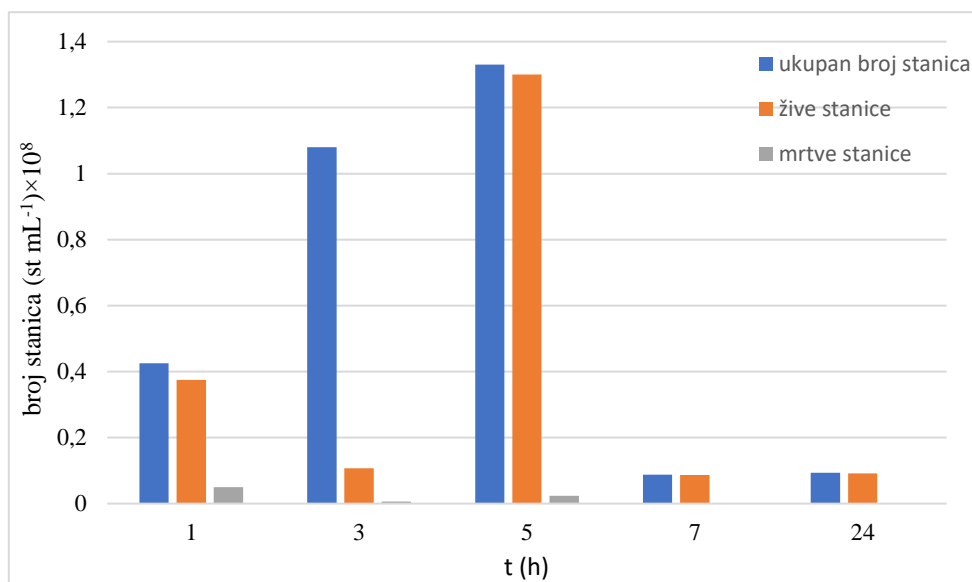


Prilog 3. Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri koncentraciji inokuluma od 2,5 % (▲), 5 % (●) i 10 % (■)

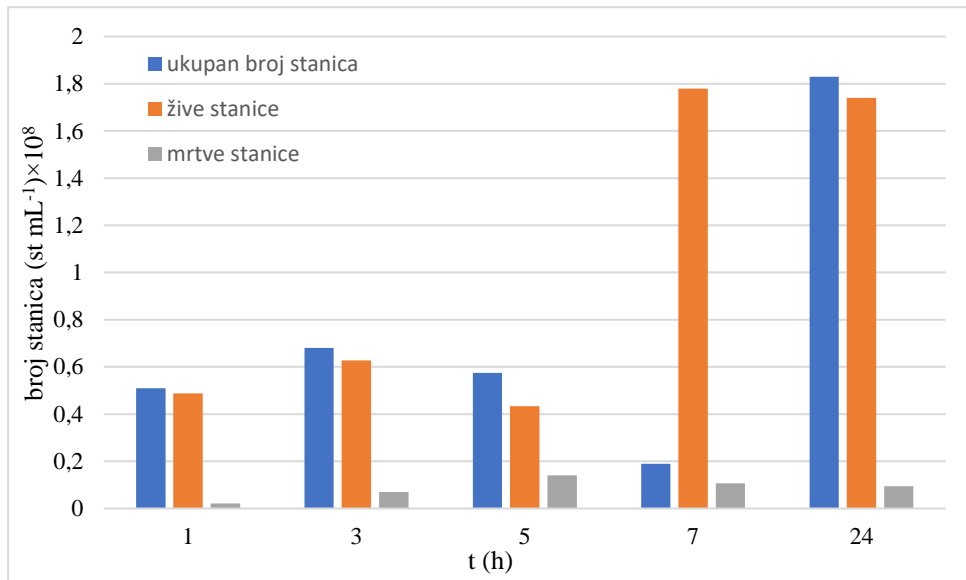
7.3. ODNOS UKUPNOG BROJA TE BROJA ŽIVIH I MRTVIH STANICA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777 PRI RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA



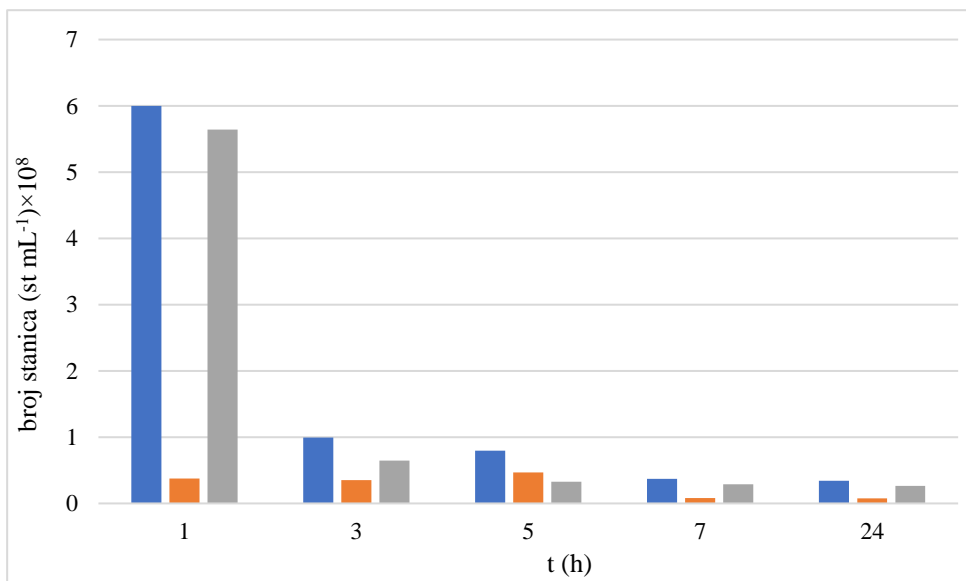
Prilog 4. Grafički prikaz ukupnog broja te broja živih i mrtvih stanica tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 5 jedinica



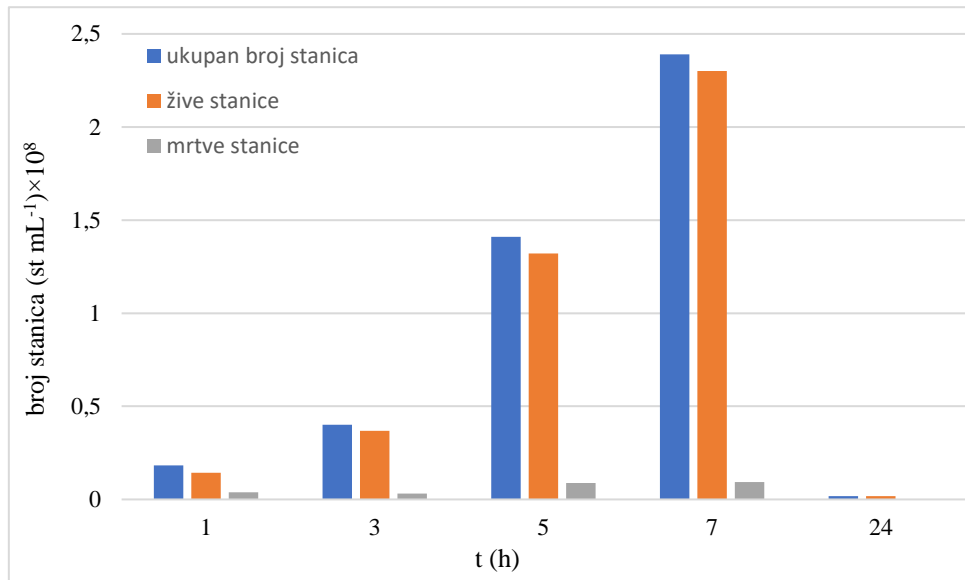
Prilog 5. Grafički prikaz ukupnog broja te broja živih i mrtvih stanica tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 4 jedinice



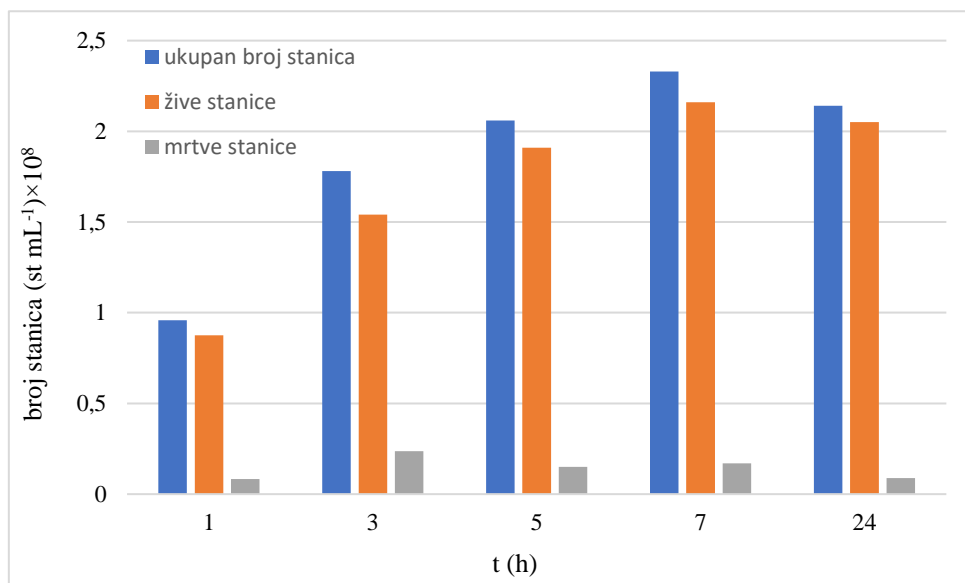
Prilog 6. Grafički prikaz ukupnog broja te broja živih i mrtvih stanica tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 3 jedinice



Prilog 7. Grafički prikaz ukupnog broja te broja živih i mrtvih stanica tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 2 jedinice

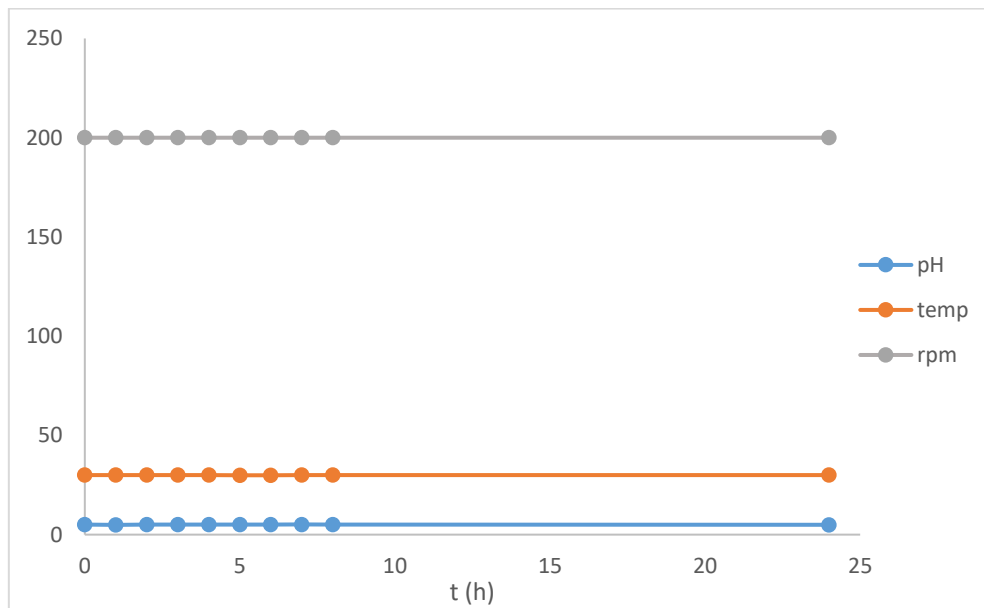


Prilog 8. Grafički prikaz ukupnog broja te broja živih i mrtvih stanica tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 s koncentracijom inokuluma od 2,5 %

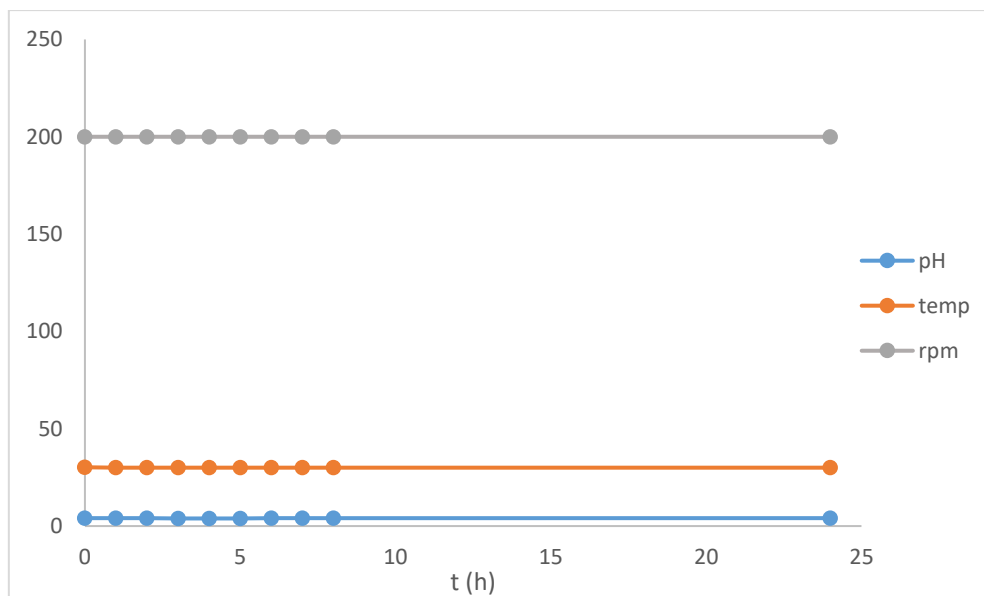


Prilog 9. Grafički prikaz ukupnog broja te broja živih i mrtvih stanica tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 s koncentracijom inokuluma od 10 %

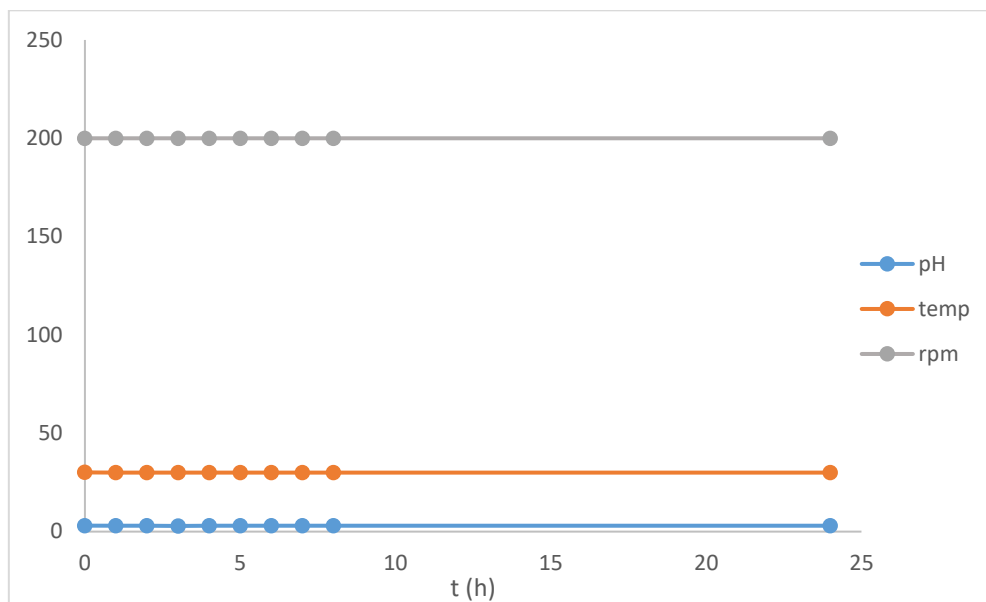
7.4. PRAĆENJE PROCESNIH PARAMETARA TIJEKOM UZGOJA KVASCA *K. marxianus* NBRC 1777 PRI RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA



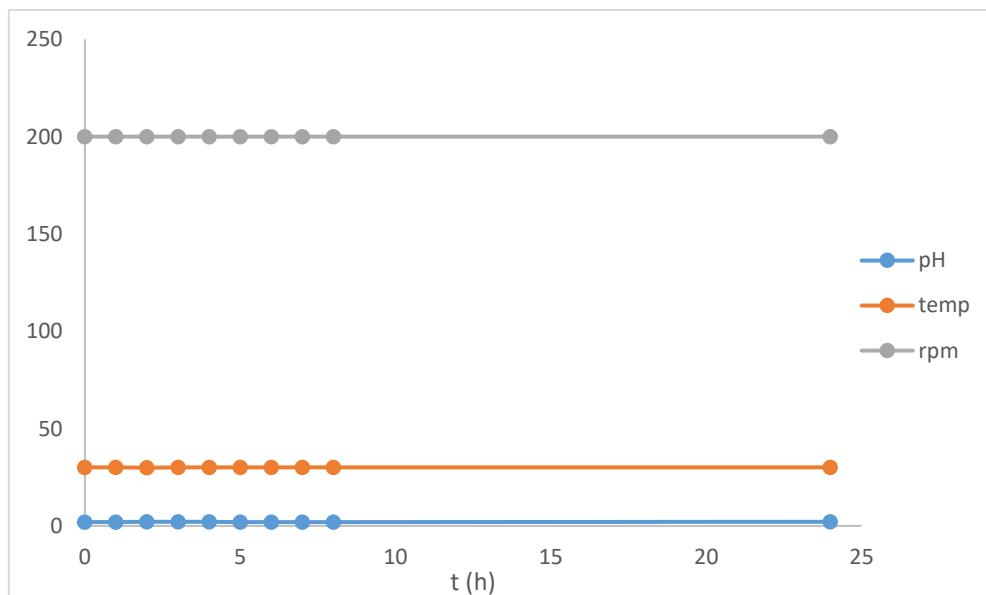
Prilog 10. Grafički prikaz procesnih parametara tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 5 jedinica



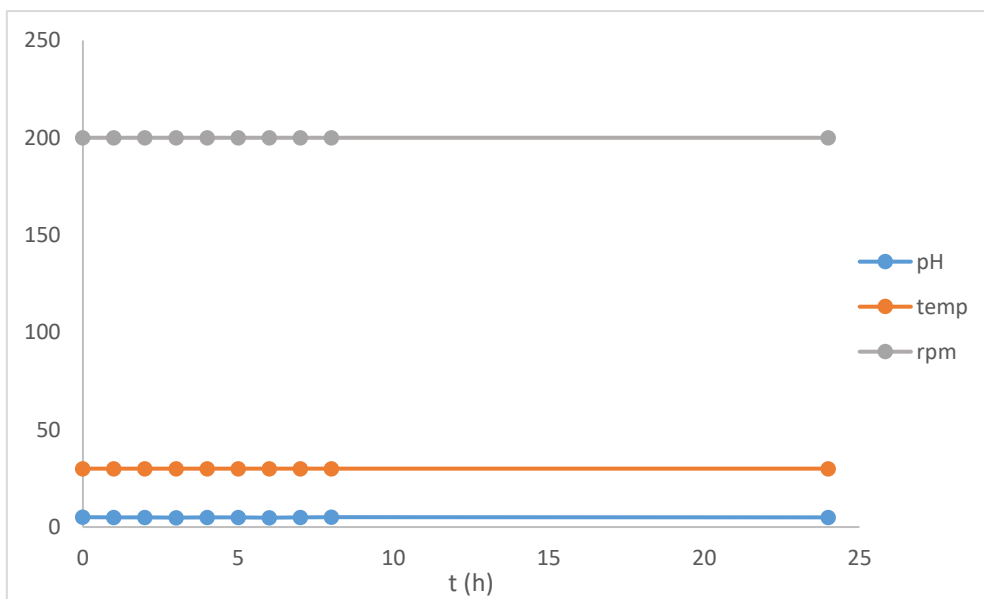
Prilog 11. Grafički prikaz procesnih parametara tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 4 jedinice



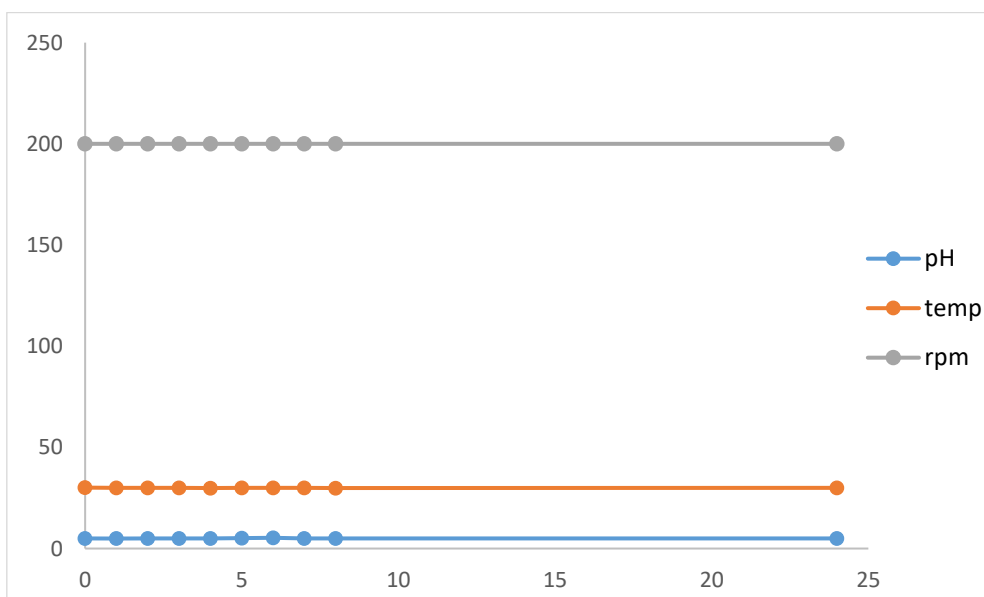
Prilog 12. Grafički prikaz procesnih parametara tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 3 jedinice



Prilog 13. Grafički prikaz procesnih parametara tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri pH vrijednosti od 2 jedinice



Prilog 14. Grafički prikaz procesnih parametara tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 s koncentracijom inokuluma od 2,5 %



Prilog 15. Grafički prikaz procesnih parametara tijekom uzgoja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 s koncentracijom inokuluma od 10 %

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.

Kristina Vukoje

Ime i prezime studenta