

# Proizvodnja bioetanola i 2,3-butandiola pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* na enzimskom hidrolizatu predobrađenog drveta bukve

---

Štefanac, Katarina

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:159:042433>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Katarina Štefanac

**PROIZVODNJA BIOETANOLA I  
2,3-BUTANDIOLA POMOĆU  
KVASCA *Kluyveromyces marxianus*  
NA ENZIMSKOM HIDROLIZATU  
PREDOBRAĐENOG DRVETA  
BUKVE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Damira Stanzera te uz pomoć mag. ing. Karle Hanousek Čiče, asistentice.

Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717) (voditelj projekta prof. dr. sc. Božidar Šantek).

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Damiru Stanzeru na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada, stručnosti, strpljenju, razumijevanju i savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Također, hvala i Karli Hanousek Čiči, mag. ing. na pomoći, prenesenom znanju i vještinama te trudu prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Hvala i Nenadu Marđetku, mag. ing. na pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala svim mojim prijateljicama koje su mi bile velika podrška tijekom studiranja, dijelile sa mnom dobre i loše studentske dane, bile pune razumijevanja i podrške te uvijek spremne pomoći.*

*Najviše se zahvaljujem svojim roditeljima Ivici i Josipi što su mi omogućili bezbrižne studentske dane te bili puni ljubavi, podrške i strpljenja tijekom studiranja. Također se zahvaljujem sestri Ani i bratu Ivanu na svim veselim trenucima s kojima su mi uljepšali sve studentske dane. Hvala Vam na svemu!*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PROIZVODNJA BIOETANOLA I 2,3-BUTANDIOLA POMOĆU KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NA ENZIMSKOM HIDROLIZATU PREDOBRAĐENOG DRVETA BUKVE

Katarina Štefanac, univ. bacc.ing. biotechn.  
0058207089

**Sažetak:** Lignocelulozne sirovine su biomasa drvenastih i nedrvenastih biljaka. Otpadne lignocelulozne sirovine imaju izniman potencijal u biotehnološkoj industriji pri proizvodnji bioetanolu te drugih biokemikalija. Unatoč niskoj cijeni, lakoj dostupnosti te širokoj rasprostranjenosti, uporaba lignoceluloznog otpada kao sirovine je rijetka zbog složene strukture, otpornosti na enzimsku hidrolizu i nedovoljno razvijenih metoda predobrade. U ovom radu provedena je enzimska hidroliza (50 °C, pH 5) kiselinski predobrađenog čvrstog dijela bukve u 0,01 M acetatnom puferu, pomoću enzima Viscozyme L (5 % vol vol<sup>-1</sup>) i Cellulase enzyme blend (2 % vol vol<sup>-1</sup>). Na dobivenom enzimskom hidrolizatu proveden je uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 uz različite uvjete sastava podloge, pH vrijednosti (3,7; 4,4 i 5,1), stupnja aeracije te temperature (25, 29 i 33°C). Među dobivenim produktima zabilježena je određena koncentracija etanola u rasponu vrijednosti od 29,10 do 33,07 g L<sup>-1</sup>, te koncentracija 2,3-butandiola u rasponu vrijednosti od 0,52 do 0,69 g L<sup>-1</sup>.

**Ključne riječi:** lignocelulozne sirovine, enzimska hidroliza, *Kluyveromyces marxianus*, bioetanol, 2,3-butandiol

**Rad sadrži:** 46 stranica, 20 slika, 9 tablica, 53 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Damir Stanzer

**Pomoć pri izradi:** Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Damir Stanzer (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (član)
4. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac (zamjenski član)

**Datum obrane:** 03. prosinca 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

### PRODUCTION OF BIOETHANOL AND 2,3-BUTANEDIOL BY YEAST *Kluyveromyces marxianus* ON ENZYMATIC HYDROLYSATE OF PRETREATED BEECH WOOD

Katarina Štefanac, univ. bacc.ing. biotechn.  
0058207089

**Abstract:** Lignocellulosic raw materials are biomass of wood and non-wood plants. Waste lignocellulosic raw materials have exceptional potential in the biotechnology in the production of bioethanol and other biochemicals. Despite the low cost, easy availability and wide distribution, the use of lignocellulosic waste as a raw material is rare due to its complex structure, resistance to enzymatic hydrolysis and insufficiently developed pretreatment methods. In this work, enzymatic hydrolysis (50 °C, pH 5) of solid phase obtained by acid pretreatment of beech wood chips, in 0.01 M acetate buffer, was performed using the enzymes Viscozyme L (5 % vol vol<sup>-1</sup>) and Cellulase enzyme blend (2 % vol vol<sup>-1</sup>). The resulting enzyme hydrolyzate was used for cultivation of yeast *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 under different conditions of media composition, pH conditions (3.7; 4.4 and 5.1), various aeration rates and temperature conditions (25, 29 and 33 °C). Among the products obtained, a certain concentration of ethanol in the range from 29.10 to 33.07 g L<sup>-1</sup>, and a concentration of 2,3-butanediol in the range from 0.52 to 0.69 g L<sup>-1</sup> were recorded.

**Keywords:** lignocellulosic raw material, enzymatic hydrolysis, *Kluyveromyces marxianus*, bioethanol, 2,3-butanediol

**Thesis contains:** 46 pages, 20 figures, 9 tables, 53 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Damir Stanzer, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

#### Reviewers:

1. Božidar Šantek, PhD, Full professor (president)
2. Damir Stanzer, PhD, Full professor (mentor)
3. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (member)
4. Vlatka Petravić Tominac, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 3<sup>rd</sup>, 2021



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Celuloza .....	5
2.1.2. Hemiceluloza .....	5
2.1.3. Lignin.....	6
2.1.4. Bukva kao biotehnoška sirovina .....	7
<b>2.2. ENZIMSKA HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3. PRIMJENA KVASCA U BIOTEHNOLOGIJI</b> .....	<b>9</b>
2.3.1. <i>Ne-Saccharomyces</i> kvasci.....	10
2.3.2. Kvasac <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	11
<b>2.4. PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA</b> .....	<b>14</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>15</b>
3.1.1. Sirovina .....	15
3.1.2. Enzimi .....	15
3.1.3. Radni mikroorganizam.....	16
3.1.4. Kemikalije.....	16
<b>3.2. APARATURA I PRIBOR</b> .....	<b>17</b>
3.2.1. Laboratorijski pribor .....	17
3.2.2. Uređaji i instrumenti .....	17
3.2.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. <i>High Pressure Liquid Chromatography, HPLC</i> ).....	18
3.2.4. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. <i>Ultra performance Chromatography, UPLC</i> ).....	18
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>18</b>
3.3.1. Enzimski hidroliza kolača bukve u Erlenmayer tikvicama .....	18
3.3.2. Priprema i analiza uzoraka UPLC metodom .....	19
3.3.3. Priprema inokuluma kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	19
3.3.4. Uzgoj divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> na hidrolizatu bukve .....	20
3.3.5. Utjecaj različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	20
3.3.6. Utjecaj različite vrijednosti pH na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	22

3.3.7. Utjecaj stupnja aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	23
3.3.8. Utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	23
<b>3.4. ANALITIČKE METODE</b> .....	<b>23</b>
3.4.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase.....	23
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije biomase .....	23
3.4.3. Priprema uzoraka za HPLC analizu .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. PRIREMA HIDROLIZATA BUKVE .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. KINETIKA RASTA I FERMENTACIJE DIVLJEGA SOJA KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....</b>	<b>26</b>
4.2.1. Utjecaj različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	26
4.2.2. Utjecaj pH vrijednosti na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	29
4.2.3. Utjecaj stupnja aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	32
4.2.4. Utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 .....	35
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>40</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>41</b>



# 1. UVOD

Lignocelulozni materijali su glavna komponenta biljne biomase i predstavljaju obnovljivi izvor energije dostupan na Zemlji. U lignocelulozne sirovine pripadaju različiti poljoprivredni ostaci (ostaci nakon berbe pšenice, kukuruza, sijeno, suha trava), ostaci drvne industrije (piljevina, strugotine) te otpad nastao iz prehrambene industrije (ostaci voća i povrća) (Kucharska i sur., 2018; Sun i Cheng, 2002). Postoji mnogo načina njihovog korištenja, pa se danas najviše istraživanja provodi u svrhu optimizacije procesa iskorištenja lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biogoriva, bioplina, bioetanola, enzima, antibiotika i biopesticida (Marđetko i sur., 2018). Unatoč pozitivnim karakteristikama lignoceluloznih sirovina, kao što su niska cijena, laka dostupnost i široka rasprostranjenost diljem svijeta, uporaba lignoceluloznog otpada kao sirovine u komercijalnoj proizvodnji je rijetka zbog složene strukture, otpornosti na enzimsku i kemijsku hidrolizu te nedovoljno razvijenih metoda predobrade (Isigkor i Becker, 2015).

Glavne komponente lignoceluloze su celuloza, hemiceluloza i lignin koji su zajedno povezani u kompleksnu trodimenzionalnu strukturu te je zbog toga potrebno provesti odgovarajuću i učinkovitu predobradu lignoceluloznog materijala. Metode predobrade provode se u cilju povećanja poroznosti sirovine te uklanjanja lignina i hemiceluloze i smanjenja kristalčnosti celuloze (Kucharska i sur., 2018). Ovisno o sastavu lignocelulozne sirovine potrebno je odabrati odgovarajuću vrstu enzima kako bi se provela enzimska hidroliza, odnosno razgradnja složenih polimernih ugljikohidrata na različite jednostavnije ugljikohidrate. Uz standardne celulaze i hemicelulaze, koriste se i lako dostupni komercijalni enzimi, kao Novozymov Viscozyme L, Novozymov Celluclast te Novozyme Cellic CTec2 (Verardi i sur., 2012).

Također je važno odabrati mikroorganizme koji imaju sposobnost korištenja oslobođenih jednostavnijih ugljikohidrata. Primjena kvasaca postaje sve važnija u procesu proizvodnje bioetanola, zbog čega se javlja potreba za kvascima s visokom otpornošću prema stresnim situacijama. Najčešće korišteni mikroorganizam tijekom fermentacije lignoceluloznog hidrolizata je *Saccharomyces cerevisiae*, no daljnja istraživanja se također okreću korištenju drugih rodova kvasaca, a jedan od njih je i *Kluyveromyces marxianus* (Petravić Tominac i sur., 2017). Uz bioetanol, određene vrste kvasaca mogu proizvesti i različite kemikalije, kao glicerol, octenu kiselinu, 2,3-butandiol i druge (Wu i sur., 2017).

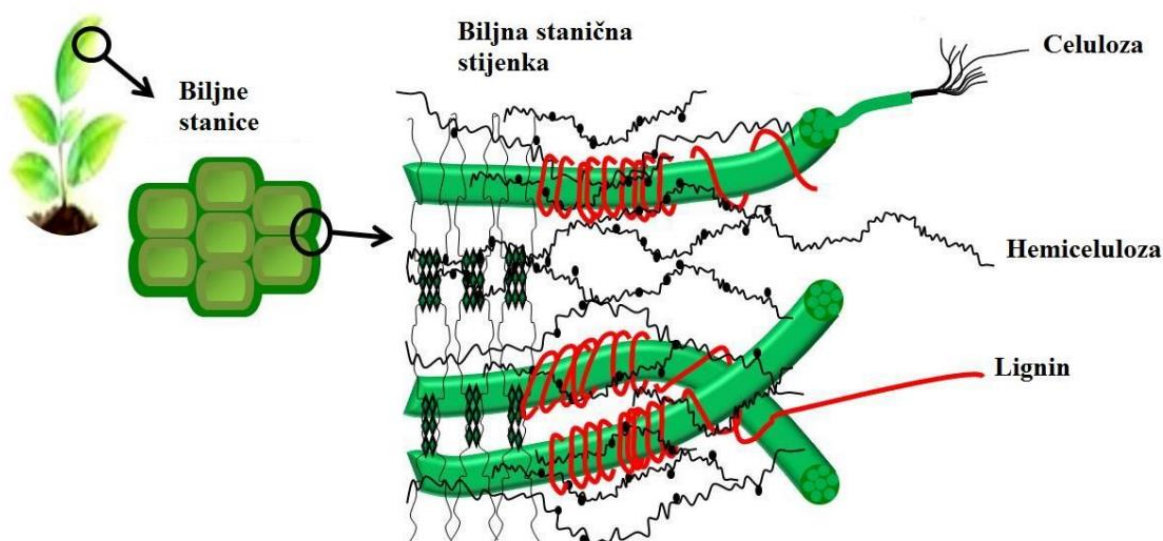
Cilj ovog rada bio je provesti enzimsku hidrolizu čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom čipsa bukve, pomoću komercijalnih pripravaka enzima (Viscozyme L i Cellulase enzyme blend). Na dobivenom enzimskom hidrolizatu proveden je uzgoj divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* na laboratorijskoj tresilici uz različite uvjete sastava podloge, pH, stupnja aeracije te temperature.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignocelulozne sirovine su najrasprostranjenije obnovljive sirovine na Zemlji zahvaljujući tome što nastaju procesom fotosinteze iz vode i atmosferskog ugljikovog dioksida uz pomoć Sunčeve svjetlosti. One čine oko 64 % biomase poraslih biljaka na Zemlji. Lignocelulozne sirovine su biomasa drvenastih i nedrvenastih biljaka. Tu pripadaju otpadni šumski materijal (piljevina, strugotine, sitno granje), otpadni poljoprivredni materijal (kukuruzovina i kukuruzni oklasci, pšenična slama, slama ječma, suha i svježa trava), otpad drvnoprerađivačke industrije i otpad nastao u prehrambenoj industriji (koštice i kore voća, ostaci povrća, otpad uljarica) (Kucharska i sur., 2018; Marić, 2000). Otpadne lignocelulozne sirovine imaju izniman potencijal u biotehnološkoj proizvodnji te njihovo iskorištavanje može znatno pridonijeti svjetskoj energetskej opskrbi bez rizika onečišćenja okoliša (Kumar Das i sur., 2020). S razvojem biotehnologije lignocelulozni materijal koristi se za proizvodnju baznih kemikalija kao što je bioetanol i mliječna kiselina, nadalje u proizvodnji bioplina i enzima te visokovrijednih spojeva kao što su antibiotici i biopesticidi (Marđetko i sur., 2018).

Lignocelulozna biomasa je nejestivi biljni materijal te jedan od supstrata kojeg mikroorganizmi mogu najteže iskoristiti. Glavni izvor fermentabilnih šećera iz lignoceluloznih sirovina je stanična stijenka koja se sastoji od tri glavne komponentne (slika 1): celuloza, hemiceluloza i lignin (Ratanakhanokchai i sur., 2013).



**Slika 1.** Shematski prikaz stanične stijenke biljaka (prema Ratanakhanokchai i sur., 2013)

Općenito lignoceluloza sadrži 25-50 % celuloze, 20-40 % hemiceluloze i 10-15 % lignina, no udio navedenih polisaharida u strukturi ovisi o sirovini kao što je prikazano u tablici 1 (Sluiter i sur., 2010; Sun i Cheng, 2002). Celuloza i hemiceluloza su blisko povezane te zajedno s ligninom tvore kompleksnu trodimenzionalnu strukturu pa su zbog toga otporne na oštećenja te je potrebno provesti odgovarajuće postupke predobrade lignoceluloznog materijala (Petraović Tominac i sur., 2017). Uz ova tri strukturna polimera, manje zastupljene komponente lignocelulozne biomase uključuju proteine, pepeo, organske kiseline, pektin, spojeve s dušikom i druge spojeve koji ne izgrađuju osnovnu strukturu biomase. Udio pojedinih sastojaka ovisi o biljnoj vrsti i dijelu biljke (tablica 1), starosti biljke te drugim okolišnim uvjetima (Sluiter i sur., 2010).

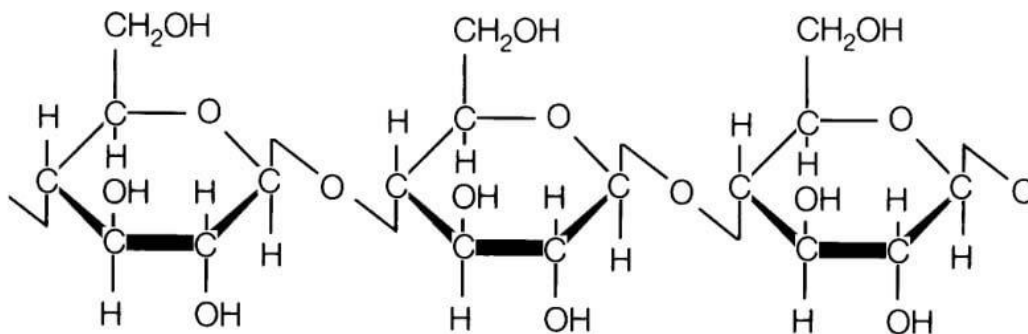
**Tablica 1.** Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u nekim lignoceluloznim materijalima (prema Sun i Cheng, 2002)

Lignocelulozni materijal	Celuloza [%]	Hemiceluloza [%]	Lignin [%]
<b>tvrdno drvo</b>	40-55	24-40	18-25
<b>meko drvo</b>	45-50	25-35	25-35
<b>slama pšenice</b>	30	50	15
<b>slama riže</b>	32,1	24	18
<b>kukuruzni oklasci</b>	45	35	15
<b>stabljika kukuruza</b>	28	28	11
<b>lišće</b>	15-20	80-85	0
<b>trava</b>	25-40	35-50	10-30

Prednosti upotrebe lignoceluloznih sirovina u odnosu na škrobne i šećerne sirovine su laka dostupnost, niska cijena i široka rasprostranjenost diljem svijeta (Isigkor i Becker, 2015). Unatoč niskoj cijeni sirovine i ostalim prednostima, uporaba lignoceluloznog otpada kao sirovine u komercijalnoj proizvodnji je rijetka zbog složene strukture, otpornosti na enzimsku i kemijsku hidrolizu i nedovoljno razvijenih metoda predobrade.

### 2.1.1. Celuloza

Celuloza je strukturni element stanične stijenke biljaka te najzastupljeniji organski polimerni materijal na svijetu. Celuloza je ugljikohidratni homogeni polimer kemijske formule  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Chen, 2014). Sastoji se od molekula D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama u ravne lance (fibrile) (slika 2). Temeljna građevna jedinica celuloze je celobioza, odnosno dimer dviju molekula glukoze. Molekula celuloze može se sastojati od nekoliko tisuća pa do preko 10 000 glukoznih jedinica (Bajpai, 2016). Linearnost bez bočnih lanaca omogućava lancima celuloze da se usko pakiraju pomoću vodikovih veza i Van der Waalsovih interakcija što čini njezinu strukturu kristaličnom (Marđetko i sur., 2018). Nakupine linearnih celuloznih lanaca (u longitudinalnom smjeru) formiraju mikrofibrile u strukturi stanične stijenke. Mikrofibrili se povezuju s hemicelulozom i ligninom te tako utječu na otpornost, vanjske stresove te mehaničku stabilnost stanične stijenke (Ilić, 2019). Kristalična struktura daje tvrdoću i čvrstoću materijalu te fleksibilnost. Isto tako, kompaktna struktura onemogućuje dostupnost glukoze celulitičkim enzimima i kemikalijama (Da Silva Perez i sur., 2010). Osim kristalične, pravilno uređene strukture, celuloza je u biomasi prisutna manjim dijelom u amorfnom, neuređenom obliku koji je podložniji enzimskoj i kiselinjskoj razgradnji. Celuloza nije topiva u vodi niti u razrijeđenim kiselinama i lužinama (Chen, 2014).



**Slika 2.** Kemijska struktura celuloze (Acharya i sur., 2012)

### 2.1.2. Hemiceluloza

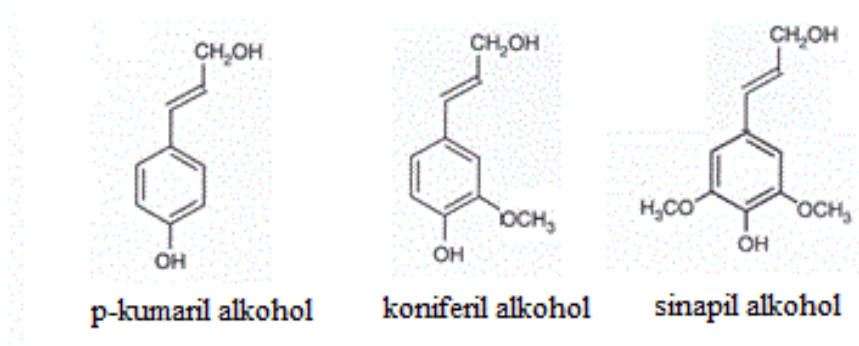
Uz celulozu, hemiceluloza čini ugljikohidratnu osnovu strukture drva te je drugi najrasprostranjeniji polimer koji sadrži oko 20-50 % biomase lignoceluloze (Bajpai, 2016). Hemiceluloza je amorfni polimer koji se sastoji od linearnih i razgranatih lanaca različitih monosaharida, L-arabinoze, D-galaktoze, D-glukoze, D-manoze i D-ksiloze (Demirbas,



2005). Okosnica hemiceluloze je homopolimer ili heteropolimer s kratkim ograncima od dva ili više monosaharida. Ogranci su na okosnicu vezani  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama te u manjoj mjeri s  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama (Bajpai, 2016). Sastav hemiceluloze ovisi o vrsti lignocelulozne biomase iz koje potječe. Na primjer, hemiceluloza dobivena od slame ili trave se uglavnom sastoji od ksilana, dok se hemiceluloza dobivena iz crnogoričnog drveća sastoji uglavnom od glukomanana (Kucharska i sur., 2018). Hemiceluloza nema kristalnu strukturu, topljiva je u vodi pri višim temperaturama, te se stoga lakše hidrolizira od celuloze (Demirbas, 2008; Beg i sur., 2001).

### 2.1.3. Lignin

Lignin je, nakon celuloze, najzastupljeniji organski polimer u biljkama, a omogućava mehaničku otpornost, hidrofobnost stanične stijenke, nepropusnost i otpornost lignoceluloznih sirovina te time pridonosi boljoj obrani protiv patogena (Bajpai, 2016; Chen, 2014). Lignin je amorfna, visoko razgranata polifenolna makromolekula kompleksne strukture, koja obično čini trećinu mase drvnog materijala. Kompliciranu strukturu lignina čine nelinearno i nasumično vezane molekule fenilpropana. Glavne fenilpropanske jedinice su koniferil alkohol, *p*-kumaril alkohol i sinapil alkohol (slika 3) zbog kojih lignin može biti podijeljen u tri različita tipa: siringil lignin, guacil lignin i hidroksifenil lignin (Kucharska i sur., 2018; Chen, 2014; Demirbas, 2008). Unutar strukture lignina postoji mnogo polarnih grupa koje međusobno stvaraju jake intramolekulske i intermolekulske vodikove veze koje omogućavaju stvaranje stabilnog kompleksa između lignina i ugljikohidratnog dijela čineći ovu cjelovitu strukturu netopljivom (Chen, 2014). Zbog kompleksne trodimenzionalne strukture, molekula lignina je teško razgradiva te je zbog toga potrebna predobrada lignocelulozne sirovine. Što je veća koncentracija lignina, lignoceluloznu sirovinu je teže enzimski i mehanički razgraditi.



**Slika 3.** Osnovna strukturna jedinica lignina (prema Chen, 2004)

#### 2.1.4. Bukva kao biotehnoška sirovina

Otpad koji nastaje od ostataka iz poljoprivrede, šumarstva, prehrambene i drvne industrije predstavlja potencijalne lignocelulozne sirovine u Republici Hrvatskoj koje bi se mogle koristiti kao temelj buduće biotehnoške proizvodnje. Lignocelulozni materijali se često smatraju otpadom ili se tradicionalno koriste na neadekvatan način. Uglavnom se ostaci drvne industrije iskorištavaju za proizvodnju toplinske i električne energije.

Obična bukva (*Fagus sylvatica*) je listopadno stablo iz porodice bukva (*Fagaceae*). Može narasti i do 40 metara te deblo može doseći 2 metra u promjeru, a krasi je bogata i razgranata krošnja (Čavlović i Anić, 2008). Najrasprostranjenija šuma u Republici Hrvatskoj s visokih 36 % udjela je bukova šuma. Također, bukva je ujedno i najzastupljenija u hrvatskoj drvnoj industriji gdje se upotrebljava kao građevno, stolarsko i tokarsko drvo, u proizvodnji stolarskih ploča, za izradu bačava, igračaka, sportskih potrepština te kao ogrjevno drvo. Što se tiče piljene građe u našim krajevima, najviše se obrađuje bukva (Ištvančić i sur., 2008). Sukladno tome, vidljivo je da bukove šume daju najviše lignoceluloznog materijala koji se može primijeniti u biotehnoške svrhe, točnije za proizvodnju biokemikalija ili bioetanol. Na temelju toga, može se razmotriti potencijal lignoceluloznih sirovina za razvoj biotehnoških procesa u Hrvatskoj.

## 2.2. ENZIMSKA HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Primjena lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biokemikalija i biogoriva zahtjeva njihovu predobradu. Lignocelulozne sirovine su teško razgradive zbog kristalične strukture celuloze i kompleksne strukturne organizacije celuloze, hemiceluloze i lignina. Sukladno tome, ovisno o vrsti lignoceluloznog materijala i željenom proizvodu, prije samog biotehnoškog procesa, potrebno je provesti odgovarajuće postupke predobrade (fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske ili biološke) (Petraović Tominac i sur., 2017; Sun i Cheng, 2002). Sve te metode predobrade provode se u cilju povećanja poroznosti sirovine, uklanjanja lignina i hemiceluloze te smanjenja kristalčnosti celuloze (Kucharska i sur., 2018).

Enzimska hidroliza je razgradnja složenih polimernih ugljikohidrata na različite jednostavnije ugljikohidrate uz primjenu enzima (Fičko, 2019). Većina ugljikohidrata lignoceluloze može se hidrolizom razgraditi do jednostavnih šećera, koji u mikrobnjoj fermentaciji služe kao izvor ugljika, te potom prevesti u brojne biotehnoške proizvode. Korisni troškovi enzimske hidrolize su niski, u usporedbi s kiselinskom ili lužnatom

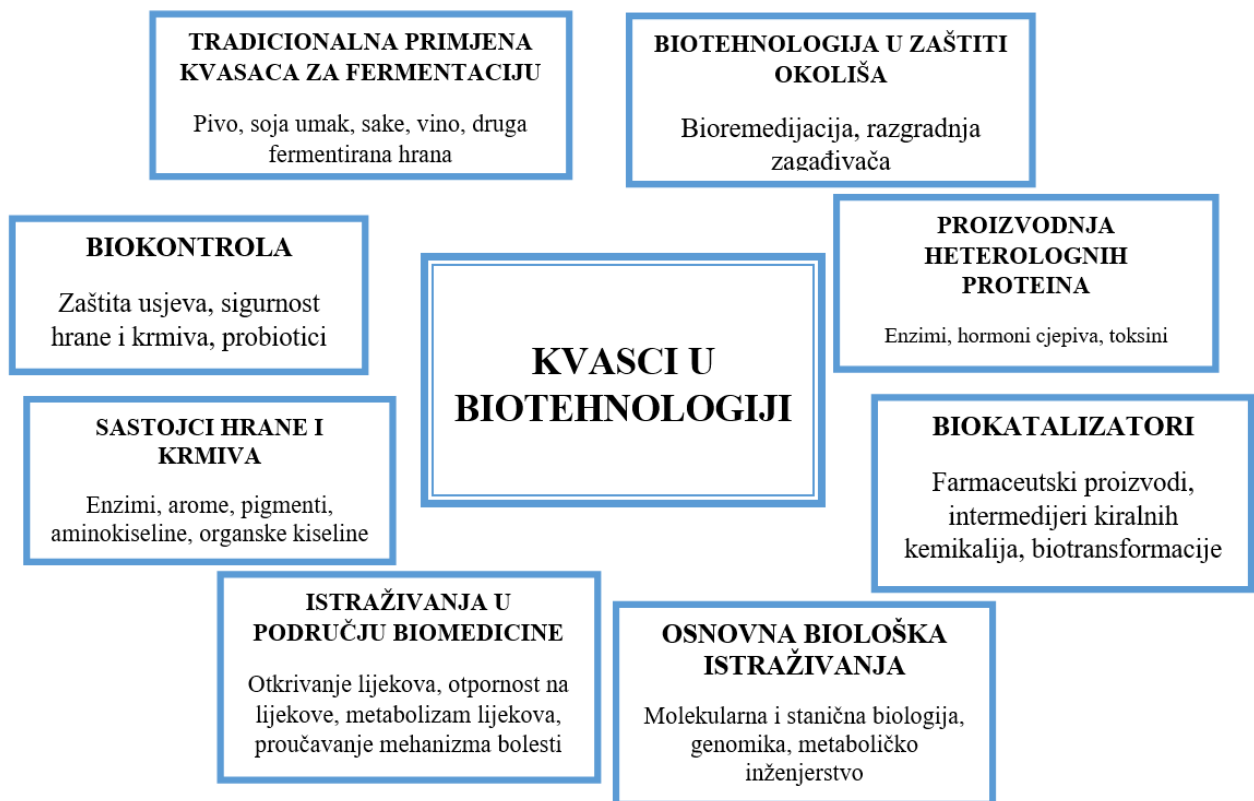
hidrolizom, jer se enzimaska hidroliza obično provodi u blagim uvjetima (pH 4,8 i temperatura 45-50 °C) s visokim prinosom željenog proizvoda te s minimalnim problemima s korozijom (Sun i Cheng, 2002). Da bi se iz celuloze dobili fermentabilni šećeri celulozu je potrebno podvrgnuti djelovanju celulitičkih enzima. Razgradnja celuloze moguća je primjenom enzima celulaza. Celulaze se mogu podijeliti u nekoliko skupina: endoglukanaze, egzoglukanaze i glikozilaze. Endonukleaze kataliziraju hidrolizu  $\beta$ -1,4-glikozidne veze unutar lanca, egzoglukanaze kataliziraju reakciju uklanjanja monomera i dimera s kraja glukoznog lanca, a glikozilaze hidroliziraju glukozne dimere (Kucharska i sur., 2018). Na taj način celulaze kataliziraju razgradnju celuloze do fermentabilnih šećera. Razgradnja celuloze je kompleksan proces, zbog postojanja celuloznih mikrofibrila koje su stabilizirane unutarnjim i vanjskim vodikovim vezama iz hemiceluloznih polisaharida poput manana i ksilana. Ksilan se hidrolizira s endoksilanazama i  $\beta$ -ksilosidazama, što uzrokuje razgradnju ksilana na jedinice ksiloze i ksilanooligosaharida (Sun i Cheng, 2002). Mjesto na kojem enzimi razgrađuju hemicelulozu ovisi o dužini lanca, stupnju grananja i prisutnosti supstituenata. Kada se radi o ligninu, za njegovu depolimerizaciju potrebne su dvije vrste enzima kao recimo hidrolaze i oksidaze. Također, moguća je biološka razgradnja lignina jer neke gljive posjeduju ove enzime (*Phanerochaete chrysosporium*) što im omogućuje korištenje lignoceluloze kao supstrata (Olsson i Hahn-Hagerdal, 1996).

Za provođenje enzimске hidrolize koriste se i lako dostupni komercijalni enzimi čiji su optimalni uvjeti za celulaze u rasponu pH od 4 do 5 i temperaturi od 50 °C (Fičko, 2019). Celulolitički enzimi koji se najčešće koriste za razgradnju celuloze su Novozymov Celluclast dobiven iz gljive *Trichoderma reesei*, koja proizvodi endoglukanaze i egzoglukanaze u velikim količinama (Verardi i sur., 2012). Novozymov Viscozyme L je kombinacija celulaza,  $\beta$ -glukanaza, hemicelulaza, ksilanaza i arabinaza, a Cellulase, enzyme blend je zasebna kombinacija celulaza. Također, u primjeni su Novozyme Cellic CTec2 koji je kombinacija celulaza, hemicelulaza i  $\beta$ -glukozidaza te Cellic HTec2 koji sadrži celulaze i endoksilanaze koje razgrađuju hemicelulozu (Verardi i sur., 2012).

### 2.3. PRIMJENA KVASCA U BIOTEHNOLOGIJI

Kvasci su jedna od najbolje proučenih skupina mikroorganizama u prirodi te je opisano više od tisuću jedinstvenih vrsta kvasca u literaturi, od kojih su mnoge kroz tisuće godina povezane s ljudskom aktivnošću (Radecka i sur., 2015). Od davnina se koriste za proizvodnju tradicionalnih biotehnoloških i prehrambenih proizvoda kao što su alkoholna pića (pivo i vino), kruh, ocat i drugi, gdje je opće poznata primjena kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, jednog od vjerojatno najstarijih komercijalno upotrebljivanih mikroorganizama, za proizvodnju etanola (Grba, 2010).

Današnjim napretkom znanosti i biotehnologije, razvojem proizvodnje rekombinantnih proteina, biološke sinteze te metaboličkog inženjerstva, dolazi do razvoja mnoštva novih područja primjene kvasaca. Prema Mattanovich i sur. (2014), tri glavna područja primjene kvasca u modernoj biotehnologiji su proizvodnja metabolita, proizvodnja rekombinantnih proteina te *in vivo* biotransformacije. Osim toga, na slici 4 su prikazana područja u kojima je moguća primjena kvasca.



**Slika 4.** Primjene kvasca u biotehnologiji (prema Johnson i Echavarri-Erasun, 2011)

Primjena kvasaca postaje sve važnija u procesu proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. Uz primjenu za proizvodnju bioetanol, koriste se za proizvodnju biogoriva te biokemikalija. Veliki broj kvasaca proizvodi različite metabolite te stoga imaju veliki potencijal u proizvodnji različitih bio-proizvoda fermentacijom različitih supstrata. Neki od proizvoda koji mogu proizvesti su 2,3-butandiol, octena kiselina, arabitol, limunska kiselina, mliječna kiselina, pirogroždana kiselina, jantarna kiselina, etil acetat te jabučna kiselina (Wu i sur., 2017).

### 2.3.1. Ne-*Saccharomyces* kvasci

*Saccharomyces cerevisiae* je jedna od najbolje poznatih vrsta kvasca s industrijskom primjenom u tradicionalnim i suvremenim biotehnološkim procesima. Vrste koje pripadaju ovom rodu mogu fermentirati veliki broj supstrata, kao glukozu, fruktozu, galaktozu, manozu i druge. Primjena genetičkog inženjerstva u suvremeno doba omogućila je razvoj novih rekombinantnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji onda mogu koristiti pentozne šećere (ksiloza, arabinoza) kao izvor ugljika što je unaprijedilo proces proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina (Dofour i sur., 2011). Proizvodnja bioetanol iz lignoceluloznih sirovina karakteristična je po stresnim uvjetima (npr. razgradnja spojeva lignina, prisutnost organskih kiselina) koji mogu dovesti do inhibicije staničnog metabolizma te shodno tome nižoj brzini fermentacije, produktivnostima bioprocasa te manjim prinosima bioetanol.

S druge strane, određene vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazuju veću otpornost prema navedenim stresnim uvjetima (Radecka i sur., 2015). Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju veliki, ali slabo iskorišten izvor bioraznolikosti, što predstavlja veliki izazov i priliku u istraživanju alternativnih kvasaca koji će biti prilagođeni stresnim uvjetima prilikom proizvodnje bioetanol (Mukherjee i sur., 2017). Većina ne-*Saccharomyces* kvasaca u literaturi je okarakterizirana kao kvasci kvarenja jer su najčešće izolirani iz kontaminirane hrane i pića, no napretkom molekularnog inženjerstva i tehnologije sekvencioniranja, otvara se mogućnost otkrivanja molekularne osnove zbog koje ovi kvasci imaju veću otpornost prema tzv. nepovoljnim ili stresnim uvjetima (Radecka i sur., 2015). Do sada je opisano nekoliko tisuća vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca uz pretpostavku da veliki broj još nije otkriven.

Pozitivna svojstva važna za industrijsku primjenu su sposobnost korištenja kompleksnih supstrata kao izvor ugljika, osmotolerantnost, rast pri niskim pH vrijednostima i

visokim temperaturama te povišena tolerancija prema inhibitorima koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina. Nekoliko vrsta kvasaca od velikog interesa su *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia stipitis* i *Kluyveromyces marxianus* (Mattanovich i sur., 2014). Prema Radecka i sur. (2015) veliku osmotolerantnost pokazao je kvasac *Zygosaccharomyces rouxii*, koji može rasti na koncentracijama šećera do 90 % (w/v), dok je kvasac *Kluyveromyces marxianus* pokazao veliku termotolerantnost zbog rasta pri temperaturama od 47, 49 i 52 °C te je proizvodio etanol na temperaturama iznad 40 °C. Nadalje, kvasac *Zygosaccharomyces bailii* poznat je po visokoj otpornosti na povišene koncentracije octene kiseline te mu je zapažen rast pri koncentraciji octene kiseline od čak 24 g L<sup>-1</sup>, dok naprotiv, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može rasti pri koncentraciji octene kiseline od 9 g L<sup>-1</sup>.

Do danas, ne-*Saccharomyces* kvasci su se više koristili kao domaćini za ekspresiju proteina, biokatalizatori te katalizatori za sintezu raznih spojeva male molekulske mase koji imaju veliku ulogu u medicini i farmaceutskoj industriji (Johnson, 2013). Sukladno tome, glavni razlozi istraživanja raznolikosti ne-*Saccharomyces* sojeva kvasaca su otkrivanje molekularnih mehanizama odgovornih za otpornost na stresne uvjete i prijenos tih svojstva u industrijske sojeve kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te otkrivanje multitolerantnih sojeva koji mogu proizvoditi etanol te imati širu primjenu u industriji (Mukherjee i sur., 2017).

### 2.3.2. Kvasac *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces marxianus* (slika 5) prvi put je opisan 1888. godine od strane E. C. Hansena. U to vrijeme ovaj kvasac je bio klasificiran kao mikroorganizam iz roda *Saccharomyces* te se nazivao *Saccharomyces marxianus*, dobivenog prema osobi koja ga je izolirala iz grožđa, Marxu. Zbog razlika u morfologiji askusa i spora, svojstva fermentacije i oksidacije različitih šećera te mogućnosti hibridizacije među sojevima u odnosu na tipične *Saccharomyces* kvasce, javila se potreba za promjenom klasifikacije *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus* i *Saccharomyces lactis* u novo nazivlje. Sukladno tome, Van der Walt je 1956. godine opisao novi rod *Kluyveromyces*, odnosno vrstu *Kluyveromyces polysporus*. Ona je pokazivala ista svojstva kao i navedene tri *Saccharomyces* vrste te su klasificirani u rod *Kluyveromyces*. Kroz povijest se taksonomija i broj vrsta unutar roda *Kluyveromyces* mijenjao te su 2003. godine prema filogenetskim svojstvima određeno šest vrsta roda *Kluyveromyces* (Fonseca i sur., 2008).



**Slika 5.** Izgled stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* (UC Davis, 2018)

Kvasci iz roda *Kluyveromyces* imaju tzv. GRAS status sigurnih mikroorganizama (Generally Regarded As Safe), pa se ti kvasci često mogu industrijski primijeniti u mnogim biotehnološkim procesima (Grba, 2010). Rod kvasaca *Kluyveromyces* ima dobru sposobnost fermentacije, a pripadaju mu vrste koje mogu rasti na galaktozi, laktozi, fruktozi i ksilozi (Dufour i sur., 2011). Među vrstama kvasaca iz roda *Kluyveromyces*, od velikog interesa za biotehnološku primjenu je soj kvasca *Kluyveromyces marxianus* (Petraović-Tominac i sur., 2017). Osim biotehnološke proizvodnje bioetanola, kvasac nalazi primjenu u proizvodnji biomase, komercijalno zanimljivih enzima poput  $\beta$ -galaktozidaze,  $\beta$ -glukozidaze, endopoligalaktorunaze te inzulinaze (tablica 2) (Rajoka i sur., 2003). Također se može koristiti kao izvor enzima koji se rjeđe primjenjuju u industriji, a to su aminopeptidaze, protein-fosfataze te karboksipeptidaze.

**Tablica 2.** Enzimi koje proizvode kvasci iz roda *Kluyveromyces marxianus* te njihova upotreba (prema Fonseca i sur., 2008)

Enzim	Upotreba	Soj
inzulinaza	proizvodnja fruktoznog sirupa iz zaliha hranjivih tvari koje sadrže inulin	<i>K. marxianus</i> CBS 6397; <i>K. marxianus</i> CBS 6556
$\beta$ –galaktozidaza	redukcija laktoze sadržane u hrani	<i>K. marxianus</i> NCYC 111; <i>K. marxianus</i> ATCC 10022; <i>K. marxianus</i> IMB3; <i>K. marxianus</i> CBS 6556
endopoligalaktorunaza	smanjenje viskoznosti produktima prerade voća	<i>K. marxianus</i> CCT 3172; CCT 3172 (mutant); neidentificiran izolat (NCYC)
protein fosfataza	modifikacija sira	<i>K. marxianus</i> (neodređen soj)
karboksipeptidaza	smanjenje gorkog okusa hrane koja sadrži proteine	<i>K. marxianus</i> (vlastiti izolat)
aminopeptidaza	Izravna prerada ili starenje mliječnih ili proizvoda prerade mesa	<i>K. marxianus</i> (vlastiti izolat)

Česta upotreba kvasca *Kluyveromyces marxianus* proizašla je iz mnogih prednosti koje ga čine zanimljivim za industrijsku proizvodnju. *Kluyveromyces marxianus* zanimljiv je znanstvenicima zbog svoje termotolerantnosti što ga čini pogodnim za industrijski primjenu upravo u procesima koji se odvijaju pri višim temperaturama. Termotolerancija kvascu omogućuje rast pri temperaturama do 52 °C te mogućnost fermentacije iznad 40 °C (Petravić-Tominac i sur., 2017; Goshima i sur., 2013; Fonseca i sur., 2008; Rajoka i sur., 2003). Prilikom sposobnosti fermentacije glukoze u etanol, tolerancija svih vrsta prema visokim



temperaturama se smanjuje, što nije slučaj kod kvasca *Kluyveromyces marxianus*, koji je termotolerantniji od kvasaca rodova *Saccharomyces*, što zauzvrat može proizvesti veće prinose etanola (Fonseca i sur., 2008). Sukladno tome, kvasac *Kluyveromyces marxianus* se smatra mogućom alternativom kvascu *S. cerevisiae* u proizvodnji bioetanola kao biogoriva.

Proizvodnja etanola na povišenim temperaturama dobila je veliku pozornost zbog potencijalnih ušteda, točnije smanjenja troškova hlađenja, rizika od kontaminacije i jednostavnijeg uklanjanja etanola, te povećanja produktivnosti postrojenja. Također, ovaj kvasac ima mogućnost korištenja širokog spektra šećera te jednu od najvećih specifičnih brzina rasta među svim kvascima uz nastajanje minimalnih količina nusprodukata fermentacije (Lane i sur., 2011). Unatoč mogućnosti rasta na visokim temperaturama (iznad 40 °C), postoji problem zbog prevođenja velike količine ksiloze u ksilitol, a ne u etanol, što se nepovoljno može odraziti na ekonomičnost procesa proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina. Točnije, moguć je negativan utjecaj temperature na prinos etanola, vitalnost stanica i toleranciju na etanol (Lane i sur., 2011; Fonseca i sur., 2008; Banat i sur., 1992).

#### **2.4. PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA**

Nusprodukt fermentacije, 2,3-butandiol je svestrana kemikalija koja ima široku primjenu u brojnim potrošačkim i industrijskim proizvodima, poput kozmetike, hrane, transportnih goriva, lijekova i polimera (Kim i sur., 2016). Također vrlo je važan za razne kemijske sirovine i goriva, te se može dobiti biokoverzijom prirodnih resursa (Syu, 2001). U većini mikrobnih procesa, dostupnost jeftinih lignoceluloznih sirovina je preduvjet za razvoj ekonomičnog procesa fermentacije. U proizvodnji 2,3-butandiola iz lignoceluloznih sirovina, većina studija je usredotočena na bakterijsku fermentaciju pomoću bakterija *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca* i *Enterobacter aerogenes*, no proizvodnja različitih nusproizvoda ometala je upotrebu za industrijsku fermentaciju (Ping Zeng i sur., 1990; Kim i sur., 2013). Nasuprot tome, *Saccharomyces cerevisiae* je GRAS mikroorganizam koji se naširoko koristi u industrijskim fermentacijskim procesima proizvodnje raznih biokemikalija i biogoriva (Lee i Seo, 2019; Kim i sur., 2016). Prema Kim i sur. (2013), prilikom proizvodnje 2,3-butandiola iz ksiloze koja je bila prisutna u lignoceluloznom hidrolizatu, korišten je genetički modificiran kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Razlog tomu je što kvasac ne može fermentirati ksilozu i zbog toga je genetičkim metodama bilo potrebno uvesti mutante kako bi se povećao protok ugljika prema proizvodnji 2,3-butandiola umjesto etanola.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena u ovom radu je kolač bukve (slika 6) koji je dobiven s područja sjeverozapadne Hrvatske. Bukva je korištena u obliku smrznutog kolača koji je prethodno obrađen kiselinom hidrolizom s 0.5 %  $H_2SO_4$  u visokotlačnom reaktoru na 180 °C tijekom 10 min. Nakon toga, smrznuti kolač bukve otopljen je u vrućoj vodi te ostavljen na sušenje u sušioniku nekoliko dana pri temperaturi od 50 °C uz povremeno miješanje i prevrtanje.



**Slika 6.** Izgled sirovine nakon sušenja (*vlastita fotografija*)

#### 3.1.2. Enzimi

Za provedbu enzimske hidrolize predobrađene lignocelulozne sirovine korišteni su komercijalni pripravci enzima:

Viscozyme L (Novozyme, Danska) – mješavina celulolitičkih enzima, sinonim: lizirajući enzimi iz *Aspergillus* sp.

Cellulase, enzyme blend (Sigma-Aldrich, Njemačka) – mješavina celulolitičkih enzima, sinonim: Cellic CTec2.

### 3.1.3. Radni mikroorganizam

U ovom radu kao radni mikroorganizam, korišten je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 iz zbirke organizama „NITE Biological Resource Center“ (NBRC, Japan).

### 3.1.4. Kemikalije

**Tablica 3.** Popis kemikalija korištenih u radu

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
<b>natrijev acetat trihidrat</b>	p.a.	Merck, Njemačka
<b>octena kiselina</b>	za upotrebu u biotehnologiji	Alkaloid, Skopje
<b>cinkov sulfat heptahidrat</b>	p.a.	Merck, Njemačka
<b>D(+)-glukoza (bezvodni)</b>	p.a.	Kemika, Hrvatska
<b>kvašćev ekstrakt</b>	-	Merck, Njemačka
<b>pepton</b>	-	Merck, Njemačka
<b>diamonijev sulfat</b>	p.a.	Kemika, Zagreb
<b>diamonijev fosfat</b>	p.a.	Kemika, Zagreb
<b>magnezijev sulfat heptahidrat</b>	p.a.	Kemika, Zagreb
<b>kalijev heksacijanoferrat trihidrat</b>	p.a.	Kemika, Zagreb
<b>natrijev hidroksid</b>	p.a.	Kemika, Zagreb
<b>sumporna kiselina</b>	p.a.	Kemika, Zagreb
<b>demineralizirana voda</b>	p.a.	PBF, Zagreb

#### 3.1.4.1. Priprema acetatnog pufera

Za pripremu pola litre 0,05 M acetatnog pufera pH 5 korišteno je 1,381 grama natrijevog acetata (tablica 3) i 467,2  $\mu$ L octene kiseline (tablica 3) (0,2 M) u tikvici od 1 L te je tikvica nadopunjena demineraliziranom vodom. Za pripremu pola litre 0,01 M acetatnog pufera pH 5 korišteno je 0,276 g natrijevog acetata i 93,3  $\mu$ L octene kiseline (0,2 M) u tikvici od 1 L, te je tikvica nadopunjena demineraliziranom vodom.

## 3.2. APARATURA I PRIBOR

### 3.2.1. Laboratorijski pribor

- Büchenrov lijevak
- eppendorf kivete
- Erlenmayerove tikvice 300 – 3000 mL
- filteri, veličina pora 0,45  $\mu\text{m}$
- filter papir, veličina pora 0,45 mm
- mikrobiološka ušica
- najlonski filteri promjera pora 0,2  $\mu\text{m}$
- plastične kivete
- staklene epruvete od 10 do 15 mL
- staklene i plastične čaše
- staklene i plastične menzure
- staklene odmjerne tikvice različitih volumena
- staklene pipete različitih volumena

### 3.2.2. Uređaji i instrumenti

- analitička vaga Acculab ALC210.4, Njemačka
- analitička vaga, Sartorius, Velika Britanija
- autoklav, Instrumentaria, Hrvatska
- autoklav, Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
- centrifuga SL 8R ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, SAD
- laboratorijska centrifuga Rotofix 32, Hettich, Njemačka
- laminar s UV lampom (30 W), Klimaoprema, Hrvatska
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD
- rotacijska tresilica Certomat IS, Braun, Velika Britanija
- sušionik ST-01/02, Instrumentaria, Hrvatska
- termostat, Instrumentaria ST-50, Zagreb, Hrvatska
- UV-VIS Spektrofotometar UNICAM, HELIOS  $\beta$ , Velika Britanija

### 3.2.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *High Pressure Liquid Chromatography, HPLC*)

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10ADV), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 ADV), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 µm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Kromatograf je korišten za određivanje nastalih produkata u uzorcima nakon provedenog uzgoja divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Za analizu je injektirano 20 µL uzorka u sustav za protok mobilne faze od 0,5 mL/min, a kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone iznosila je 55 °C. Nakon detekcije na detektoru indeksa loma, obrada dobivenih kromatograma napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju.

### 3.2.4. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. *Ultra performance Chromatography, UPLC*)

Uređaj tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji se od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex) dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS).

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Enzimska hidroliza kolača bukve u Erlenmayer tikvicama

Postupak enzimske hidrolize predobrađenog kolača bukve proveden je pomoću komercijalnih enzima Viscozyme L i Cellulase enzyme blend. U dvije Erlenmayerove tikvice od 500 mL stavljeno je po 100 mL prethodno pripremljenog acetatnog pufera (0,01 M i 0,05 M) te u treću tikvicu 100 mL demineralizirane vode. U svaku tikvicu je dodano 4 grama kolača bukve te su tikvice zatvorene vatenim čepom i sterilizirane. Nakon sterilizacije i hlađenja, u sterilnu suspenziju kolača bukve dodano je 2 % (vol vol<sup>-1</sup>) enzima Cellulase enzyme blend te 5 % (vol vol<sup>-1</sup>) enzima Viscozyme L na ukupni volumen tikvice. Postupak je

proveden u sterilnim uvjetima. Nakon toga, hidroliza je provedena na magnetnoj mješalici tijekom 96 sati pri temperaturi od 50 °C. Izuzimani su uzorci od 2 mL nakon dodatka enzima, nakon 24 h i 96 h te su ti uzorci pripremljeni za UPLC analizu.

Nakon provedene enzimske hidrolize u različitim medijima (0,01 M i 0,05 M acetatnom puferu te demineraliziranoj vodi) te provedene UPLC analize utvrđeno je da je najbolji medij za hidrolizu kolača bukve 0,01 M acetatni pufer. Nakon toga je pufer pripremljen u volumenu od 3 L, te je u pufer dodano 223 grama kolača bukve. Enzimska hidroliza je provedena dodatkom 2 % (vol vol<sup>-1</sup>) enzima Cellulase enzyme blend te 5 % (vol vol<sup>-1</sup>) Viscozyme L tijekom 48 h pri 50 °C na magnetnoj miješalici. Hidrolizat je nakon završene hidrolize steriliziran te profiltriran kroz Büchnerov lijevak. Izuzeti su uzorci od 2 mL prije i nakon završetka hidrolize te pripremljeni za UPLC analizu.

### 3.3.2. Priprema i analiza uzoraka UPLC metodom

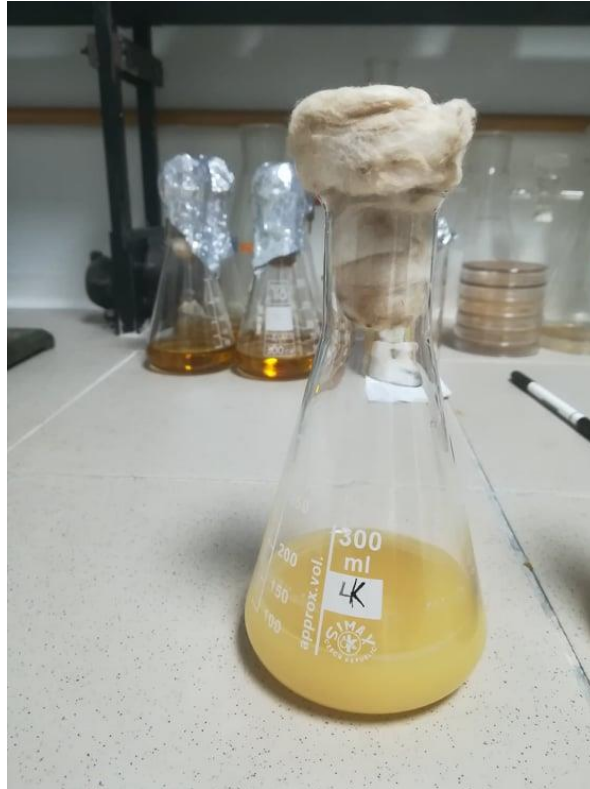
U izuzetim uzorcima najprije je zaustavljena enzimska reakcija zagrijavanjem u Thermo-Shakeru pri temperaturi od 95 °C tijekom 10 min te su zatim uzorci centrifugirani 10 minuta. Uzeto je 750 µL supernatanta te dodano 750 µL cinkovog sulfata (100 g L<sup>-1</sup>) kako bi se istaložili proteini. Smjesa je promiješana i ostavljena da stoji 5 minuta te nakon toga centrifugirana 6 minuta kako bi se izdvojili istaloženi proteini. Dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice s najlonskim filterom promjera pora 0,2 µm. Nakon toga su ti pripremljeni uzorci analizirani UPLC metodom.

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) korištena je za određivanje koncentracija šećera i inhibitora u hidrolizatu bukve. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline uz protok 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Analitička kolona (Rezex ROA Organic Acid H+, Phenomenex) s pretkolonom zagrijavana je na 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID), a obrada kromatograma napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Koncentracije u uzorcima izračunate su iz dobivenih baždarnih pravaca.

### 3.3.3. Priprema inokuluma kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Prije uzgoja pripremljeno je 100 mL YPD (eng. *Yeast Extract-Peptide-Dextrose Broth*) podloge za inokulum. Za pripremu podloge korišteno je 20 g L<sup>-1</sup> glukoze, 10 g L<sup>-1</sup> peptona, 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta te demineralizirana voda. Kvasac je naciepljen pomoću mikrobiološke ušice, iz čvrste podloge, u 10 mL YPD tekuće podloge te je uzgajan tijekom 48

h. Uzgojen inokulum u volumenu od 10 ml je nakon 48 sati nacijepljen u 100 mL YPD hranjive podloge u sterilnim uvjetima. Inokulum je dalje uzgajan na laboratorijskoj tresilici, pri 29 °C, 100 o min<sup>-1</sup>, tijekom 24 sata.



**Slika 7.** Pripremljeni inokulum kvasca *Kluyveromyces marxianus* (vlastita fotografija)

#### 3.3.4. Uzgoj divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* na hidrolizatu bukve

Kako bi se odredili optimalni uvjeti uzgoja za divlji soj kvasca *Kluyveromyces marxianus*, divlji soj kvasca uzgajan je na hidrolizatu u različitim uvjetima (sastav podloge, pH, temperatura, aeracijski efekt).

#### 3.3.5. Utjecaj različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Uzgoj biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* proveden je pri različitom sastavu podloge kako bi se utvrdilo u kojem sastavu podloge kvasac najbolje raste. Sastavi korištenih hranjivih podloga i pripadajuće oznake navedeni su u tablici 4. Prije uzgoja, sadržaj tikvica bez inokuluma je steriliziran. Nakon sterilizacije dodan je inokulum te je uzgoj proveden na laboratorijskoj tresilici (slika 8) pri 100 o min<sup>-1</sup>, 29 °C, pH vrijednosti 4,4 tijekom 24 sata.

Porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase određena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.



**Slika 8.** Pripremljene tikvice za uzgoj na laboratorijskoj tresilici (*vlastita fotografija*)



**Tablica 4.** Sastav hranjive podloge za uzgoj divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* s pripadajućim oznakama

Oznaka	a	b	c	d	e
Sastav	90 mL hidrolizata bukve	90 mL hidrolizata bukve	90 mL hidrolizata bukve	90 mL hidrolizata bukve	90 mL hidrolizata bukve
	10 mL YPD podloge	10 mL YPD podloge	10 mL YPD podloge	10 mL YPD podloge	10 mL YPD podloge
		2 g L <sup>-1</sup> DAF (diamonijev fosfat)	2 g L <sup>-1</sup> DAF (diamonijev fosfat)	2 g L <sup>-1</sup> DAF (diamonijev fosfat)	2 g L <sup>-1</sup> DAF (diamonijev fosfat)
		2 g L <sup>-1</sup> DAS (diamonijev sulfat)	2 g L <sup>-1</sup> DAS (diamonijev sulfat)	2 g L <sup>-1</sup> DAS (diamonijev sulfat)	2 g L <sup>-1</sup> DAS (diamonijev sulfat)
			0,5 g L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub>	5 g L <sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta	5 g L <sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta
				10 g L <sup>-1</sup> octene kiseline	

### 3.3.6. Utjecaj različite vrijednosti pH na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca

#### *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Hranjiva podloga koja je pripravljena se sastojala od 10 mL YPD podloge te 90 mL hidrolizata bukve (tablica 4, oznaka „a“). Proveden je uzgoj kvasca u uvjetima različitih pH vrijednosti, a to su 3,7; 4,4 i 5,1. pH vrijednosti su podešavane pomoću 10 %-tne otopine amonijaka te 20 %-tne otopine sumporne kiseline. Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min<sup>-1</sup>, 33 °C tijekom 24 sata. Porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase odrađena je gravimetrijski te su pripravljeni uzorci za HPLC analizu.

3.3.7. Utjecaj stupnja aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Različit stupanj aeracije osiguran je uzgojem divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* u različitim volumenima podloge (60, 90 i 120 mL) u kojima udio YPD podloge iznosi 10 % (vol vol<sup>-1</sup>). Uzgoj kvasca proveden je semiareobno na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min<sup>-1</sup> i temperaturi 25 °C pH vrijednosti 4,4 tijekom 24 sata. Porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase odrađena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.

3.3.8. Utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Hranjiva podloga koja je pripremljena se sastojala od 10 mL YPD podloge te 90 mL hidrolizata bukve (tablica 4, oznaka „a“) te je proveden uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* u uvjetima različitih vrijednosti temperature (25 °C, 29 °C i 33 °C). Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min<sup>-1</sup>, pH vrijednosti 4,4 tijekom 24 sata. Porast biomase praćen je spektrofotometrijski izuzimanjem uzoraka iz tikvica tijekom prvih deset sati uzgoja te nakon 24 sata. Nakon uzgoja koncentracija biomase odrađena je gravimetrijski te su pripremljeni uzorci za HPLC analizu.

## 3.4. ANALITIČKE METODE

### 3.4.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase

Koncentracija biomase je određivana gravimetrijski. U prethodno izvagane kivete uzeto je po 5 mL kvaščeve suspenzije nakon provedenog uzgoja te centrifugirano 10 min pri 4000 o min<sup>-1</sup>. Supernatant je odekantiran, a kivete s talogom biomase stavljene na sušenje do konstantne mase. Nakon sušenja, kivete su izvagane te je iz razlike mase pune i prazne kivete određena koncentracija biomase.

### 3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije biomase

Tijekom prvih deset sati te nakon sata uzgoja, uziman je 1 mL uzorka iz tikvica u sterilnim uvjetima te je koncentracija biomase određivana spektrofotometrijski. Uzorak je stavljen u kivete te mu je izmjerena apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm.

### 3.4.3. Priprema uzoraka nakon uzgoja kvasca za HPLC analizu nastalih produkata

Nakon provedenog uzgoja potrebno je pripremiti uzorke za HPLC analizu. Sadržaj tikvice je preliven u plastičnu kivetu, a iz tog sadržaja 25 mL je prebačeno u odmjernu tikvicu od 50 mL, to jest razrijeđeno je dva puta. U odmjernu tikvicu je zatim dodano 5 mL Carrez I (kalij-heksacijanoferrat trihidrat,  $\gamma=36 \text{ gL}^{-1}$ ) te 5 mL otopine Carrez II (cinkov sulfat heptahidrat,  $\gamma=300 \text{ gL}^{-1}$ ) da bi se istaložili proteini. Nakon toga provedena je neutralizacija uzorka s 2 M NaOH do pH vrijednosti  $8,0 \pm 0,5$ . Volumen tikvice je nadopunjen destiliranom vodom do 50 mL te se nakon toga cijeli sadržaj tikvice profiltrirao kroz filter papir veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  te kroz najlonski filter veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. PRIREMA HIDROLIZATA BUKVE

U ovom radu provedena je enzimaska hidroliza kiselinski predobrađenog čipsa bukve sa smjesom dvaju komercijalnih enzima Viscozyme L (Novozyme) i Cellulase, enzyme blend (Sigma-Aldrich). Iz eksperimentalnog rada (Fičko, 2019) može se zaključiti da korištenje kombinacije Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend u enzimskoj hidrolizi predobrađenih kukuruznih oklasaka dovodi do međudjelovanja enzima te poboljšane hidrolize u usporedbi s hidrolizom pomoću pojedinačnih enzima. Ustanovljeno je da Viscozyme L ima veći utjecaj na hidrolizu ksilana, a Cellulase, enzyme blend na hidrolizu glukana.

Kiselinska predobrada sirovine provedena je u blagim uvjetima pomoću razrijeđene sumporne kiseline, pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta (Ilić, 2019). S ciljem utvrđivanja u kojem mediju hidroliza rezultira s najvećom koncentracijom šećera i najmanjom koncentracijom inhibitora, hidroliza je provedena u acetatnom puferu koncentracija 0,01 M; 0,05 M te u vodi. Provedena je u sterilnim uvjetima, u termostatu pri temperaturi 50 °C, pH vrijednosti 5 tijekom 96 sati. Izuzimani su uzorci od 2 mL prije hidrolize (0 h) nakon 24 sata i 96 sati te su ti uzorci pripremljeni te analizirani UPLC analizom. Rezultati UPLC analize su prikazani u tablici 5.

**Tablica 5.** Koncentracije šećera u uzorcima prije i nakon (24 h i 96 h) provedene enzimske hidrolize čvrstog dijela hidrolizata bukve

Koncentracija pojedinih spojeva g L <sup>-1</sup>	glukoza	ksiloza	octena kis.
0,01 M / 0h	5,53	4,33	0,44
0,05 M / 0h	4,83	3,37	1,65
voda / 0h	4,66	3,25	0,08
0,01 M / 24h	10,32	4,81	0,37
0,05 M / 24h	9,91	3,88	1,61
voda / 24h	9,20	3,97	0,05
0,01 M / 96h	14,38	6,02	0,45
0,05 M / 96h	12,90	4,66	1,81
voda / 96h	12,83	4,95	0,09

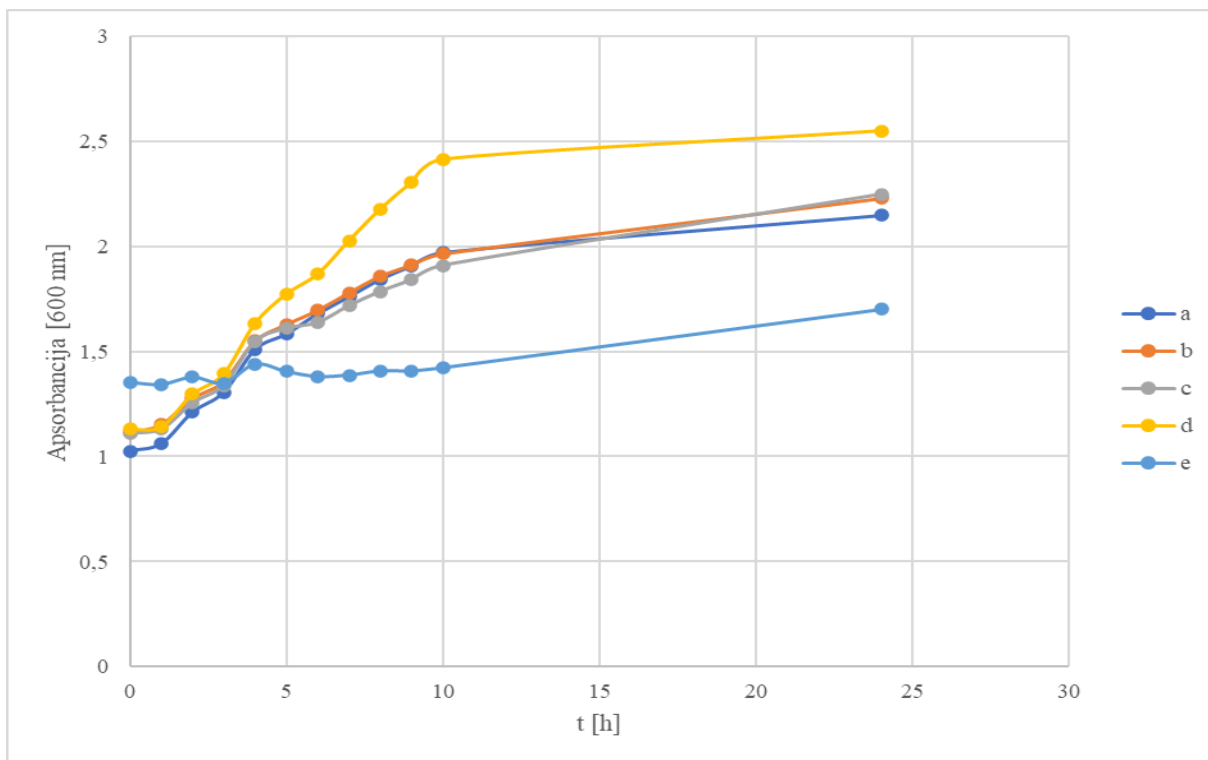
Prema rezultatima prikazanim u tablici, utvrđeno je da je najpogodniji pufer za provedbu hidrolize 0,01 M acetatni pufer, iz razloga što je u tim uvjetima dobivena najveća koncentracija glukoze ( $14,38 \text{ g L}^{-1}$ ) i ksiloze ( $6,02 \text{ g L}^{-1}$ ) te je on odabran za daljnje provođenje enzimske hidrolize u većem mjerilu. Dobivene vrijednosti koncentracija glukoze i ksiloze su otprilike 10 % veće od vrijednosti dobivenih u vodi te 0,05 M acetatnom puferu te je zbog toga odabran 0,01 M acetatni pufer za provođenje hidrolize. Najviša vrijednost octene kiseline zabilježena je korištenjem 0,05 M acetatnog pufera nakon 96 sati hidrolize i iznosila je  $1,81 \text{ g L}^{-1}$ . Visoke vrijednosti octene kiseline potječu iz acetatnog pufera te mogu negativno utjecati na rast stanica kvasca. Nakon završetka hidrolize uzet je uzorak iz tikvice koji je podvrgnut UPLC analizi te je time dobivena početna koncentracija glukoze za uzgoj od  $65,34 \text{ g L}^{-1}$  i koncentracija ksiloze  $4,75 \text{ g L}^{-1}$ .

## **4.2. KINETIKA RASTA I FERMENTACIJE DIVLJEGA SOJA KVASCA** *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

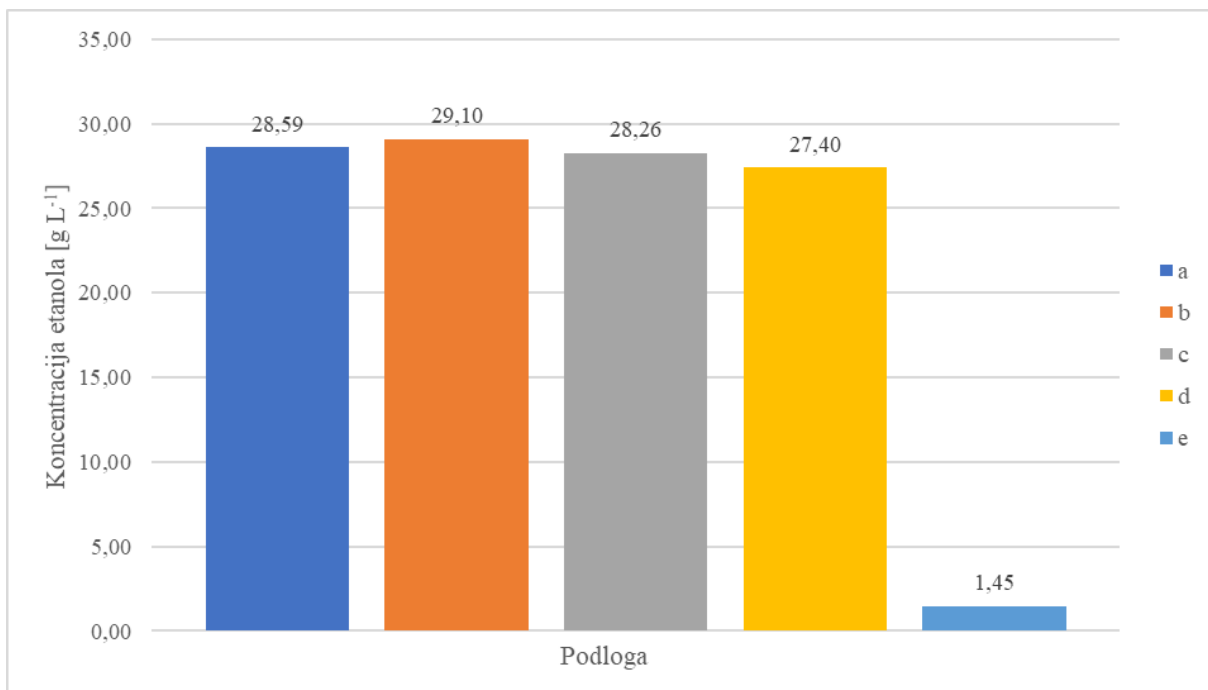
### 4.2.1. Utjecaj različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Kako bi se utvrdilo koji sastav podloge najbolje odgovara rastu i fermentaciji divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777, u YPD podlogu dodano je 90 mL enzimskog hidrolizata čvrstog dijela bukve. Uz to dodavani su izvori biogenih elemenata (kemijski spojevi – DAS (diamonijev sulfat), DAF (diamonijev fosfat),  $\text{MgSO}_4$  (magnezijev sulfat), HAc (octena kiselina) te kompleksni sastojci hranjive podloge, a to su kvaščev ekstrakt te YPD podloga. Sastav hranjivih podloga te oznake prikazane su u tablici 4.

Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici pri  $100 \text{ o min}^{-1}$ , temperaturi  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  i pH vrijednosti 4,4 tijekom 24 sata. Rast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti praćeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 9-11 te u tablici 6.



**Slika 9.** Rast divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u hranjivim podlogama različitog sastava (podloga a-e, tablica 4) na laboratorijskoj tresilici ( $100 \text{ o min}^{-1}$  /  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  / pH 4,4/ 24 h)

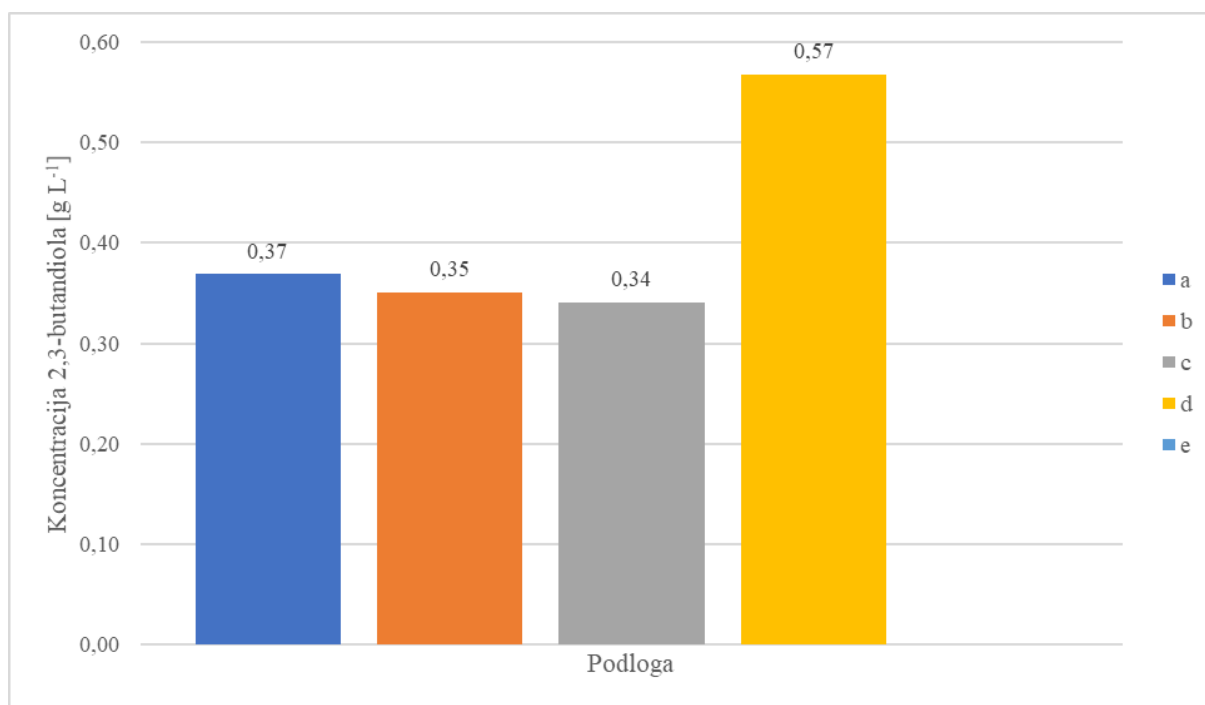


**Slika 10.** Koncentracija proizvedenog etanola na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u hranjivim podlogama različitog sastava (podloga a-e, tablica 4) na laboratorijskoj tresilici ( $100 \text{ o min}^{-1}$  /  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  / pH 4,4)

**Tablica 6.** Koncentracija biomase određena gravimetrijski nakon uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 pri različitom sastavu hranjive podloge navedenom u tablici (4)

Podloga	a	b	c	d	e
Koncentracija biomase (g L <sup>-1</sup> )	3,43	2,94	3,31	5,59	1,32

Praćenjem utjecaja različitog sastava podloge na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 provedenog na laboratorijskoj tresilici utvrđeno je da je najbolji sastav podloge za uzgoj označen oznakom d (tablica 4). Podloga pod oznakom d se sastoji od 90 mL hidrolizata bukve, 10 mL YPD podloge, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata (DAF), 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata (DAS) i 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta te je korištenjem te podloge postignut najveći prirast biomase od 5,59 g L<sup>-1</sup>. Nasuprot tome, najmanji prirast biomase postignut je korištenjem podloge e (tablica 4) koja je sadržavala još i 10 g L<sup>-1</sup> octene kiseline. Tijekom prethodne obrade sirovine nastaje niz kemijskih spojeva koji inhibiraju rast mikroorganizama te je jedan od njih i octena kiselina (Ivančić Šantek i sur., 2016). Razlog niskoj vrijednosti koncentracije biomase moguć je zbog visoke koncentracije octene kiseline koja može imati inhibicijski utjecaj na rast kvasca. Također octena kiselina može imati negativan utjecaj i na proizvodnju etanola (Oliva i sur., 2006). Sukladno tome i na slici 10 prikazana je najniža vrijednost koncentracije etanola postignuta korištenjem hranjive podloge pod oznakom e (tablica 4) te iznosi 1,45 g L<sup>-1</sup>, što je vjerojatno utjecaj visoke koncentracije octene kiseline prisutne u hranjivoj podlozi. Quyen i Nam (2016) su prikazali kako je povećanje koncentracije octene kiseline od 0 do 8 g L<sup>-1</sup> povezano sa smanjenjem koncentracije etanola, asimilacijom glukoze te inhibicijom rasta kvasca *K. marxianus*. Najviša koncentracija proizvedenog etanola zabilježena je korištenjem hranjive podloge pod oznakom b (tablica 4) te iznosi 29,10 g L<sup>-1</sup>. Korištenje kvašćevog ekstrakta može poboljšati rast i fermentaciju kvasca zbog toga što se on primarno sastoji od aminokiselina, peptida, nukleotida i drugih topljivih komponenti stanica kvasca (Jin In i sur., 2005). Prema istraživanju Zafar i Owais (2006), korištenjem kvašćevog ekstrakta (5 g L<sup>-1</sup>) i kvasca *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1288 u proizvodnji etanola iz sirutke u malom mjerilu, nastalo je 2,1 g L<sup>-1</sup> etanola te 8,9 g L<sup>-1</sup> biomase, što je izrazito nisko za razliku od rezultata dobivenih u provedenom eksperimentu.



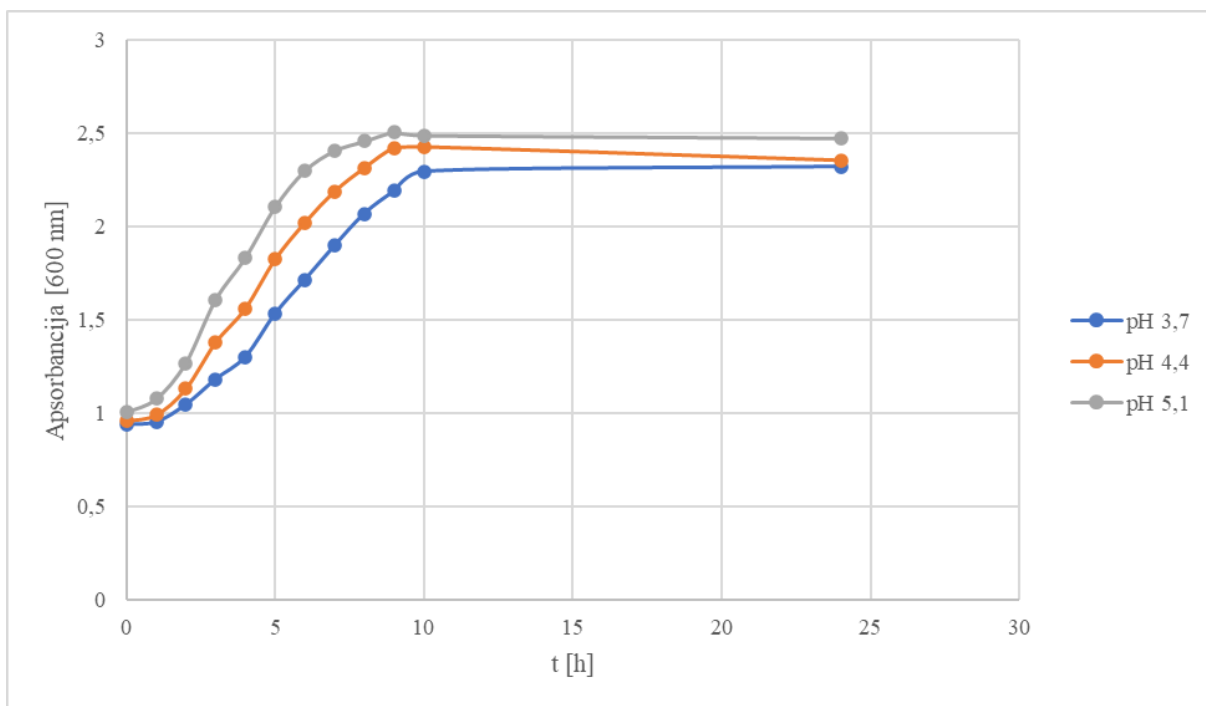
**Slika 11.** Koncentracija proizvedenog 2,3-butandiola na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u hranjivim podlogama različitog sastava (podloga a-e, tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/ 29 °C/ pH 4,4/ 24 h)

Uz etanol, zabilježen je nastanak određene koncentracije 2,3-butandiola, pri čemu je najviša koncentracija od 0,57 g L<sup>-1</sup> postignuta u hranjivoj podlozi pod oznakom d (tablica 4). Suprotno tome, u podlozi e (tablica 4) 2,3-butandiol nije detektiran. Kako octena kiselina utječe na prinos etanola, tako može utjecati na prinos 2,3-butandiola. Niske koncentracije octene kiseline (1-5 g L<sup>-1</sup>) mogu poboljšati fermentaciju, dok koncentracije iznad 10 g L<sup>-1</sup> mogu imati inhibitorski učinak na proizvodnju 2,3-butandiola (Ping Zeng i sur., 1990), što je bio slučaj i u ovom radu.

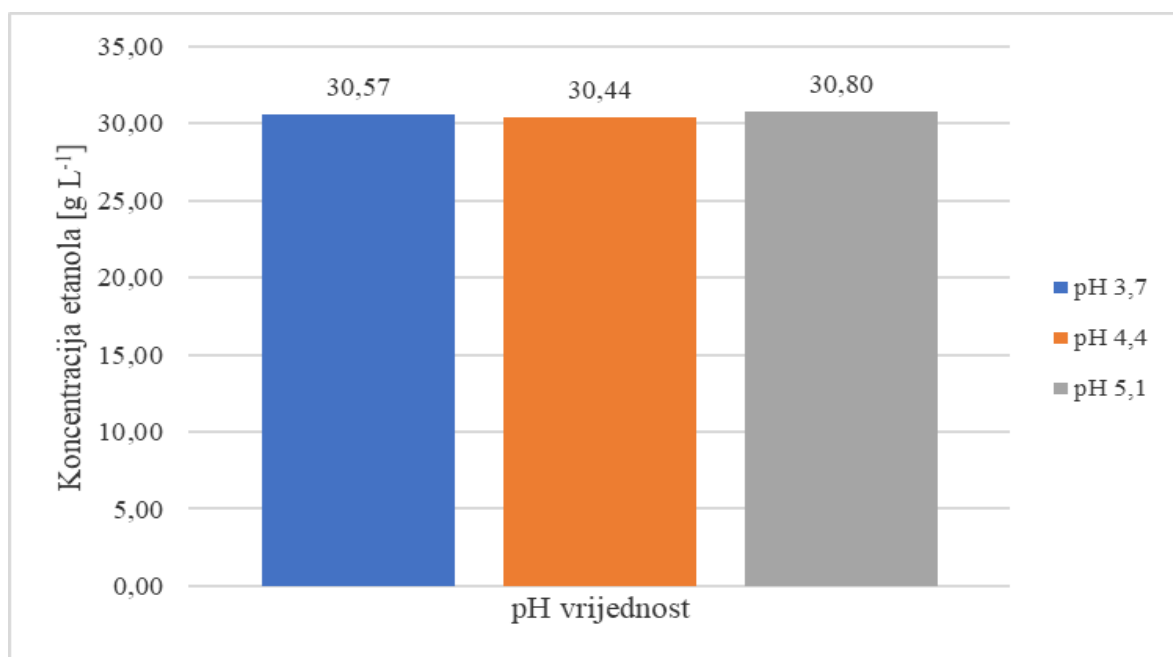
#### 4.2.2. Utjecaj pH vrijednosti na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Kako bi se utvrdilo koja pH vrijednost najbolje odgovara rastu i fermentaciji divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777, u hranjivu podlogu koja je sadržavala 10 % (v/v) YPD podloge dodano je 90 mL enzimskog hidrolizata čvrstog dijela bukve (tablica 4 – oznaka d). Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min<sup>-1</sup> i temperaturi 33 °C tijekom 24 sata. Uzgoj je proveden pri različitim pH vrijednostima (3,7; 4,4; 5,1). Rast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti praćeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 12-14 te u tablici 7.





**Slika 12.** Rast biomase divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) pri različitim pH vrijednostima (3,7; 4,4; 5,1) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/ 33 °C/ 24 h)

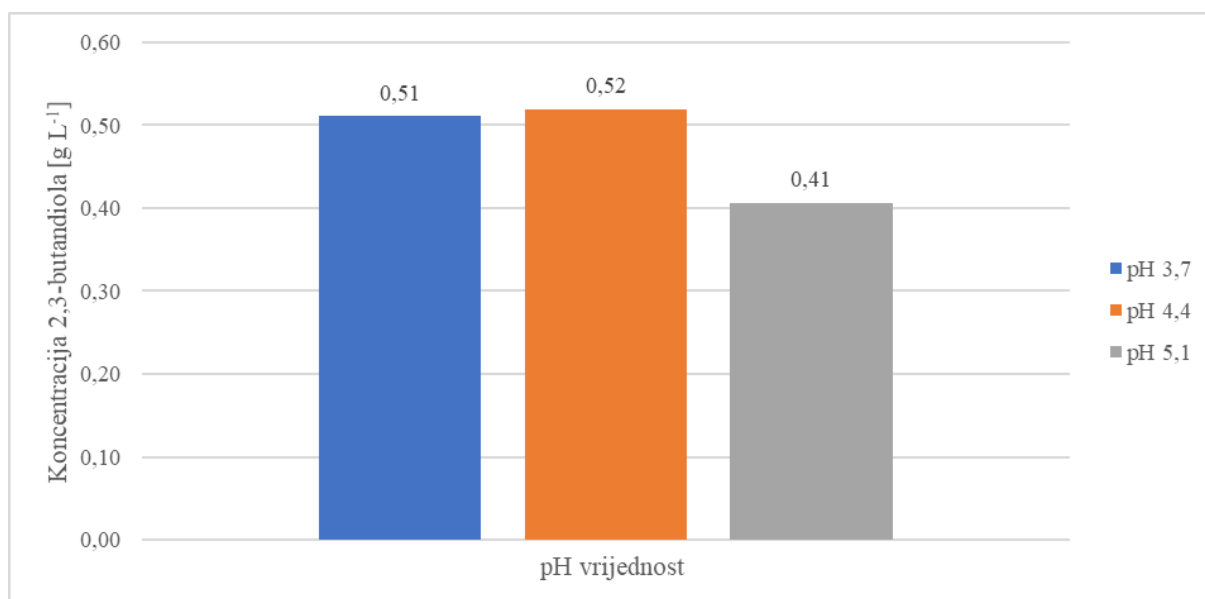


**Slika 13.** Koncentracija proizvedenog etanola na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) pri različitim pH vrijednostima (3,7; 4,4; 5,1) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/ 33 °C/ 24 h)

**Tablica 7.** Koncentracija biomase određena gravimetrijski nakon uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) pri različitim pH vrijednostima (3,7; 4,4; 5,1) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/ 33 °C/ 24 h)

Podloga	3,7	4,4	5,1
Koncentracija biomase (g L <sup>-1</sup> )	4,66	5,43	6,22

S ciljem utvrđivanja optimalne pH vrijednosti pri kojoj kvasac *Kluyveromyces marxianus* najbolje raste i fermentira, hranjiva podloga pod oznakom d (tablica 4) podvrgnuta je daljnjem uzgoju zbog najvišeg prinosa biomase u prvotnom uzgoju. Proveden je uzgoj kvasca u uvjetima različitih pH vrijednosti, a to su 3,7; 4,4 te 5,1. Koncentracija biomase i rast kvasca praćeni su spektrofotometrijski (slika 12) i gravimetrijski (tablica 7) te su dobiveni produkti određeni HPLC analizom. Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je da je najveći prirast biomase postignut kod pH vrijednosti od 5,1 te iznosi 6,22 g L<sup>-1</sup>. Smanjenjem pH vrijednosti smanjuje se i prirast biomase te je tako najmanji prirast biomase u iznosu od 4,66 g L<sup>-1</sup> postignut kod pH vrijednosti od 3,7. Inhibicijski učinak izraženiji je pri nižim pH vrijednostima. Koncentracije etanola postignute u eksperimentu su približno slične, te nema značajne razlike pri različitim pH vrijednostima. Najviša vrijednost koncentracije etanola postignuta je kod pH vrijednosti 5,1 te iznosi 30,80 g L<sup>-1</sup>. Pri pH vrijednosti 4,5 u istraživanju koje su proveli Zafar i Owais (2006), postignut je prirast biomase od 8,9 g L<sup>-1</sup> te koncentracija etanola od 2,1 g L<sup>-1</sup>, što je znatno niže od vrijednosti dobivene u ovom eksperimentu (30,80 g L<sup>-1</sup>). Prema nekim istraživanjima (Quyên i Man, 2016; Oliva i sur., 2006), uzgojem pri pH vrijednosti 5,5 pri proizvodnji etanola koristeći kvasac *K. marxianus* su postignute niže vrijednosti biomase te etanola.

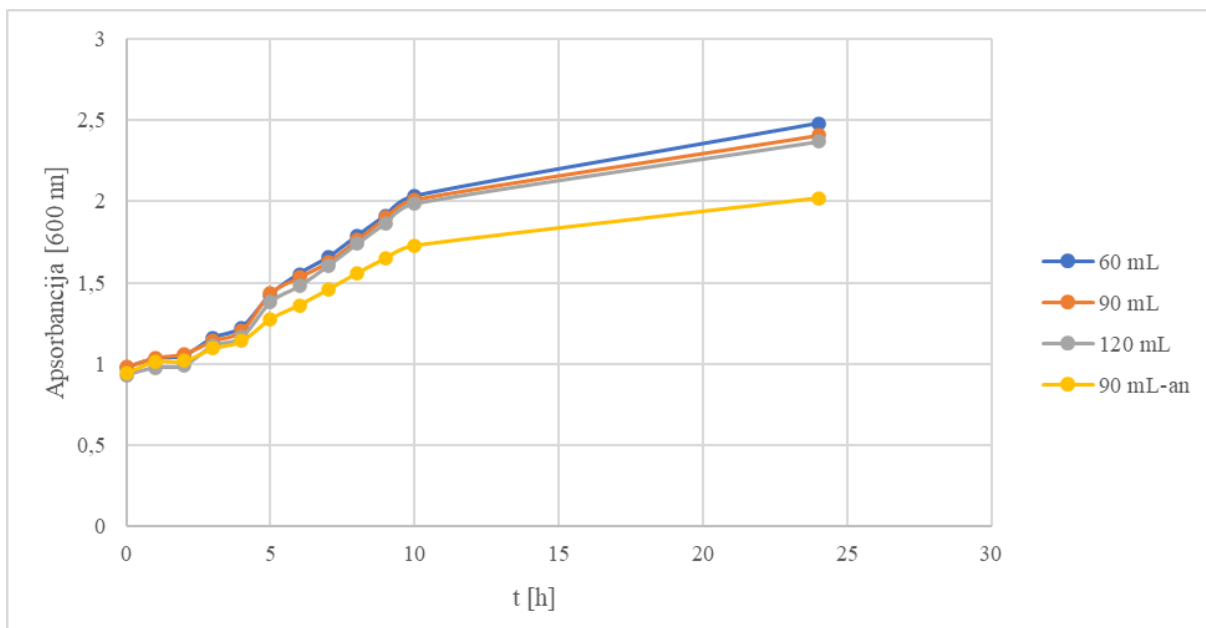


**Slika 14.** Koncentracija proizvedenog 2,3-butandiola na kraju uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) pri različitim pH vrijednostima (3,7; 4,4; 5,1) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/ 33 °C/ 24 h)

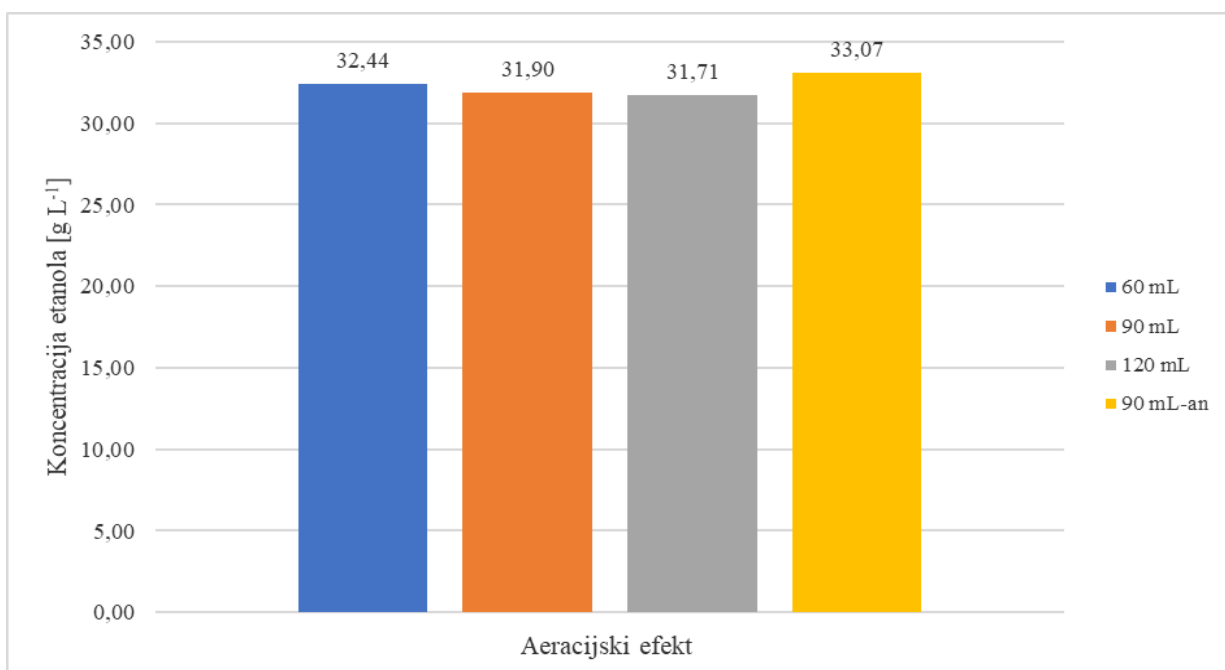
Nakon uzgoja zabilježen je i nastanak određene koncentracije 2,3-butandiola, kao nusprodukta rasta i fermentacije divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. Kao i kod postignutih vrijednosti koncentracija etanola vrijednosti su približno slične i nema značajnih razlika u dobivenim vrijednostima koncentracijama 2,3-butandiola. Najviša vrijednost postignuta je kod pH vrijednosti 4,4, dok je najniža vrijednost 2,3-butandiola postignuta kod pH vrijednosti 5,1. Hughes i sur. (2012) proizvodili su etanol i 2,3-butandiol pomoću divljeg tipa kvasca *Kluyveromyces marxianus* na glukozi i pri pH vrijednosti 5,6. Dobili su 1,93 g L<sup>-1</sup> 2,3-butandiola što je četiri puta više od postignute vrijednosti 2,3-butandiola u ovom radu.

#### 4.2.3. Utjecaj stupnja aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Kako bi se utvrdio utjecaj stupnja aeracije na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777, uzgoj kvasca je proveden semiaerobno na laboratorijskoj tresilici pri 100 o min<sup>-1</sup>, pH vrijednosti 4,4 i temperaturi 25 °C tijekom 24 sata. Usporedno s tim, proveden je anaerobni uzgoj u termostatu u volumenu od 90 mL pri istim uvjetima pH i temperature. Različit intenzitet aeracije osiguran je uzgojem divljeg soja kvasca *K. marxianus* u tikvicama s različitim volumenima podloge (60-120 mL). Rast biomase praćen je gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti praćeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 15-17 te u tablici 8.



**Slika 15.** Rast biomase divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 pri različitim stupnju aeracije podloge d (tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL; 100 o min<sup>-1</sup>) te u termostatu (90 mL-an) (25 °C /pH 4,4/ 24 h)



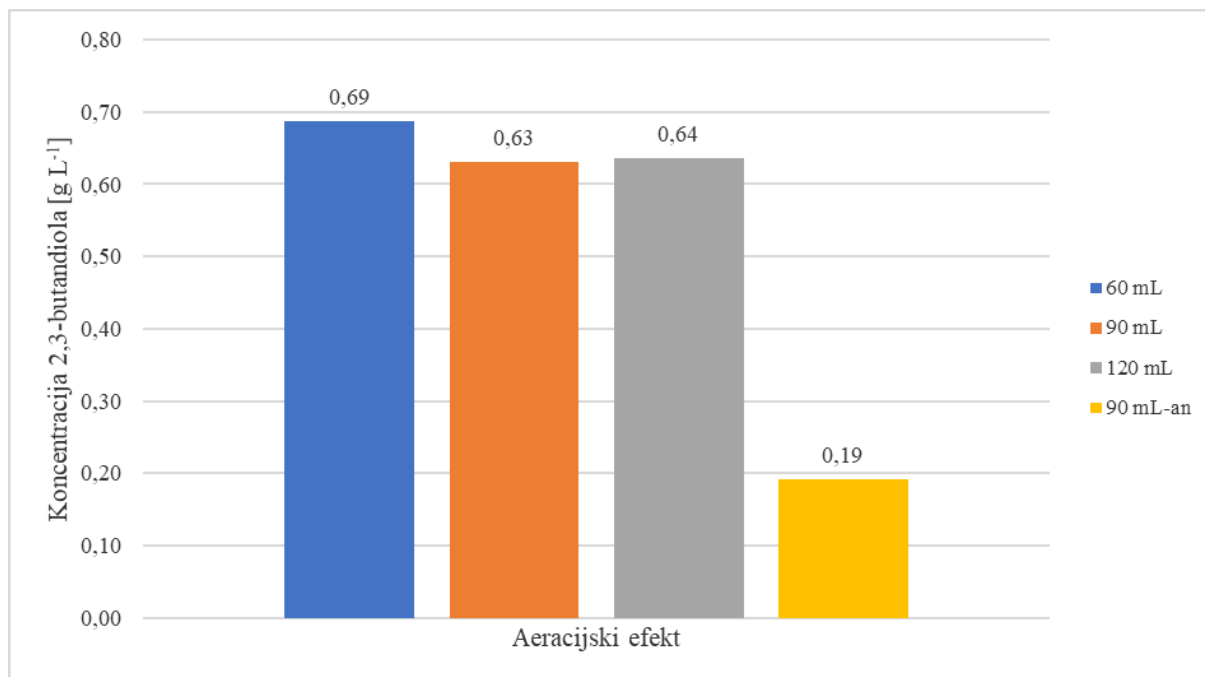
**Slika 16.** Koncentracija proizvedenog etanola nakon uzgoja divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u različitim volumenima podloge d (tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL; 100 o min<sup>-1</sup>) te u termostatu (90 mL-an) (25 °C / pH 4,4/ 24 h)

**Tablica 8.** Koncentracija biomase određena gravimetrijski nakon uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u različitim volumenima podloge d (tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL; 100 o min<sup>-1</sup>) te u termostatu (90 mL-an) (25 °C / pH 4,4/ 24 h)

Podloga	60 mL	90 mL	120 mL	90 mL- anaerobno
Koncentracija biomase (g L <sup>-1</sup> )	6,29	5,67	5,71	3,53

S ciljem utvrđivanja utjecaja stupnja aeracije na rast divljeg soja kvasca *K. marxianus*, uzgoj kvasca je proveden u različitim volumenima hranjive podloge d (tablica 4) u tikvicama (60, 90 i 120 mL) u semiaerobnim uvjetima. Paralelno s tim, proveden je uzgoj kvasca u anaerobnim uvjetima u termostatu. Utvrđeno je da povećanjem volumena podloge, to jest smanjenja aeracijskog učinka dolazi do smanjenja koncentracije biomase (tablica 8). Najviša koncentracija biomase, koja iznosi 6,29 g L<sup>-1</sup> postignuta je kod volumena podloge od 60 mL. Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjima jer veći stupanj aeracije, kojeg omogućava manji volumen podloge u tikvicama za uzgoj, pospješuje rast biomase (He i sur., 2006). U anaerobnim uvjetima (90 mL) postignuta je najniža vrijednost koncentracije biomase (3,53 g L<sup>-1</sup>). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da aeracija značajno utječe na proizvodnju biomase. Prema dobivenim vrijednostima koncentracija etanola vidljivo je da među vrijednostima nema značajne razlike te su sve vrijednosti približno jednake. U anaerobnim uvjetima postignuta je najviša koncentracija etanola u iznosu od 33,07 g L<sup>-1</sup>. U semiaerobnim uvjetima povećanjem volumena podloge dolazi do relativno nezamijećenog smanjenja koncentracije etanola, no ipak najviša koncentracija etanola postignuta je koristeći volumen podloge od 60 mL te iznosi 32,44 g L<sup>-1</sup>. Goshima i sur. (2013) proizvodili su bioetanol iz lignoceluloznih sirovina s pomoću kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. Tijekom anaerobnog uzgoja na YPD podlozi pri 30 °C, tijekom 72 sata, proizvedeno je 17,10 g L<sup>-1</sup> etanola, što je približno 50 % manje od vrijednosti dobivene u ovom radu. Nadalje, Lopez i sur. (2014) ispitali su interakcije između dva kvasca, *Kluyveromyces marxianus* i *Saccharomyces cerevisiae*, tijekom fermentacije pri semiaerobnim uvjetima pri 30 °C u procesu proizvodnje tekile. U tim uvjetima uzgoja za kvasac *K. marxianus*, dobivena je koncentracija biomase od 2,4 g L<sup>-1</sup> što je niže od vrijednosti dobivenih u ovom rade, te

koncentracija etanola od približno  $50 \text{ g L}^{-1}$ , što je vidljivo više od vrijednosti dobivene u ovom radu.



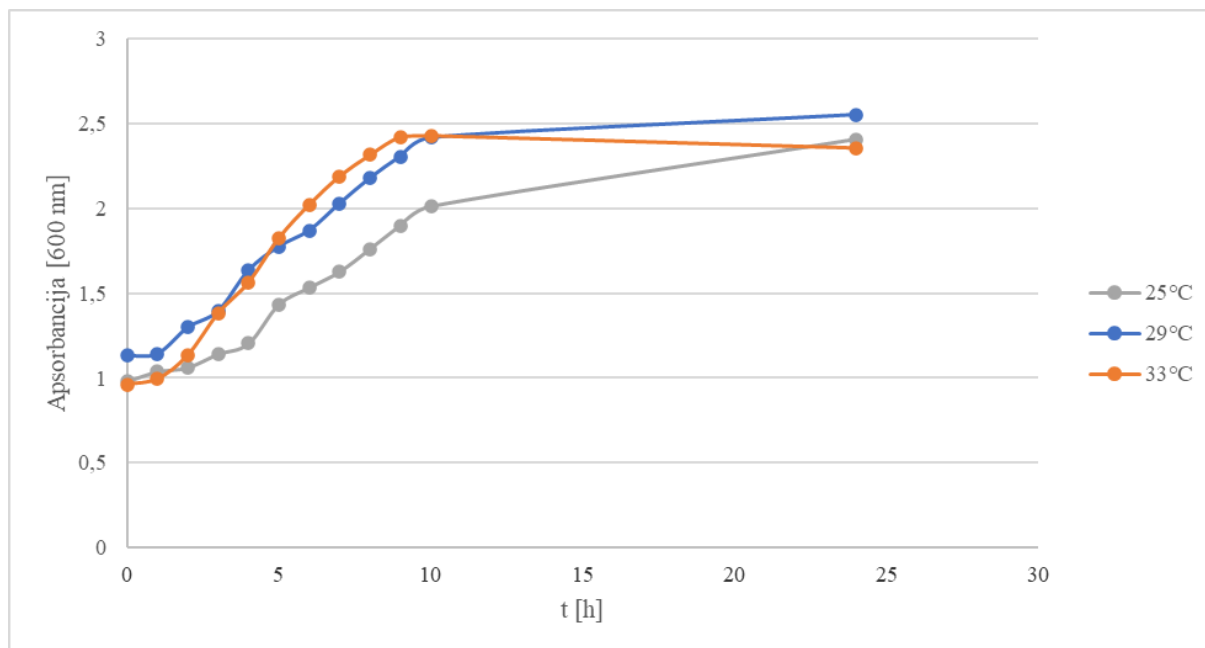
**Slika 17.** Koncentracija proizvedenog 2,3-butandiola nakon uzgoja divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u različitim volumenima podloge d (tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (60, 90 i 120 mL;  $100 \text{ o min}^{-1}$ ) te u termostatu (90 mL-an) ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$  / pH 4,4/ 24 h)

Uz etanol, zabilježen je nastanak 2,3-butandiola, kao nusprodukta rasta i fermentacije divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777. U semiaerobnim uvjetima uzgoja nastale koncentracije 2,3-butandiola su približno jednake uz vrlo male, neznčajne razlike, no najviša koncentracija je postignuta korištenjem volumena podloge od 60 mL te iznosi  $0,69 \text{ g L}^{-1}$ . Preveliki intenzitet aeracije kojeg omogućuje manji volumen podloge smanjuje prinos etanola te drugih nusprodukata. U anaerobnim uvjetima uzgoja (90 mL), postignuta je najniža vrijednost koncentracije 2,3-butandiola te iznosi  $0,19 \text{ g L}^{-1}$ .

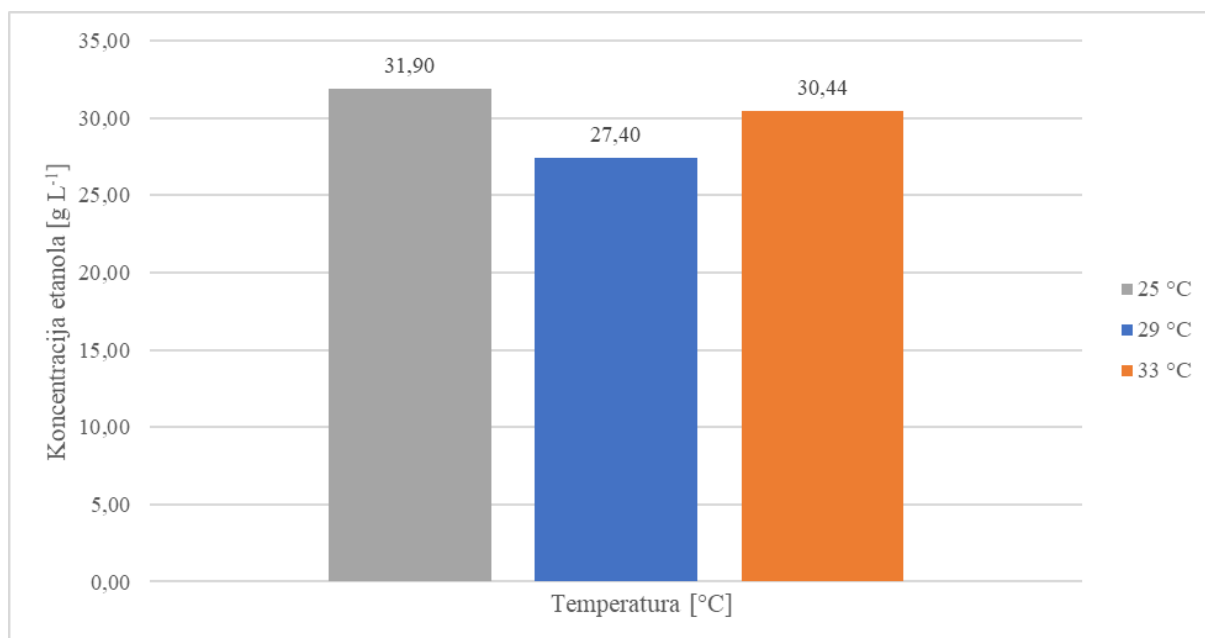
#### 4.2.4. Utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Kako bi se utvrdio utjecaj temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777, uzgoj kvasca je proveden na laboratorijskoj tresilici pri  $100 \text{ o min}^{-1}$ , pH vrijednosti 4,4 te u podlozi d (tablica 4) tijekom 24 sata. Utjecaj temperature praćen je uzgojem pri različitim temperaturama ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $33 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Rast biomase praćen je

gravimetrijski i spektrofotometrijski, a nastali produkti praćeni su HPLC analizom. Rezultati su prikazani na slikama 18-20 te u tablici 9.



**Slika 18.** Rast biomase divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4), na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/pH 4,4/ 24 h), pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33 °C)



**Slika 19.** Koncentracija proizvedenog etanola nakon uzgoja divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33 °C) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/pH 4,4/ 24 h)

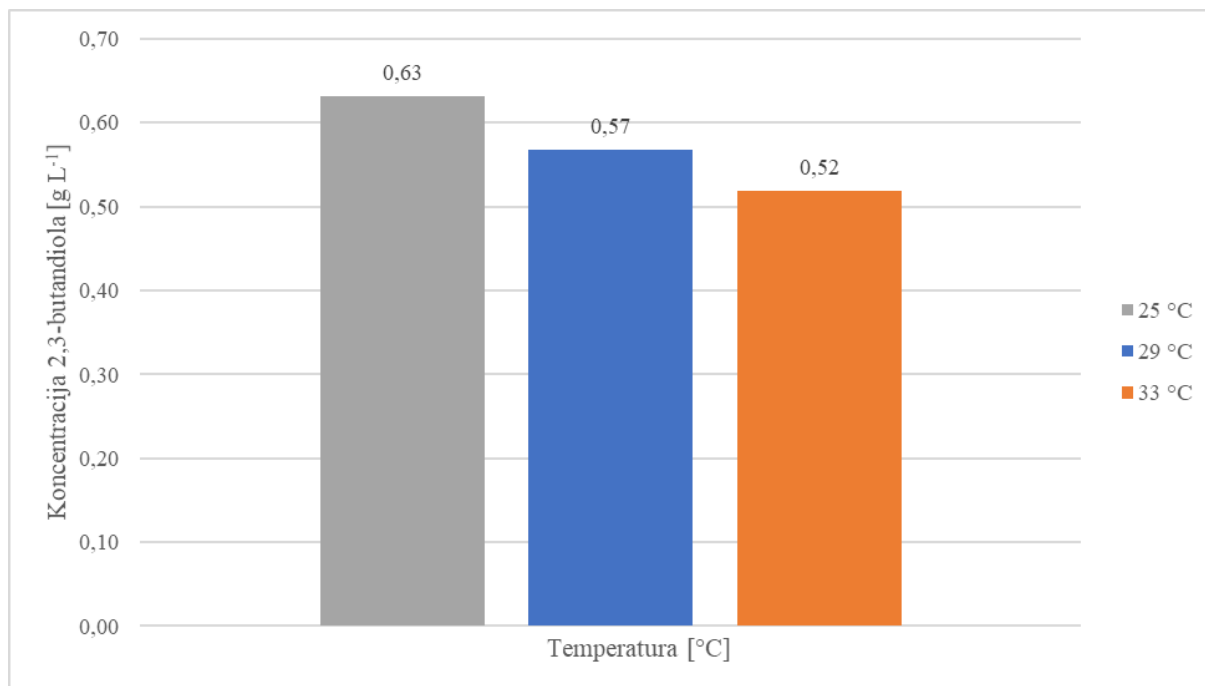
**Tablica 9.** Koncentracija biomase određena gravimetrijski nakon uzgoja divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/pH 4,4/ 24 h), pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33 °C)

Podloga	25 °C	29 °C	33 °C
Koncentracija biomase (g L <sup>-1</sup> )	5,67	5,43	5,59

S ciljem utvrđivanja utjecaja temperature na rast i fermentaciju divljeg soja kvasca *K. marxianus* te određivanja optimalne temperature, praćen je prirast biomase kvasca pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33 °C). Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da je najviša koncentracija biomase, određena gravimetrijski, postignuta pri temperaturi od 25 °C te iznosi 5,67 g L<sup>-1</sup>. Najniža vrijednost prirasta biomase, određena gravimetrijski, postignuta je pri temperaturi od 29 °C. Nasuprot tome, pri temperaturi od 29 °C postignuta je najviša koncentracija biomase praćena spektrofotometrijski, dok je najniža koncentracija biomase zabilježena kod temperature od 33 °C (slika 18). Najviša koncentracija etanola postignuta je pri temperaturi od 25 °C te iznosi 31,90 g L<sup>-1</sup>, dok je najniža koncentracija etanola zabilježena kod temperature od 29 °C. Prema istraživanju Bajpai i Margaritis (1987) u kojem su određivali utjecaj temperature i pH na proizvodnju etanola iz ekstrakta jeruzalemske artičoke s pomoću imobiliziranih stanica kvasca *K. marxianus*, pri uzgoju na 25 °C proizvedeno je 44,5 g L<sup>-1</sup> etanola, što je više od dobivene vrijednosti u ovome radu. Optimalna temperatura za provođenje fermentacije je najčešće oko 20-35 °C zbog toga što na višim temperaturama može doći do inaktivacije enzima te posljedično smanjenog prinosa etanola (Hadiyanto i sur., 2014). Sukladno tome, optimalna temperatura za provođenje uzgoja kvasca *K.marxianus* u ovome radu bi bila 25 °C. Prema istraživanju Hadiyanto i sur. (2014), optimalna temperatura za provođenje uzgoja *K. marxianus* iz sirutke je 30 °C, sa dobivenim prirastom biomase od 13,4 g L<sup>-1</sup> te koncentracijom etanola od 7,96 g L<sup>-1</sup>, što nije bio slučaj u ovom radu. Također, prema istraživanjima (Kralj, 2020; Samardžić, 2020) optimalna temperatura za rast kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 je 30 °C gdje su postignute najviše vrijednosti etanola te biomase. Nasuprot tome, poznavajući termotolerantost kvasca *Kluyveromyces marxianus*, neka istraživanja su pokazala da je optimalna temperatura za proizvodnju etanola 40 °C (Yanase i



sur., 2010; Banat i sur., 1992). Nadalje, u nekim istraživanjima (Kralj, 2020; Samardžić, 2020) korištenje temperature od 50 °C pokazalo je najniže vrijednosti konverzije glukoze u etanol te produktivnosti procesa iz razloga što iz podloge nije utrošena sva glukoza tijekom 24 sata uzgoja.



**Slika 20.** Koncentracija proizvedenog 2,3-butandiola nakon uzgoja divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi d (tablica 4) pri različitim temperaturama (25 °C, 29 °C i 33 °C) na laboratorijskoj tresilici (100 o min<sup>-1</sup>/pH 4,4/ 24 h)

Kao nusproizvod fermentacije divljeg soja kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 proizveden je 2,3-butandiol. Najviša vrijednost koncentracije 2,3-butandiola dobivena je pri temperaturi 25 °C te iznosi 0,63 g L<sup>-1</sup>. Povećanjem temperature smanjuje se koncentracija 2,3-butandiola, te je tako najniža vrijednost postignuta pri temperaturi 33 °C te iznosi 0,52 g L<sup>-1</sup>. Hughes i sur. (2021) su u svom istraživanju koristili divlji tip *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-1109 pri proizvodnji etanola i 2,3-butandiola, te uzgoj provodili pri temperaturi 46 °C u mikroaerofilnim uvjetima u fermentoru. Dobivena je koncentracija 2,3-butandiola od 1,93 g L<sup>-1</sup>, čime se može zaključiti da i pri višim temperaturama dolazi do određene proizvodnje 2,3-butandiola. Također su korišteni i modificirani sojevi kvasca *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-1109, no njihove dobivene vrijednosti 2,3-butandiola su bile niže.

Prema istraživanju Kim i sur. (2013), korištenjem genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri proizvodnji 2,3-butandiola, iz ksiloze koja je prisutna u lignoceluloznom hidrolizatu te pri temperaturi od 30 °C, dobiveno je 20,7 g L<sup>-1</sup> 2,3-butandiola. Time se može zaključiti da bi i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, uz *Kluyveromyces marxianus* mogao biti obećavajući domaćin za proizvodnju 2,3-butandiola iz lignocelulozne biomase za industrijske primjene.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Provođenjem hidrolize čvrstog dijela kiselinski predobrađenog čipsa bukve, korištenjem 0,01 M acetatnog pufera u kombinaciji s komercijalnim enzimima (Viscozyme L i Cellulase enzyne blend) postiže se najveća koncentracija glukoze u nastalom enzimskom hidrolizatu.
2. Optimalni uvjeti za rast biomase divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRCC 1777 na hidrolizatu bukve su: uzgoj na tresilici sa hranjivom podlogom koja sadrži 90 % (v/v) enzimskog hidrolizata, 10 % (v/v) YPD podloge, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata (DAF), 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata (DAS) te 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, pri pH vrijednosti 4,4 te pri temperaturi do 29 °C.
3. Enzimski hidrolizat bukve sa divljim sojem kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRCC 1777 je pogodan medij za proizvodnju različitih biokemikalija, budući da je od nastalih produkata zabilježena određena koncentracija 2,3-butandiola.
4. Najviša koncentracija 2,3-butandiola, 0,69 g L<sup>-1</sup>, zabilježena je u uvjetima sastava podloge koja sadrži 90 % (v/v) enzimskog hidrolizata, 10 % (v/v) YPD podloge, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata (DAF), 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata (DAS) te 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, pri pH vrijednosti 4,4 te pri temperaturi od 29 °C.
5. Najviša koncentracija etanola, 33,07 g L<sup>-1</sup>, zabilježena je u uvjetima sastava hranjive podloge koja sadrži 90 % (v/v) enzimskog hidrolizata, 10 % (v/v) YPD podloge, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata (DAF), 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata (DAS) te 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, pri pH vrijednosti 4,4 te pri temperaturi od 25 °C, anaerobnim uzgojem u termostatu pa se može zaključiti da su to optimalni uvjeti za uzgoj divljeg soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRCC 1777 na enzimskom hidrolizatu predobrađenog drveta bukve.

## 6. LITERATURA

- Acharya S, Chaudhary A (2012) Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. *Braz J Microbiol.* **43**, 844-856. [https://doi: 10.1590/S1517-83822012000300001](https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300001)
- Bajpai P (2016) Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. Briefs in green chemistry for sustainability, *Springer*.
- 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**(2), 306-313. [https://doi: 10.1002/bit.260300222](https://doi.org/10.1002/bit.260300222)
- Banat IM, Nigam P, Marchant R (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 259–263. [https:// doi: 10.1007/BF01201874](https://doi.org/10.1007/BF01201874)
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (3–4): 1975-2019. [https:// DOI: 10.12691/ajmr-3-2-8](https://doi.org/10.12691/ajmr-3-2-8)
- Chen H (2014) Biotechnology of Lignocellulose: theory and practice. *Springer, Chemical Industry Press* str. 2 – 50.
- Čavlović J, Anić I (2008) Gospodarenje običnom bukvom u Hrvatskoj. *Gozdarski studijski dnevnik* **26**: 1967-2019.
- Da Silva Perez D, Guillemain A, Berthelot A, N'guyen N, De Morogues F, Gomes C (2010) Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels. *Institut Technologique FCBA, Domaine Universitaire, BP 251, 38044 - Grenoble, France*.
- Demirbas A (2008) Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**, 220-229. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.01.024>
- Dufour N, Swana J, Rao RP (2011) Fermentation organisms for 5- and 6-carbon sugars. U: *Plant Biomass Conversion*, Hood, E.E., Nelson, P., Powell, R., (ur.), John Wiley & Sons Inc., Chichester, str. 157-197.

Fičko V (2019) Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka I proizvodnja etanola pomoću plijesni *Mucor indicus*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**(3), 339–354. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>

Goshima T, Tsuji M, Inoue H (2013) Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1505-1510. <https://doi.org/10.1271/bbb.130173>

Grba S (2010). Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Plejada, Zagreb.

Hadiyanto, Ariyanti D, Puspita Aini A, Siti Pinundi D (2014) Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. *Energia Procedia* **47**, 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.203>

He J, Deng J, Zheng Y, Gu J (2006) A synergistic effect on the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine- $\beta$  synthase. *J. Biotechnol.* **126** (4), 519-527. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.009>

Hughes SR, Bang SS, Cox EJ, Schoepke A, Ochwat K, Pinkelman R, Nelson D, Qureshi N i sur. (2012) Automated UV-C Mutagenesis of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 and Selection for Microaerophilic Growth and Ethanol Production at Elevated Temperature on Biomass Sugars. *J. Lab. Autom.* **18** (4), 276-290. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10503-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10503-1_16)

Ilić M (2019) Predobrada čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Isikgor HF, Becer CR (2015) Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polymer Chemistry-UK* **6**: 2010-2019. [https:// DOI: 10.1039/C5PY00263J](https://doi.org/10.1039/C5PY00263J)

- Ištvančić J, Antonović A, Pervan S, Jambrečković V, Benković Z, Kavran M (2008) Pilanarstvo u Republici Hrvatskoj, II. dio – Hrvatsko pilanarstvo. *Drvna industrija* **59**(4): 1949-2019. <https://hrcak.srce.hr/30546>
- Ivančić Šantek M, Miškulin E, Beluhan S, Šantek B (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**(1-2), 25-38. <https://doi.org/10.15255/KUI.2014.032>
- Jin In M, Chung Kim D, Jeong Chae H (2005) Downstream process for the production of yeast extract using brewer's yeast cells. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 85-90. <https://doi.org/10.1007/BF02931188>
- Johnson EA (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 503-517. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5046-z>
- Kim JW, Kim J, Seo SO, Kim KH, Jin YS, Seo JH (2016) Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* through fine-tuning of pyruvate decarboxylase and NADH oxidase activities, *Biotechnol. Biofuels* **9**, 265. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0677-9>
- Kim SJ, Seo SO, Park YC, Jin YS, Seo JH (2013) Production of 2,3-butanediol from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **6577** (7). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.081>
- Kralj M (2020) Utjecaj temperature na rast i proizvodnju etanola kod kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, Završni rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Kucharska K, Rybarczyk P, Hołowacz I, Łukajtis R, Glinka M, Kamiński M (2018) Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules* **23**, 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kumar Das P, Prava Das B, Dash P (2020) Refining Biomass Residues for sustainable Energy and Bioproducts: 13 – Potentials of post harvest rice crop residues as a source of biofuel. *Technology, Advances, Life Cycle Assessment, and Economics*; 275- 301.
- Lane MM, Burke N, Karreman R (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**, 507–519. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>

- Lee YG, Seo JH (2019) Production of 2,3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Biofuels* **12**: 204. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1545-1>
- Lopez CLF, Beaufort S, Brandam C (2014) Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 2223–2229. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1643-y>
- Mardetko N, Novak M, Trontel A, Grubišić M, Galić M, Šantek B (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32** (4), 483- 499. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1409>
- Marić V (2000) Biotehnologija i sirovine, 1.izd., *Stručna i poslovna knjiga*. str. 93-95.
- Mattanovich D, Sauer M, Gasser B (2014) Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microb. Cell. Fact.* **13**:34 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-34>
- Mukherjee V, Radecka D, Aerts G, Verstrepen KJ, Lievens B, and Thevelein JM (2017). Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels* **10**:216 <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0899-5>
- Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM (2001) Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59** (4), 187-194. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>
- Oliva MJ, Negro MJ, Saez F, Ballesteros I, Manzanares P, Gonzalez A, Ballesteros M (2006) Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry* **41** (5), 1223-1228. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.003>
- Olsson L, Hahn-Hägerdal B (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme. Microb. Technol.* **18**: 312-331. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00157-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00157-3)

- Petravić-Tominac V, Tolvajčić M, Stanzer D, Mrvčić J, Šantek B (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glasnik zaštite bilja* **40** (5), 24-33. <https://doi.org/10.31727/gzb.40.5.3>
- Ping Zeng A, Biebl H, Dieter Deckwer W (1990) Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 485-489. <https://doi.org/10.1007/BF00172538>
- Quyen VT, Man LV (2016) Effect of acetic acid on fermentation performance of the immobilized yeast *Kluyveromyces marxianus* on *Nypa fruticans* leaf sheath pieces. *Sci. Tech. Dev.* **19** (6). <https://doi.org/10.32508/stdj.v19i3.574>
- Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquie-Moreno MR, Thevelein JM (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res.* **15** (6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Rajoka MI, Khan S, Shahid R (2003) Kinetics and Regulation Studies of the Production of  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Different Substrates. *Food Technol. Biotechnol.* **41** (4), 315-320. <https://hrcak.srce.hr/122400>
- Ratanakhanokchai K, Waeonukul R, Pason P, Tachaapaikoon C, Kyu KL, Sakka K, Kosugi A, Mori Y (2013) *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. *Biomass Now -Cultivation and Utilization* **16**, 369-394. <http://dx.doi.org/10.5772/51820>
- Samardžić A (2020) Određivanje optimalne temperature za rast i proizvodnju etanola s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW (2010) Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks, 1. Review and description of methods, *J Agric Food Chem.* **58**, 9043-9053. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9675-1>
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A Review. *Bioresour. Technol.* **83**(1):1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Syu MJ (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **55**:10-18. [https:// DOI: 10.1007/s002530000486](https://doi.org/10.1007/s002530000486)



UC Davis (2018) <<https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/kluyveromyces-marxianus>>. Pristupljeno 20. rujna 2021.

Verardi A, De Bari I, Ricca E, Calabrò V (2012) Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. U: Bioethanol, (Pinheiro Lima, M. A., ured.), In Tech, Rijeka, str. 95-122.

Wu J, Elliston A, Le Gall G, Colquhoun IJ, Collins SRA, Dicks J, Roberts IN, Waldron KW (2017) Yeast diversity in relation to the production of fuels and chemicals. *Sci. Rep.* **7** (11), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1062-7>

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**(1), 381-388. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2784-z>

Zafar S, Owais M (2006) Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Engineer. J.* **27**, 295-298. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.009>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Katarina Štefanac

Vlastoručni potpis