

Utjecaj izvora ugljika na rast i proizvodnju šećernih alkohola tijekom uzgoja odabranih sojeva *Kluyveromyces* kvasaca

Kaselj, Mija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:132733>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2023.

Mija Kaselj

**UTJECAJ IZVORA UGLJIKA NA
RAST I PROIZVODNJU
ŠEĆERNIH ALKOHOLA TIJEKOM
UZGOJA ODABRANIH SOJEVA
Kluyveromyces KVASACA**

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

Diplomski rad izrađen je u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka.

Ovim putem posebno se zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Mariu Novaku, na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada, na uloženom vremenu i pomoći tijekom izrade, na svim savjetima i konstruktivnim kritikama, te na znanju koje je prenio na mene. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Antoniji Trontel, dr.sc. Nenadu Marđetku te laboratorijskom tehničaru, Igoru Livadi, na pomoći prilikom izrade ekperimentalnog dijela rada, prenesenom znanju i vještinama te stvaranju ugodne radne atmosfere. Ovim putem se želim zahvaliti i prof. dr. sc. Božidaru Šanteku čiji su trud i veliko znanje, a prije svega plemenitost, uvelike doprinjeli uspješnom završetku mog studija i svijetlom pogledu na budućnost. Zadovoljstvo mi je bilo studirati, komunicirati i usvajati stručno znanje koje su mi djelatnici Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva prenosili, a posebnice usvajati znanje iz discipline ljudskosti. Vjerujem da bi postojalo više studenata s vjerom u bolje sutra, da je više ovakvih djelatnika uključeno u njihovo školovanje.

Posebno hvala i svim mojim prijateljima i kolegama koji su bili dio mog studentskog puta, te dijelili sa mnom dobre i loše dane, kao i mojoj obitelji koja mi je omogućila bezbrižno studiranje, te pružila ljubav i podršku u svakom trenutku.

Na kraju, ovaj rad želim posvetiti svom pok. bratu Marku koji me savjetovao i usmjerio da upišem ovaj studij.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

UTJECAJ IZVORA UGLJIKA NA RAST I PROIZVODNJU ŠEĆERNIH ALKOHOLA TIJEKOM
UZGOJA ODABRANIH SOJEVA *Kluyveromyces* KVASACA

Mija Kaselj, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213179

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj izvora ugljika na rast i sintezu proizvoda metabolizma tri odabrana soja kvasca *Kluyveromyces marxianus*: NBRC 1777, DKMU 3-1042 te CBS 712. Rastom na glukozi, najveći prinos etanola (1,01 g/L) ostvario je kvasac soja DKMU 3-1042, dok je kvasac soja NBRC 1777 ostvario najveći prinos arabitola (2,84 g/L) rastom na arabinozi, ksilitola (2,89 g/L) rastom na ksilozi, te etanola (1,15 g/L) rastom na glicerolu. Šaržnim uzgojem kvasca soja NBRC 1777, u bioreaktoru s miješalom, na simulatu hidrolizata izluženih rezanca šećerne repe proizvedeno je 5,13 g/L etanola u aerobnim uvjetima, dok je u anaerobnim proizvedeno 5,31 g/L etanola. Šaržnim uzgojem kvasca soja NBRC 1777, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinom hidrolizatu izluženih rezanca šećerne repe proizvedeno je 1,43 g/L etanola i 0,82 g/L octene kiseline u aerobnim uvjetima, dok je u anaerobnim uvjetima proizvedeno 1,28 g/L etanola te 4,46 g/L octene kiseline.

Ključne riječi: *Kluyveromyces marxianus*, izluženi rezanci šećerne repe, glicerol, šećerni alkoholi, bioreaktor s miješalom

Rad sadrži: 78 stranica, 19 slika, 12 tablica, 101 literaturni navod, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: Antonija Trontel doc.dr.sc., Nenad Marđetko dr.sc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Antonija Trontel (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Mario Novak (mentor)
3. doc. dr. sc. Bojan Žunar (član)
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

Datum obrane: 30. lipnja, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemistry engineering
Laboratory for Biochemistry engineering, industrial microbiology and beer and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CARBON SOURCES ON THE GROWTH AND SUGAR ALCOHOL PRODUCTION DURING CULTIVATION OF SELECTED *Kluyveromyces* STRAINS

Mija Kaselj, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213179

Abstract: In this study, the influence of selected carbon sources in different concentrations on the growth and synthesis of metabolic products of three selected strains of *Kluyveromyces marxianus*: NBRC 1777, DKMU 3-1042 and CBS 712 was investigated. When grown on glucose, the highest yield of ethanol (1.01 g/L) was observed by yeast strain DKMU 3-1042, while yeast strain NBRC 1777 achieved the highest yield of arabitol (2.84 g/L) when grown on arabinose, xylitol (2, 89 g/L) when grown on xylose, and ethanol (1.15 g/L) when grown on glycerol. Batch cultivation of strain NBRC 1777 in a stirred tank bioreactor (STBR), on a simulated acid hydrolysate of leached sugar beet pulp, produced 5.13 g/L of ethanol under aerobic conditions, while 5.31 g/L of ethanol were produced under anaerobic conditions. Batch cultivation of strain NBRC 1777 in a STBR on acid hydrolysate of leached sugar beet pulp produced 1.43 g/L of ethanol under aerobic conditions, while in anaerobic conditions 1.28 g/L of ethanol were produced.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, sugar beet pulp, glycerol, sugar alcohols, stirred tank bioreactor

Thesis contains: 78 pages, 19 figures, 12 tables, 101 references, 1 supplement

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: Mario Novak, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: *Antonija Trontel, PhD, Assistant professor, Nenad Marđetko, PhD, Assistant professor*

Reviewers:

1. Antonija, Trontel, PhD, Assistant professor (president)
2. Mario, Novak, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Bojan Žunar, PhD, Assistant professor (member)
4. Andreja, Leboš Pevunc, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: June 30th, 2023.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE.....	3
2.1.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina.....	4
2.1.2. Izluženi rezanci šećerne repe	5
2.2. GLICEROL	7
2.3. NE- <i>Saccharomyces</i> KVASCI.....	8
2.3.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	9
2.4. ŠEĆERNI ALKOHOLI.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	15
3.1.2. Sirovine	15
3.1.3. Kemikalije.....	16
3.1.4. Hranjive podloge.....	16
3.1.5. Uređaji i pribor.....	18
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Priprema inokuluma kvasaca <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777, <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042 te <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712.....	21
3.2.2. Predobrada izluženih rezanaca šećerne repe.....	21
3.2.3. Priprema kiseline i lužine za podešavanje pH vrijednosti.....	22
3.2.4. Priprema hranjivih podloga.....	22
3.2.5. Provedba i nadzor uzgoja odabranih sojeva kvasca <i>Kluyveromyces</i>	24
3.2.6. Analitičke metode	26
3.2.7. Proračun pokazatelja uspješnosti provođenja procesa	28

4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1. UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777, <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042 te <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712 NA PODLOGAMA S RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIK U RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA	31
4.2. ŠARŽNI UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 U BIOREKTORU S MIJEŠALOM NA KEMIJSKI DEFINIRANOJ PODLOZI KOJA SIMULIRA SASTAV KISELINSKOG HIDROLIZATA IZLUŽENIH REZANACA ŠEĆRNE REPE U AEROBNIM I ANAEROBNIM UVJETIMA	56
4.3. ŠARŽNI UZGOJ KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777 U BIOREKTORU S MIJEŠALOM NA KISELINSKOM HIDROLOZATU IZLUŽENIH REZANACA ŠEĆRNE REPE U AEROBNIM I ANAEROBNIM UVJETIMA	60
4.4. ŠARŽNI UZGOJA KVASCA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777, U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, NA KEMIJSKI DEFINIRANOJ PODLOZI S GLICEROLOM KAO GLAVNIM IZVOROM UGLJIK U AEROBNIM I ANAEROBNIM UVJETIMA.....	64
5. ZAKLJUČAK.....	67
6. LITERATURA	68
7.PRILOZI	

1. UVOD

Negativan utjecaj prekomjerne potrošnje rafiniranog šećera na zdravlje potaknuo je potražnju potrošača za zdravijim proizvodima koji sadrže nutritivno prihvatljivije zamjene za šećer (Rice i sur., 2019). Šećerni alkoholi su vrsta funkcionalnih šećera koji imaju jedinstvene strukturalna svojstva koja ih čine potencijalno primjenjivim u biomedicinskim i biotehnološkim sektorima, kao što su biomedicina, farmacija, zelena kemija i fermentirana hrana (Bilal i sur., 2020). Značajna karakteristika šećernih alkohola je u njihovoj niskokaloričnoj ili nekaloričnoj energetske vrijednosti, zbog čega služe kao zamjena za šećere u prehrambenoj industriji. Osim što se dodaju hrani kao zaslađivači, prisutni su u različitim količinama u mnogo voća i povrća. Do danas se većina šećernih alkohola proizvodi kemijskim putem iz odgovarajućih ugljikohidrata visokog stupnja čistoće, ali očekuje se prijelaz na korištenje obnovljivih sirovina za proizvodnju šećernih alkohola (Erian i Sauer 2021; Rice i sur., 2019).

Lignocelulozne sirovine se smatraju privlačnim sirovinama zbog njihove dostupnosti u velikim količinama po relativno niskim cijenama, čime se smanjuje tržišno natjecanje s hranom, ali ne nužno i s hranom za životinje (Pavlečić i sur., 2010). Izazov u upotrebi lignoceluloznih sirovina predstavlja potreba za prethodnom predobradom istih, kako bi se oslobodili monomerni šećeri iz složene strukture lignina, celuloze i hemiceluloze (Bušić i sur., 2018).

Izluženi rezanci šećerne repe sporedni su proizvod industrije šećera koji nastaje nakon ekstrakcije saharoze iz šećerne repe. Visok sadržaj polisaharida, te nizak udio lignina, čini ovaj proizvod atraktivnom sirovinom za biotehnološku primjenu u proizvodnji visokovrijednih proizvoda metabolizma (Vučurović, 2015).

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* je mikroorganizam koji može rasti na pentozama te pokazuje visoku produktivnost u proizvodnji (Karim i sur., 2020). Može preživjeti na različitim izvorima ugljika u industrijski povoljnim uvjetima zbog svoje specifične brzine rasta, termotolerancije i otpornosti na kiseline (Leonel i sur., 2021). Fiziološka i metabolička raznolikost *Kluyveromyces marxianus* kvasaca čini ovaj kvasac obećavajućim radnim mikroorganizmom za primjenu u biorafinerijama koje koriste ostatke lignocelulozne biomase (Castillo-Plata i sur., 2022).

U ovom radu provedeno je istraživanje s ciljem ispitivanja rasta i proizvodnje metabolita s pomoću tri različita soja kvasca *Kluyveromyces: Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777,

Kluyveromyces marxianus DKMU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CSB 712 na hranjivim podlogama s različitim glavnim izvorom ugljika. Za prijelaz u veće mjerilo odabran je kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 te su istraživanja rasta i proizvodnje glavnih metabolita ovog kvasca provedena na različitim hranjivim podlogama u bioreaktoru s miješalom u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Kao hranjive podloge korištene su: hranjiva podloga koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih reznaca šećerne repe, hranjiva podloga s glicerolom te hranjiva podloga dobivena kiselinskom hidrolizom izluženih reznaca šećerne repe u visokotlačnom reaktoru. Na temelju dobivenih rezultata određeni su osnovni biokinetički parametri za navedene bioprocese.

2. TEORIJSKI DIO

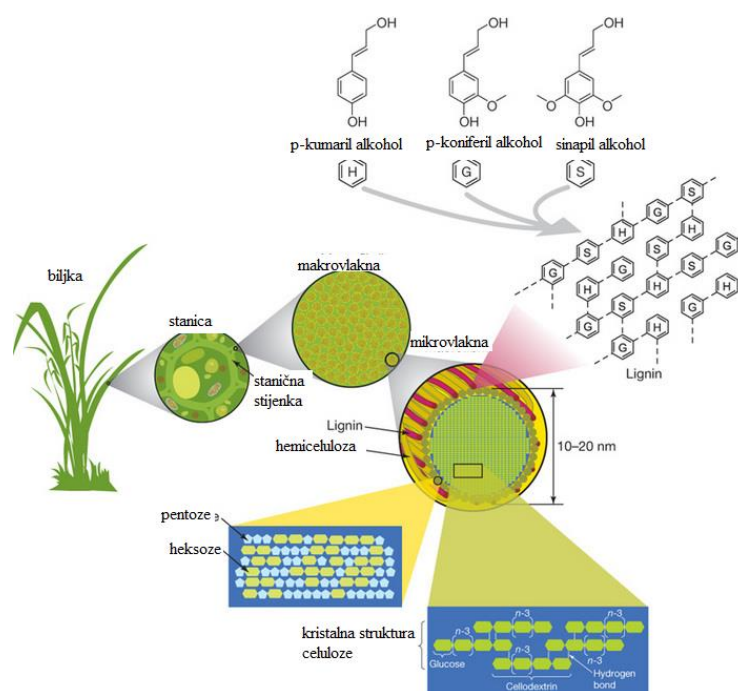
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignocelulozna biomasa je obećavajući obnovljivi izvor energije koji sve više pronalazi primjenu u biorafinerijskom pristupu s obzirom na globalnu dostupnost sirovine, njeno obilje te mogućnost frakcioniranja za dobivanje različitih biotehnoloških proizvoda i bioenergije (Baptista i Domingues, 2022). Godine 2019. u Europi je u pogonu bilo više od 40 lignoceluloznih biorafinerija koje su koristile lignoceluloznu biomasu, odnosno ostatak dobivene iz šumarstva, poljoprivrede ili agroindustrijskog otpada (Hassan i sur., 2019). Lignoceluloza nastaje procesom fotosinteze kao rezultat rasta biljaka koje vodu i CO₂ koriste za stvaranje monomernih šećera koje ugrađuju u svoju lignoceluloznu strukturu. Sastavni polimeri lignoceluloze su celuloza, hemiceluloza i lignin, dok u nekim sirovinama u manjem dijelu mogu biti prisutni pigmenti, proteini stanične stijenke, mineralne tvari i pektin (Chen, 2014). Celuloza i hemiceluloza međusobno se isprepleću formirajući vodikove veze te ostvarujući kristaliničnu strukturu, dok se lignin kovalentno veže na hemicelulozu čineći ovu sirovinu kompleksnim supstratom za mikroorganizme (Zoghلامي i Paës, 2019; Andlar i sur., 2018; Bušić i sur., 2018).

Celuloza je linearni polimer kemijske formule (C₆H₁₀O₅)_n sastavljen od nekoliko stotina do preko 10000 monomera D-glukoze koji su povezani β-1,4-glikozidnom vezom. Oslobođanjem monomera glukoze iz polimerne strukture dobivamo fermentabilni šećer koji se može koristiti kao izvor ugljika za rast mikroorganizama i proizvodnju biokemikalija i biogoriva (Pacheco i sur., 2021). Građa celuloze obično uključuje kristalno područje visokog stupnja polimerizacije zbog čega je vrlo otporna na kemijsku i enzimsku hidrolizu dok je amorfni dio celuloze dostupan djelovanju celulitičkih enzima. Udio celuloze obično čini 35 – 50 % lignocelulozne strukture (Kassaye i sur., 2016; Jonsson i sur., 2013).

Hemiceluloza je razgranati heteropolimer s kratkim bočnim lancima koji se sastoje od dva ili više monosaharida. Grupe šećera koje su u sastavu hemiceluloza uglavnom su ksiloza i arabinoza (pentoze) te glukoza, manoza, i galaktoza (heksoze) i njihovi različiti derivati. Ovisno o uvjetima rasta kao i vrsti biljke varira udio pojedinih šećera u istoj. Hemiceluloza, iako je razgranate strukture i nižeg stupnja polimerizacije u odnosu na celulozu, te samim time manje čvrstoće, predstavlja najsloženiju komponentu stanične stijenke lignoceluloznih sirovina budući da tvori kovalentne veze s ligninom te esterske veze s fenilpropanskom kiselinom i acetilnim jedinicama (Malav i sur., 2017; Shafiei i sur., 2015; Chan, 2014; Jönsson i sur., 2013).

Lignin je vrlo složeni amorfní heteropolimer s trodimenzionalnom strukturom koja se sastoji od fenilpropanskih alkohola (kumaril-, koniferil- i sinapil-alkohol) povezanih međusobno ugljik - ugljik te ugljik - kisik kovalentnim i esterskim vezama. Lignin je odgovoran za mehaničku čvrstoću stanične stijenke, nepropusnost, ograničava dostupnost polisaharida hidrolitičkim enzimima, izgrađuje sekundarnu staničnu stijenku koja se formira kada je biljka u potpunosti razvijena, služi kao zaštita od oksidativnog stresa i patogenih mikroorganizama te zbog svojih hidrofobnih strukturnih dijelova može ireverzibilno adsorbirati na svoju površnu celulaze i druge enzime tijekom enzimske hidrolize (Zeng i sur., 2014; Kumar i Wyman, 2009; Hendriks i Zeeman, 2009).



Slika 1. Prikaz strukturne građe lignoceluloze (prema Potters i sur., 2010)

2.1.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina

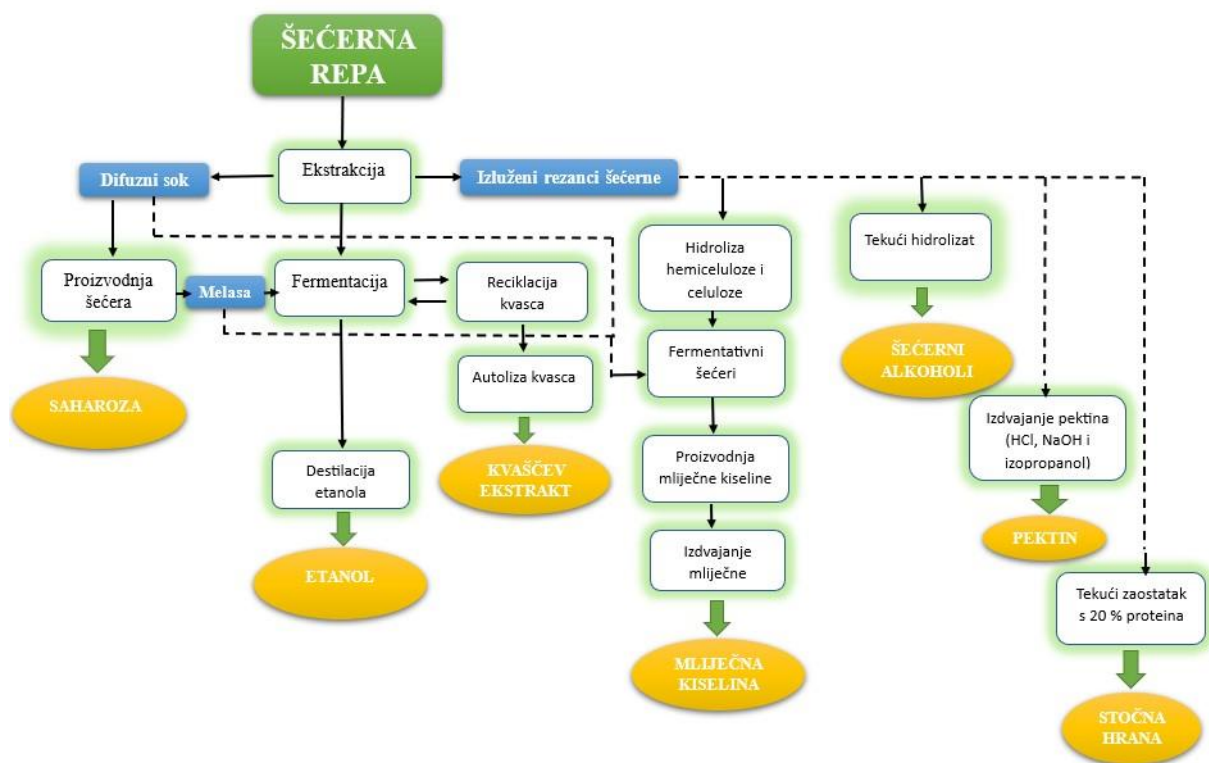
Prvi korak i jedan od najvažnijih u biorafinerijama koje koriste lignoceluloznu sirovinu kao supstrat je prethodna predobrada iste, da bi mikroorganizam mogao efikasno koristiti prisutne šećere. Uspostavljeno je nekoliko različitih načina predobrade s izmjenama ovisno o kemijskom sastavu biomase, cijeni reagensa i potrebne energije te utjecajima na okoliš (Ali i sur., 2020; Kucharska i sur., 2018). Važno je napomenuti da se procesi predtretmana mogu kategorizirati uglavnom u četiri tipa: a) fizikalni, b) kemijski, c) fizikalno-kemijski i d) biološki (Baruah i sur., 2018). Biološka predobrada podrazumijeva korištenje različitih mikroorganizama i odgovarajućih lignocelulolitičkih enzima koji razgrađuju lignin i

hemicelulozu, kao što su plijesni bijelog, smeđeg i mekog truljenja te bakterije izolirane iz različitih prirodnih staništa (Andlar i sur., 2018). Kemijska predobrada lignocelulozne biomase podrazumijeva da se suha usitnjena biomasa najčešće uranja u otopine sumporne, klorovodične, nitratne ili fosfatne kiseline kada je riječ o kiselinskoj predobradi, odnosno u otopinu, najčešće korištene, natrijeve lužine kada je riječ o alkalnoj hidrolizi. Fizikalne metode predobrade koje se koriste jesu mehaničko usitnjavanje, ekstruzija, zračenje i piroliza (Sun i sur., 2016; Kumar i sur., 2009). Osim biološke predobrade, ostale vrste predobrade uzrokuju stvaranja inhibitora kao što su furani (npr. furfural i 5-hidroksimetil furfural (HMF)), slabe kiseline (npr. octena kiselina) i fenolni spojevi (npr. 4-hidroksibenzaldehid, vanilin ketol). Među tim spojevima, HMF i furfural, iako su obično inhibitori fermentirajućih organizama, mogu se biološki transformirati u važne strukturne spojeve s primjenom u nekoliko industrija (Baptista i Domingues, 2022). Nekoliko aspekata utječe na inhibicijsko opterećenje prisutno u lignoceluloznim hidrolizatima, poput vrste biomase, radnih uvjeta te primijenjenog prethodnog tretmana (Cunha i sur., 2019).

2.1.2. Izluženi rezanci šećerne repe

Šećerna repa predstavlja najzastupljeniju sirovinu za proizvodnju šećera u industrijskom procesu tijekom kojeg kao nusproizvod nastaje velika količina lignocelulozne biomase bogata zaostalim šećerima. Najveći proizvođači šećerne repe su zemlje Europske Unije s Francuskom koja prednjači kao najveći svjetski proizvođač, a osim u Europi uzgaja se na još 4 kontinenta s ukupnom obrađenom površinom pod šećernom repom od 4,76 milijuna hektara (Vojvodić Cebin, 2019). Izluženi rezanci šećerne repe su nusproizvod koji čini više od 60 % početne svježje mase, a odličan su izvor lignocelulozne biomase bogate arabinozom, glukozom i ksilozom (Perković 2020). Sastav izluženih reznaca šećerne repe čine različiti polisaharidi (pektin 20-30 %, celuloza 44 % i hemiceluloze 24 %), koji su prisutni u puno većoj koncentraciji nego lignin s maksimalnim udjelom od 4 %. Preostali udio zauzimaju proteini (7-10 %) i pepeo (5 %) (Zhang i sur., 2015). Rezance šećerne repe karakterizira 18-23 % suhe mase. Ovaj otpadni materijal ima širok raspon potencijalnih primjena, uključujući industriju biogoriva, obnovljivu energiju, proizvodnju platformskih kemijskih reagensa i stočnu hranu (Usmani i sur., 2022; Ubando i sur., 2020; Klein i sur., 2019). Trenutno se većina reznaca šećerne repe koristi kao stočna hrana (Munnich i sur., 2017). Obično se koristi kao krmivo za nadopunjavanje volumenskih potreba za krmnom smjesom ili kao element u ukupnoj hranidbi mješovitih obroka (Kelly, 1983). Izluženi rezanci šećerne repe također se mogu modificirati kako bi se povećala njihova uporaba. U posljednje vrijeme raste interes za stvaranjem biorafinerijskih konglomerata

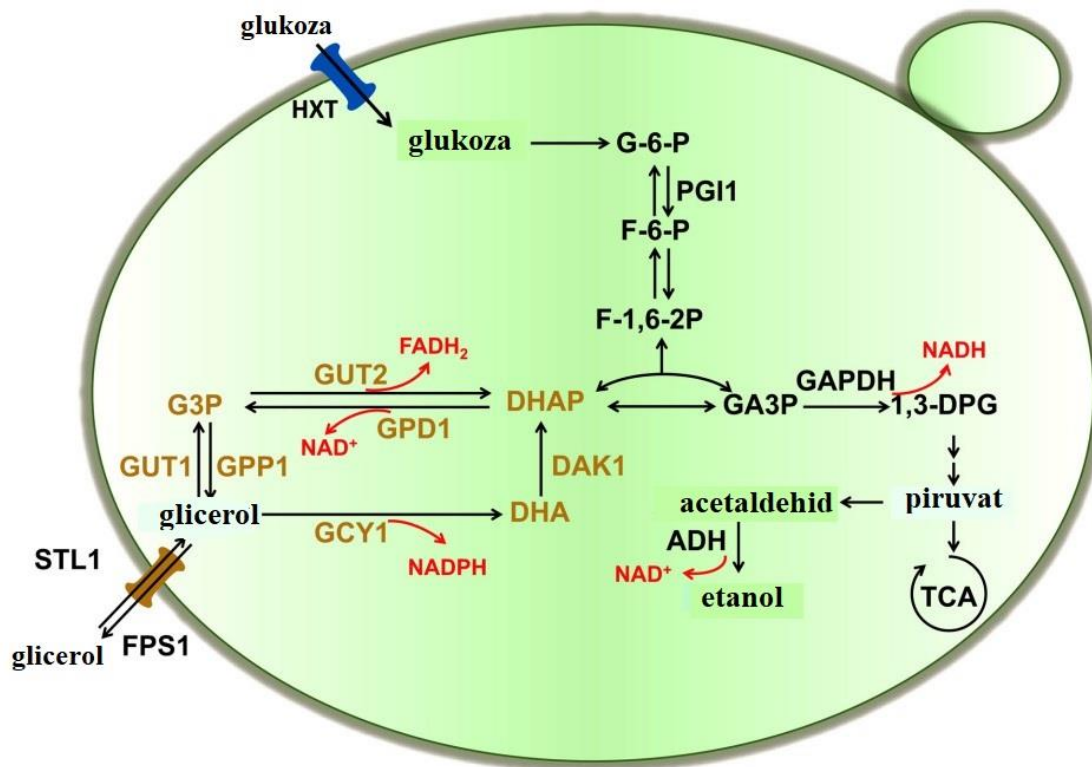
koji kombiniraju više tipova tvrtki, sposobnih prerađivati biomasu i daljnju otpadnu biomasu u nove proizvode visoke vrijednosti. U okviru biorafinerija izluženi rezanci šećerne repe se mogu koristiti za ekstrakciju bioaktivnih molekula kao što su pektin i oligosaharidi ili ih se može koristiti kao izvore ugljika za dobivanje visokovrijednih proizvoda metabolizma nakon prethodne predobrade (Amo-Mateos i sur., 2022). Biorafinerijsko iskorištavanje izluženih rezanaca šećerne repe može se provesti u načinu odvojene hidrolize i fermentacije (SHF, engl. Separate Hydrolysis and Fermentation) ili istovremenom saharifikacijom i fermentacijom (SSF, engl. Simultaneous Saccharification and Fermentation). Često je potrebna predhidroliza za pravilno pokretanje procesa enzimskom aktivnošću čiji je rezultat depolimerizacija biljnih polisaharida (Berlowska i sur., 2018; Berlowska i sur., 2017). Prema istraživanju Digas i sur. (2023), izluženi rezanci šećerne repe pokazali su se kao odgovarajuća sirovina za rast kvasaca, pri čemu je najveći prinos kvašćeve biomase na enzimskom hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe zabilježen kod kvasca *Scheffersomyces stipitis* (3,04 %).



Slika 2. Biorafinerijska primjena izluženih rezanaca šećerne repe za dobivanje visokovrijednih proizvoda

2.2. GLICEROL

Korištenje glicerola kao nusproizvoda različitih industrija je vrlo važno jer se količina otpada povećava svake godine kroz sve veću proizvodnju biodizela i drugih oleokemikalija (Eastreling i sur., 2009). S druge strane, glicerol se uspješno koristi kao izvor ugljika, topiv u vodi, za različite mikroorganizme (Silva i sur., 2009; Sharma i Sing 2008). Istražen je metabolizam glicerola brojnih mikroorganizama s ciljem ispitivanja mogućnosti proizvodnje visoko vrijednih proizvoda metabolizma na jeftinom supstratu. *Kluyveromyces marxianus* je termotolerantni kvasac s GRAS statusom (engl. Generally Recognized As Safe) koji se koristi za proizvodnju bioetanol, hidrolitičkih enzima, prehrambenih proizvoda i aditiva (Suzuki i sur., 2019; Wang i sur., 2017). Ovaj kvasac uspješno koristi glicerol kao izvor ugljika za postizanje visokog prinosa kvaščeve biomase, za razliku od najčešće korištenog biotehnološkog domaćina, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koji pokazuje slab rast na glicerolu. U dosad provedenim istraživanjima pokazalo se da je glicerol učinkovit kosupstrat za proizvodnju NADPH prilikom rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* na podlozi s ksilozom (Ji i sur., 2019; Wang i sur., 2017; Zhang i sur., 2014). Glicerol je mala i nenabijena molekula koju kvasac može koristiti kao izvor ugljika za rast ako je prisutan kao vanjski supstrat, ili glicerol mogu proizvesti stanice kvasca s ciljem osmoadaptacije kako bi se održala redoks ravnoteža kao odgovor na termotoleranciju i oksidativni stres (Klein i sur., 2017; Izawa i sur., 2014). Sposobnost proizvodnje i asimilacije glicerola, uz njegovu široku funkcionalnost u metabolizmu i fiziologiji stanice, iziskuje zahtjevnu regulaciju proizvodnje, katabolizma i transporta molekula glicerola (Semkiv i sur., 2017).



Slika 3. Shematski prikaz transporta i metaboličkih puteva glicerola kod kvasca *Kluyveromyces marxianus* (HXT – heksoza transferaza, G-6-P – glukoza-6-fosfat , PGI1 – glukoza-6-fosfat izomeraza, F-6-P – fruktoza-6-fosfat, F-1,6-2P – frukotza-1,6-bisfosfat, DHAP – dihidroksiaceton fosfat, GA3P – gliceraldehid-3-fosfat, GAPDH – gliceraldehid fosfodehidrogenaza, NADH – nikotinamid adenin dinukleotid, 1,3-DPG – 1,3-bisfosfglicerolat, TCA – ciklus trikarboksilnih kiselina, ADH –alkohol dehidrogenaza, DAK1 – dihidroksiaceton kinaza 1, GCY 1 – glicerol-2-dehidrogenaza, GPP1 – glicerol bisfosfataza, GUT1 – glicerol kinaza) (prema Zhang i sur., 2020)

2.3. NE-Saccharomyces KVASCI

Mikrobna proizvodnja biogoriva i biokemikalija iz različitih lignoceluloznih sirovina razvila je potrebu za korištenjem mikroorganizama koji će uspješno koristiti šećere prisutne u ovim sirovinama (Lobs i sur. 2017). *Saccharomyces cerevisiae* i blisko srodne askomicete su među najvažnijim skupinama biotehnoških organizama te glavni proizvođači biotehnoških proizvoda diljem svijeta, nadmašujući druge skupine industrijskih mikroorganizama u produktivnosti i ekonomskim prihodima. Tradicionalne industrijske primjene skupine kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* uključuju njihove primarne uloge u fermentaciji hrane kao što su pivo, jabukovača, vina, sake, destilirana alkoholna pića, pekarski proizvodi, sir, kobasice i drugi proizvodi fermentirane hrane. Ostali dugotrajni industrijski procesi koji uključuju upotrebu

kvasca *S. cerevisiae* su proizvodnja biogoriva etanola, jednostaničnih proteina, hrane za životinje i stočne hrane, industrijskih enzima i metabolita male molekulske mase (Johnson i sur., 2012). Zbog ograničenja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* da asimilira pentoze u podlozi (izuzev genetički modificiranih sojeva), te zbog razvijanja novih biotehnoloških procesa koji zahtijevaju rast radnih mikroorganizama na različitim izvorima ugljika, u različitim uvjetima rasta te u prisutnosti inhibitora, ne-*Saccharomyces* kvasci pronalaze svoju primjenu u industriji. Do nedavno su se ne-*Saccharomyces* kvasci smatrali kvascima kvarenja zbog njihove izolacije iz kontaminiranih proizvoda, međutim, zbog pritiska novih tehnologija započelo je otkrivanje njihovih prednosti (Kręgiel i sur., 2017; Padilla i sur., 2016). Neki od njih su zanimljivi jer posjeduju neobična svojstva kao što su mogućnost metaboliziranja metanola, n-alkana, celuloze, rafinoze, arabinoze, ksiloze, šećernih alkohola i škroba kao izvora ugljika te mogućnost proizvodnje velikih količina proteina i korisnih biokemikalija (Bregmann i sur., 2018). Ne-*Saccharomyces* kvasci su otporniji od *Saccharomyces* kvasca na okolišne izvore stresa kao što su povećani osmotski tlak, visoke koncentracije etanola, visoke temperature, prisutnost toksičnih spojeva i inhibitora rasta. Još jedna povoljna karakteristika većine ne-*Saccharomyces* kvasaca je njihov GRAS status, što ih čini poželjnim (Nakanishi i sur., 2017; Martinez-Jimenez i sur., 2012). Klasificirani su kao askomicete i bazidomicete, a razlikuje ih raspon primjene u industrijskim biotehnološkim procesima (Radecka i sur., 2015). Najčešće korišteni sojevi nekonvencionalnih kvasaca su *Pichia*, *Zygosaccharomyces* i *Kluyveromyces* (Lane i sur., 2011).

2.3.1. *Kluyveromyces marxianus*

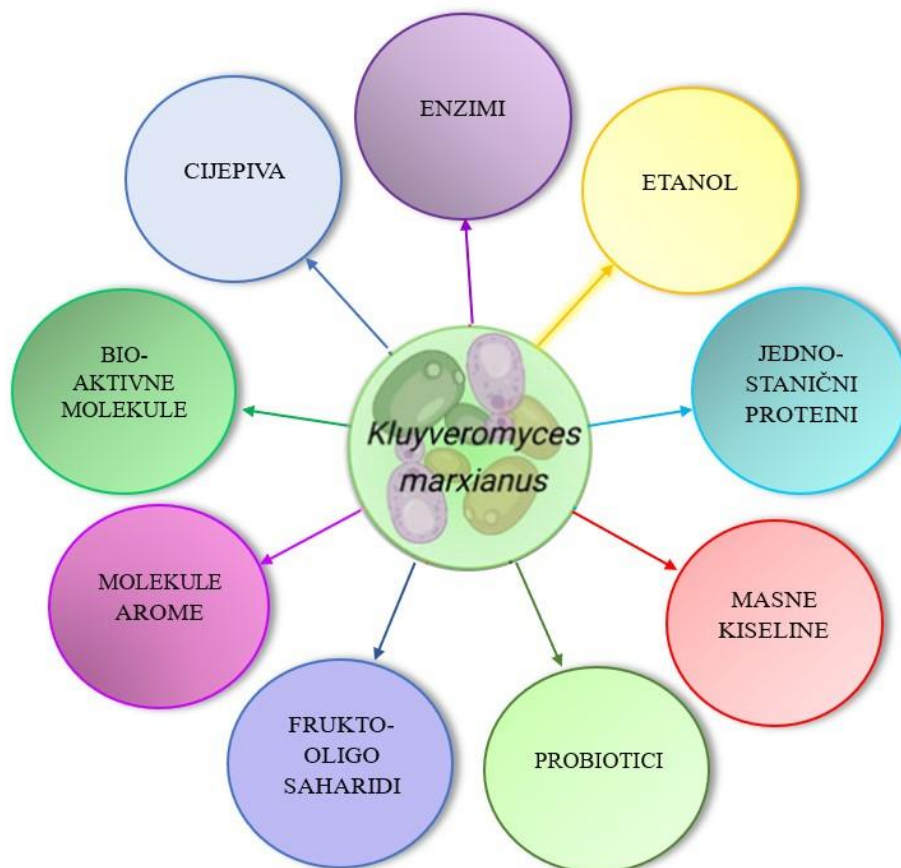
Kluyveromyces marxianus je askomicetni kvasac koji pripada skupini *Saccharomycetaceae*. Prvo je klasificiran kao mikroorganizam iz roda *Saccharomyces* kao *Saccharomyces marxianus*, ali zbog razlika u svojstvima fermentacije i oksidacije različitih šećera, razlike u morfologiji askusa i spora te mogućnosti hibridizacije javila se potreba za promjenom klasifikacije u rod *Kluyveromyces* (Leonel i sur., 2021; Fonesca i sur., 2008). Zbog prisutnosti u mliječnim proizvodima kao što su fermentirano mlijeko, kefir, jogurt, sir i sl. naziva se laktičnim kvascem uz *Kluyveromyces lactis* (Coloretti i sur., 2017; Lachance, 2007). Istaknuta osobina ove dvije vrste je sposobnost asimilacije laktoze kao izvora ugljika što predstavlja značaju razliku u odnosu na konvencionalni kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasci iz roda *Kluyveromyces* su atraktivan izbor za proizvodnju heteroloških proteina, a

budući da, osim GRAS statusa, su priznati od Američke uprave za hranu i lijekove (FDA, eng. Food and Drug Administration) upotrebljavaju se za dobivanje visokovrijednih proizvoda koji se koriste u farmaceutske svrhe te u prehrambenoj industriji (Rouwenhrost i sur., 1999). Zbog respiratorno-fermentativnog tipa metabolizma, kvasac *Kluyveromyces marxianus* proizvodi energiju putem TCA (engl. Tricarboxylic Acid Cycle) ciklusa nakon kojeg slijedi oksidativna fosforilacija, kao i fermentacijom šećera u etanol te spada u skupini Crabtree negativnih kvasaca koji preferiraju respiraciju umjesto fermentacije što je korisno za proizvodnju proteina i biosintezu kemikalija koje nisu etanol (Karimi i sur., 2020; Wagner i Alper, 2016). Izbor soja kvasca *Kluyveromyces* ovisi o genetičkoj dostupnosti te njegovim fiziološkim karakteristikama. Za kvasac *Kluyveromyces marxianus* karakteristična je njegova termotolerancija u temperaturnom rasponu između 44 i 52 °C kao i visoka specifična brzina rasta koja je mnogo veća od one kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, što ovaj kvasac čini prilično atraktivnim izborom iz biotehnoške perspektive (Varela i sur., 2017). Zbog spomenute termotolerancije *K. marxianus* se smatra obećavajućim kvascem za proizvodnju etanola u procesu istovremene saharifikacije i fermentacije (SSF) (Choudhary i sur., 2016; Park i sur., 2015; Suryawati i sur., 2008). U SSF-u se fermentacija provodi na temperaturama višim od 40°C, koje su bliske optimalnim temperaturama za hidrolitičku aktivost celulaznih enzima potrebnih za predobradu lignocelulozne biomase. Korištenje termotolerantnih mikroorganizma poput kvasca *Kluyveromyces marxianus* je nužno za uspješnu fermentaciju. U SSF tipu bioprocasa investicijski troškovi su manji nego kod odvojene hidrolize i fermentacije te je spriječena inhibicija celulaza njihovim krajnjim produktom – glukozom, koja se simultano troši kao supstrat fermentirajućeg mikroorganizma (Olofsson i sur., 2008).

Zbog navedenih osobina kao i mogućnosti rasta na jeftinim izvorima ugljika kao što su lignocelulozne sirovine, melasa, različite iskorištene industrijske otopine, ovaj kvasac pronalazi svoju primjenu u biotehnologiji (Fonesca i sur., 2008; Hensing i sur., 1994). Štoviše, kvasac *Kluyveromyces marxianus* je sposoban rasti na nekoliko polisaharida uključujući pektin i inulin (Hensing i sur., 1994). Uspješno metabolizira šećere oslobođene nakon hidrolize hemiceluloze i celuloze te asimilira razne izvore ugljika, uključujući i arabinozu (Martynova i sur., 2016a; Matsuzaki i sur., 2012). Osim toga, posjeduju prirodnu sposobnost lučenja enzima koji uspješno hidroliziraju polimerne supstrate na jednostavne šećere koje kvasac može metabolizirati (Chi i sur., 2011). Nadalje, rast ovog kvasca na nusproizvodima bogatim saharozom i inulinom odvija se kroz aktivnost izvanstaničnih enzima, posebno inulinaze (β -1,2-D-fruktan fruktano hidrolaze) koja se izlučuje u izvanstanični medij (Rouwenhorst i sur., 1988.). Razgradnja

laktoze izlučivanjem β -galaktozidaza vrlo je obećavajući biotehnološki pristup zbog istodobne proizvodnje biosastojaka, biomase i enzima od industrijskog interesa čemu pridonosi i činjenica da je laktoza glavni ugljikohidrat u sirutki koja predstavlja jeftinu sirovinu za rast mikroorganizama, a dostupna je u velikim količinama (Pentjuss i sur., 2017; Chi i sur., 2011; Fonseca i sur., 2008). Ovaj kvasac uspješno raste i na jednostavnim šećerima kao što su glukoza, fruktoza, ksiloza, galaktoza, laktoza i manoza kada su oni prisutni u hranjivoj podlozi kao jedini izvori ugljika (Pentjuss i sur., 2017; Martynova i sur., 2016b).

Značajniji proizvodi metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* uz etanol, octenu kiselinu, mliječnu kiselinu, etil acetat i glicerol su šećerni alkoholi koji predstavljaju atraktivne biotehnološke proizvode (Pentjuss i sur., 2017). Trenutno je najveća upotreba kvasca *Kluyveromyces marxianus* u industriji usmjerena za proizvodnju enzima kao što su inulinaza, β -galaktozidaza i pektinaza (Lane i Morrissey, 2010).



Slika 4. Visokovrijedni funkcionalni bioproizvodi metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus*

2.4. ŠEĆERNI ALKOHOLI

Šećerni alkoholi su široko rasprostranjeni proizvodi s višestrukom primjenom u različitim sektorima. Od posebne su vrijednosti kao niskokalorični ili nekalorični zaslađivači, koji služe kao zamjena za šećer u prehrambenoj industriji. Osim što daju sladak okus, u usporedbi sa saharozom imaju nekoliko pozitivnih zdravstvenih učinaka. Budući da nisu kariogeni te su manje kalorični, usporena je njihova razgradnja u ljudskom tijelu, zbog čega su skok šećera u krvi i inzulinska reakcija smanjeni (Livesey, 2003). Zaslađivači sa šećernim alkoholom imaju dodatnu prednost jer ne podržavaju rast oralnih bakterija, što znači da njihova konzumacija, za razliku od šećera, ne dovodi do karijesa (Kadrowska Wiater, 2015). U prehrambenoj industriji svoju primjenu pronalaze i kao humektansi i zgušnjivači. Uobičajeni šećerni alkoholi koji se koriste za ove svrhe su manitol, arabitol, eritritol, ksilitol, sorbitol, maltitol, laktitol i izomalt, a odobreni su od strane FDA. Osim u prehrambenoj industriji, šećerni alkoholi se koriste kao gradivne komponente potrebne za sintezu različitih visokovrijednih molekula, uključujući polimere poput poliuretanske pjene (Xiang i sur., 2021). Štoviše, šećerni alkoholi nalaze primjenu u farmaceutskoj industriji, gdje se koriste kao pomoćne komponente koje ulaze u sastav lijekova (Dash i sur., 2019), za proizvodnju askorbinske kiseline (Pappenberger i Hohmann, 2014.) ili za liječenje bolesti kao što je intrakranijalni tlak (Poole i sur., 2020). Zbog spomenutih primjena šećerni alkoholi se klasificiraju kao vrijedne kemikalije čija se potražnja stalno povećava. Do danas se većina šećernih alkohola proizvodi kemijskim putem koristeći čiste šećere, ali očekuje se prijelaz na korištenje obnovljivih, nejestivih sirovina. Većina kvasaca je sposobna asimilirati izvore ugljika iz obnovljivih sirovina, kao što su lignocelulozni supstrati, glicerol i melase te producirati šećerne alkohole. Ove biokonverzije često se suočavaju s poteškoćama kako bi se dobili dovoljno visoki prinosi i produktivnost potrebna za industrijalizaciju procesa (Erian i Sauer, 2022).

Ukupna proizvodnja šećernih alkohola iznosila je oko 1,6 milijuna metričkih tona u 2017. god., što odgovara veličini tržišta od 3,5 milijardi američkih dolara (GlobeNewswire, 2017). Za 2022. god. predviđeno je povećanje na 1,9 milijuna metričkih tona. Ove brojke, koje su u stalnom porastu, pokazuju da je proizvodnja šećernih alkohola relevantna za razmatranje održivosti. Veliki korak za razvoj održive budućnosti je implementacija koncepta kružnog gospodarstva u kojem se obnovljivi izvori koriste za materijalnu proizvodnju, izbjegavajući nakupljanje nusproizvoda kao otpada koji je moguće ponovno upotrijebiti. Proizvodnja šećernog alkohola dobar je primjer kružnog gospodarstva (Erian i Sauer, 2022).

Arabitol je poliol koji se može se dobiti u dva strukturna oblika, kao L-arabitol ili D-arabitol. Ovaj šećerni alkohol molekulske mase 152 g/mol (oba oblika) pripada obitelji pentitola zajedno s ksilitolom i ribitolom. Arabitol je sladak i bezbojan kristal topiv u vodi, a zajedno s drugim pentitolima, koristi se u prehrani te u terapijske svrhe. Ima oko 70 % slatkoće saharoze te dobra svojstva ovlaživanja i rehidracije uz puno niži sadržaj kalorija (arabitol ima sadržaj kalorija od samo 0,2 kcal/g. Istraženo je da L-arabitol može značajno smanjiti masno tkivo u tijelu i spriječiti taloženje masti u probavnom traktu. Djelotvornost mu je slična utjecaju topljivih dijetalnih vlakna (Kumdam i sur., 2013; Mingguo i sur., 2011). D-Arabitol se može koristiti kao supstrat za sintezu kemijskih proizvoda kao što su arabska i ksilonska kiselina, propilen, etilen glikol, ksilitol, enantiočisti spojevi, imunosupresivni glikolipidi, herbicidi i antipatogeni lijekovi (Zhang i sur., 2014; Yoshikawa i sur., 2014; Koganti i Ju, 2013; Koganti i sur., 2011). Trenutno se arabitol u industrijskim razmjerima proizvodi kemijskom redukcijom laktone arabinonske i ksilonske kiseline, u reakciji koja zahtijeva skupi katalizator i konstantnu temperaturu od 100 °C (Kumdam i sur., 2013). Međutim, umjesto kemijske proizvodnje, arabitol se može sintetizirati biotehnološkim putem takozvanom biokonverzijom ili biotransformacijom, za koju se vjeruje da je ekološki prihvatljiva i isplativija, jer ne zahtijeva korištenje čistih šećernih supstrata i kemijskih katalizatora. Biokonverzija podrazumijeva mikrobnu proizvodnju uz primjenu enzimskih biokatalizatora (Zhang i sur., 2014).

Ksilitol je šećerni alkohol kategoriziran kao poliol ili šećerni alkohol (alditol). Kemijske je formule $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_3\text{CH}_2\text{OH}$ te je akiralni izomer pentan 1,2,3,4,5-pentola (Awuchii, 2017). Za razliku od drugih prirodnih ili sintetskih sladila, ksilitol pokazuje zdravstvene pozitivne učinke na zdravlje zubi smanjenjem karijesa za 70 % redovitom uporabom te pomaže u remineralizaciji. Višestruka istraživanja koja su koristile elektronsku mikroskopiju pokazale su da je ksilitol učinkovit u induciranju remineralizacije dubljih slojeva demineralizirane cakline. Zbog spomenutih učinaka, ksilitol se koristi kao sastojak žvakaćih guma, pastila ili sprejeva za nos te uspješno smanjuje i učestalost akutnih infekcija srednjeg uha kod zdrave djece (Miake i sur., 2013). Prirodno se nalazi u malim koncentracijama u vlaknima različitog voća i povrća, te se može uspješno ekstrahirati iz bobičastog voća, zobi i gljiva, kao i vlaknastog materijala kao što su kukuruzna ljuska ili šećerna trska (Awuchii, 2017). Međutim, zbog povećanja interesa za ksilitolom, razvila se industrijska proizvodnja iz ksilana (komponenta hemiceluloze) ekstrahiranog iz kore drveta ili klipa kukuruza, koji je hidroliziran u ksilozu te katalitički hidrogeniran u ksilitol (Rao i sur., 2006). Ima oko 40 % slatkoće uz puno niži sadržaj kalorija od 2,43 kcal/g. Osim kemijskom sintezom, proizvodnja

ksilitola u industrijskom mjerilu odvija se biotehnoškim putem fermentacijom čiste ksiloze ili hemiceluloznog hidrolizata iz komercijalnih izvora. Ispitivana je proizvodnja ksilitola bakterijama, kvascima i plijesnima gdje su se kvasci pokazali kao najbolji proizvođači ksilitola (Awuchii, 2017; Coverti i sur., 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Za potrebe izrade diplomskog rada korišteni su sljedeći sojevi kvasca: *Kluyveromyces*: *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Radna kultura čuvana je pri 4 °C na kompleksnoj YPD podlozi (engl. Yeast, Pepton, Dextrose), u Petrijevim zdjelicama.

3.1.2. Sirovine

Za svrhu provedbe istraživanja, kao lignocelulozna sirovina, korišteni su izluženi rezanci šećerne repe iz pogona za proizvodnju šećera Sladorana Županja, a njihov sastav određen je u radu Perković (2020). Udjel suhe tvari u izluženim repinim rezancima iznosi 92 %, a sastav je prikazan u tablici 1. Sastav tekućeg hidrolizata dobivenog predtretmanom kiselinske hidrolize prikazan je u tablici 2. Kao drugi izvor ugljika korišten je komercijalno dostupan glicerol proizvođača Merck (Darmstadt, Njemačka), specifikacijskog broja 1.04093.9010.

Tablica 1. Sastav izluženih repinih rezanaca (Perković, 2020)

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

Tablica 2. Sastav tekućeg hidrolizata dobivenog kiselinskom predobradom

Tvar	glukoza	ksiloza	arabinoza	mravlja kiselina	octena kiselina
Koncentracija [g/L]	1,45	2,75	12,21	0,48	2,49

3.1.3 Kemikalije

U tablici 3. prikazane su korištene kemikalije, stupanj čistoće istih te proizvođač.

Tablica 3. Čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih tijekom istraživanja

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
arabinoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
glicerol	≥ 99 %	Merck KgaA, Njemačka
mravlja kiselina	≈ 98 %	Honeywell, SAD
octena kiselina	99,5 %	Avantor, SAD
sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KgaA, Njemačka
protupjenič	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.4. Hranjive podloge

3.1.4.1. Hranjive podloge za pripremu inokuluma i uzgoj *Kluyveromyces kvasaca*

Za uzgoj inokuluma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 korištena je YPD podloga s 20 g/L glukoze, 20 g/L peptona i 10 g/L kvašćevog ekstrakta.

Ispitivanja rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 provedeno je u Erlenmeyerovim tikvicama na različitim izvorima ugljika s različitim koncentracijama, a kemijski sastavi podloga prikazani su u tablici 4.

Pojedini uzgoji kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provedeni su u bioreaktorima s miješalom na podlozi koja simulira sastav tekućeg kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe s kemijskim sastavom prikazanim u tablici 5.

U tablici 6. prikazan je kemijski sastav hranjive podloge korištene za ispitivanje rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlozi s glicerolom, a uzgoji su provedeni u bioreaktorima s miješalom.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge za uzgoj kvasaca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na glukozu, arabinozi, ksilozi i glicerolu kao izvorima ugljika u Erlenmeyerovim tikvicama

	Tvar	glukoza	arabinoza	glicerol	ksiloza	kvašćev ekstrakt	pepton
Koncentracija γ [g/L]	Podloga 1 (P1)	10,0	-	-	-	10,0	20,0
	Podloga 2 (P2)	15,0	-	-	-	10,0	20,0
	Podloga 3 (P3)	20,0	-	-	-	10,0	20,0
	Podloga 4 (P4)	-	10,0	-	-	10,0	20,0
	Podloga 5 (P5)	-	15,0	-	-	10,0	20,0
	Podloga 6 (P6)	-	20,0	-	-	10,0	20,0
	Podloga 7 (P7)	-	-	10,0	-	10,0	20,0
	Podloga 8 (P8)	-	-	15,0	-	10,0	20,0
	Podloga 9 (P9)	-	-	20,0	-	10,0	20,0
	Podloga 10 (P10)	-	-	-	10,0	10,0	20,0
	Podloga 11 (P11)	-	-	-	15,0	10,0	20,0
	Podloga 12 (P12)	-	-	-	20,0	10,0	20,0

Tablica 5. Sastav hranjive podloge koja simulira kiselinški hidrolizat izluženih rezanaca šećerne repe za uzgoje kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktorima s miješalom

Tvar	glukoza	ksiloza	arabinoza	mravlja kiselina	octena kiselina	kvašćev ekstrakt	pepton
γ [g/L]	5,0	3,0	15,0	0,2	2,0	3,0	3,0

Tablica 6. Sastav hranjive podloge za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlozi s glicerolom u bioreaktorima s miješalom

Tvar	glicerol	kvašćev ekstrakt	pepton
γ [g/L]	25,0	3,0	3,0

3.1.4.2. Kompleksne hranjive podloge za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777

Za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktorima s miješalom korištena je tekuća faza dobivena kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe. Tretman kiselinske hidrolize opisan je u Poglavlju 3.2.2., a sastav podloge za uzgoj u bioreaktorskim sustavima prikazan je u tablici 2. U podlogu su kao izvori dušika dodani kvašćev ekstrakt i pepton u koncentraciji od 3 g/L.

3.1.5. Uređaji i pribor

3.1.5.1. Bioreaktori s miješalom

Aerobni uzgoji kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provedeni su šaržno u bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) na hranjivoj podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat izluženih repinih rezanaca te na hranjivoj podlozi s glicerolom kao glavnim izvorom ugljika. Bioreaktor je izgrađen od nehrđajućeg čelika s ukupnim volumenom od 30 L. Bioreaktor ima miješalo s tri turbine, a svaka turbina ima 6 ravnih lopatica. Snaga elektromotora za pokretanje miješala iznosi 0,9 kW. Prilikom korištenja bioreaktora mogu se regulirati pH-vrijednost, brzina okretaja miješala, protok zraka, temperatura te parcijalni tlak kisika u podlozi pomoću polarografske kisikove elektrode. Ulazni i izlazni zrak iz reaktora prolaze kroz ugrađeni membranski filter. Sterilizacija bioreaktora provodi se preko plašta vodenom parom. Za prepumpavanje sadržaja u bioreaktor koriste se, već uklopljene u bioreaktor, peristaltičke pumpe.

Anaerobni uzgoji kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 provedeni su šaržno u bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) na hranjivoj podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat izluženih repinih rezanaca te na hranjivoj podlozi s glicerolom kao glavnim izvorom ugljika. Bioreaktor je izrađen od nehrđajućeg čelika, ukupnog volumena 42 L. Opremljen je miješalom s tri podesive turbine koje imaju po 6 ravnih lopatica.

Elektromotor snage 2,09 kW pokreće miješalo. Maksimalna brzina rotacije miješala iznosi 3000 rpm. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom sa sustavom za mjerenje i regulaciju temperature, pH vrijednosti podloge, protoka zraka, brzine rotacije miješala, razine pjene, parcijalnog tlaka kisika u podlozi, izlaznih plinova (O₂ i CO₂) i turbidimetrom. Na poklopcu bioreaktora nalaze se ulazni i izlazni membranski filteri za zrak te ulazi za inokulaciju i dodavanje različitih otopina (npr. za korekciju pH) pomoću ugrađenih peristaltičkih pumpi. Sterilizacija bioreaktora provodi se vodenom parom preko plašta.

Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na hranjivoj podlozi dobivenoj kiselinskom hidrolizom izluženih repinih rezanaca proveden je u staklenom bioreaktoru dimenzija 15 x 30 cm, korisnog volumena 2 L. Bioreaktor je povezan s komadnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) preko koje se provodi automatska regulacija temperature te pH vrijednosti, a sam bioreaktor je opremljen pH elektrodom, sustavom za izuzimanje uzoraka, sustavom za regulaciju pH, sustavom za prepumpavanje podloge i inokulaciju te temperaturnom sondom. Grijanje i hlađenje podloge u reaktoru provodi se cirkuliranjem vode kroz plašt. Sterilizacija se provodi u autoklavu pri temperaturi od 120 °C i u trajanju od 20 min.

3.1.5.2. Visokotlačni reaktor za predobradu sirovina

Visokotlačni reaktor korišten je za predobradu lignocelulozne sirovine, izluženih rezanaca šećerne repe, u dvostupanjskoj kiselinskoj hidrolizi s ciljem dobivanja tekućeg hidrolizata kao izvora ugljika za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. Reaktor se sastoji od reaktorske posude za predobradu sirovine, perforirane košare od nehrđajućeg čelika volumena 20 L za prihvatanje sirovine, plašta za zagrijavanje reaktora koji sadrži termičko ulje čijom cirkulacijom se sustav zagrijava, pumpe koja omogućava strujanje zagrijanog ulja unutar plašta, ventila za izuzimanje tekućeg dijela te zaštitne i kontrolne jedinice za regulaciju procesnih parametara. Po završetku procesa predobrade, potrebno je izjednačiti tlak u reaktoru s atmosferskim tlakom pomoću ventila na gornjoj strani reaktora. Nakon provedene predobrade, tekući dio ispušta se otvaranjem ventila na dnu reaktora, dok čvrsti dio zaostaje u perforiranoj košari koja se vadi s gornje strane.

3.1.5.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (engl. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)

Za praćenje promjene koncentracije supstrata i produkata tijekom provođenja uzgoja korišten je uređaj tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti, UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD), a sastoji se od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Korištena mobilna faza u sustavu je 0,0025 M otopina sumporne kiseline uz postavljeni protok od 0,6 ml/min, dok je zadani volumen analiziranog uzroka iznosio 10 µL.

3.1.5.4. Spektrofotometar

Za određivanje optičke gustoće hranjive podloge koja služi kao indirektni pokazatelj rasta biomase kvasaca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS proizvođača Agilent Technologies. Optička gustoća izuzimanih uzoraka mjerena je u staklenoj kiveti promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) pri valnoj duljini od 600 nm.

3.1.5.5. Centrifuge

U svrhu izdvajanja biomase i tekuće faze iz hranjive podloge korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD) pri 6000 - 8000 rpm. U svrhu analitike, za pripremu uzoraka za UPLC, korištena je centrifuga (CF-10 High-Performance, Njemačka), pri 10000 rpm.

3.1.5.6. Tresilica za mikrobiološki uzgoj

Uzgoji kvasaca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u Erlenmeyerovim tikvicama provedeni su na tresilici Certomat RM (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka) pri 30 °C i 250 rpm.

3.1.5.7. Ostala oprema i pribor

Za potrebe provedbe eksperimentalnog dijela pored spomenutih uređaja korištena je i analitička vaga (ALC210.4; Acculab, SAD), tehnička vaga (ET – 1211; Tehnica, Slovenija), pH metar (HI 9125; Hanna Instruments, SAD), autoklav (Sutjeska, Jugoslavija), sušionik (ST-50; Instrumentaria, Hrvatska), vorteks miješalica (LLG – uniTEXTER 1; LLG – Labware, Njemačka) plamenici, stakleno i plastično laboratorijsko posuđe, hladnjaci i zamrzivač za potrebe čuvanja uzoraka pri -20°C.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema inokuluma kvasaca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712

Priprema inokuluma sva tri soja kvasaca *Kluyveromyces* provodila se na isti način koji će biti opisan dalje u tekstu. Prethodno porasla kultura na čvrstoj YPD podlozi (sastav podloge opisan u poglavlju 3.1.4.1.) u Petrijevim zdjelicama precijepljena je u staklene epruvete s 5 mL YPD podloge po epruveti, a zatim je uzgajana 24 h bez miješanja pri 28 °C. Cijelokupni volumen porasle kulture iz epruvete precijepljen je u Erlenmeyerove tikvice s 200 mL YPD podloge. Uzgoj kulture u Erlenmeyerovim tikvicama proveden je na tresilici tijekom 24 h na 30 °C uz miješanje od 250 o/min. Kultura pripremljena na taj način služila je kao inokulum za uzgoje provedene u bioreaktorima, kao i uzgoje provedene u Erlenmeyerovim tikvicama. Ovisno o potrebama volumena inokuluma za pojedini uzgoj, pripremljeni su i različiti volumeni inokuluma.

3.2.2. Predobrada izluženih reznaca šećerne repe

Za iskorištavanje zaostalih izvora ugljika u izluženim repinim rezancima, iste je potrebno tretirati. Odabrana predobrada sirovine provela se prema metodi opisanoj u Mardetko i sur. (2018). Provedene su dvije šarže u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C tijekom 10 min. Za provedbu jedne šarže potrebno je odvagati 1080 g (udio suhe tvari u repinim rezanicama iznosi 92 %) sirovine za koju je potrebno pripremiti 0,5 %-tnu otopinu sumporne kiseline, volumena 10 L. Izvagana masa sirovine prenosi se u košaru od nehrđajućeg čelika, prelijeva se pripremljenim, cjelokupnim, volumenom kiseline nakon čega započinje tretman predobrade. U prvoj provedenoj šarži dobiven je volumen od 5 L tekućeg hidrolizata, dok je u drugoj dobiveno 6,2 L tekućeg hidrolizata. Dobiveni tekući dio korišten je kao podloga za šaržni uzgoj u

aerobnim i anaerobnim uvjetima kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. Zaostali čvrsti dio korišten je za daljnje analize.

3.2.3. Priprema kiseline i lužine za podešavanje pH vrijednosti

Za potrebe podešavanja pH na odgovarajuću vrijednost za rast sojeva kvasaca *Kluyveromyces* pripremljena je 3 M H₂SO₄. Odgovarajući volumen 96 %-tne sumporne kiseline razrijeđen je u 4 L demineralizirane vode. Za pripremu 3 M NaOH, izračunata i odvagana masa kristala NaOH je otopljena u, također, 4 L demineralizirane vode. Pripremljene otopine kiseline i lužine su nakon toga sterilizirane u autoklavu pri 120 °C u trajanju od 20 min i pri tlaku od 1 bara. Korištene su za korekciju pH vrijednosti svih hranjivih podloga upotrijebljenih tijekom provedenog istraživanja.

3.2.4. Priprema hranjivih podloga

3.2.4.1. Priprema YPD podloga za uzgoj inokuluma kvasaca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712

Za uzgoj inokuluma sva tri soja kvasca *Kluyveromyces* kroz tri faze: uzgoj na čvrstoj podlozi u Petrijevoj zdjelici, uzgoj u epruveti te uzgoj u tikvici na tresilici, pripremljena je podloga sastava opisanog u Poglavlju 3.1.4.1. Izračunate i odvagane mase potrebnih tvari otopljene su u odgovarajućim volumenima demineralizirane vode te sterilizirane u autoklavu pri 120 °C u trajanju od 20 minuta.

3.2.4.2. Priprema hranjive podloge za uzgoj kvasaca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na različitim izvorima ugljika

Ispitivanje utjecaja različitih izvora ugljika na rast sva tri soja kvasca *Kluyveromyces* kao i utjecaj različitih koncentracija korištenih izvora ugljika proveden je na hranjivim podlogama čiji je sastav prikazan u tablici 4. U Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, dodano je 200 mL demineralizirane vode te prethodno izračunate i odvagane mase tvari. Korištena su četiri različita izvora ugljika: glukoza, arabinoza, glicerol i ksiloza, te za svaki izvor ugljika tri različite koncentracije: 10 g/L, 15 g/L te 20 g/L. Pripremljeno je ukupno 12 različitih hranjivih podloga za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama. Budući da je ispitivan rast tri soja kvasca

Kluyveromyces bilo je potrebno pripremiti za svaki soj 12 spomenutih hranjivih podloga što je ukupno 36.

3.2.4.3. Priprema hranjivih podloga za uzgoj kvasca Kluyveromyces marxianus NBRC 1777 u bioreaktorima s miješalom na podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe

Za šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u aerobnim uvjetima pripremljeno je 4,5 L hranjive podloge prema sastavu prikazanom u tablici 6. Izračunate i odvagane mase tvari otopljenae su u odgovarajućem volumenu demineralizirane vode prethodno dodanog u Erlenmeyerovu tikvicu. U hranjivu podlogu dodane su 2 kapi protupjeniča proizvođača Sigma-Aldrich, a zatim je hranjiva podloga pomoću lijevka ulivena u bioreaktor s miješalom ukupnog volumena 30 L, te sterilizirana *in situ* pri 121 °C tijekom 20 minuta te pri tlaku od 1 bara. Nakon završene sterilizacije podloga je ohlađena na temperaturu uzgoja 30 °C te jejH vrijednost podešena na 6 dodatkom prethodno pripremljene 3 M otopine NaOH-a.

Za šaržni uzgoj u anaerobnim uvjetima kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 pripremljeno je 5,5 L prethodno opisane hranjive podloge koja je prelivena pomoću lijevka u bioreaktor s miješalom ukupnog volumena 42 L, te sterilizirana *in situ* pri 121 °C tijekom 20 minuta i pri tlaku od 1 bara.

3.2.4.4. Priprema hranjivih podloga s glicerom, kao jedinim izvorom ugljika, za uzgoj kvasca Kluyveromyces marxianus NBRC 1777 u bioreaktorima s miješalom

Za šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u aerobnim uvjetima pripremljeno je 4,5 L hranjive podloge, a u anaerobnim uvjetima 5,5 L hranjive podloge prema sastavu prikazanom u tablici 7. Podloga je pripremljena za uzgoj prema načinu opisanom u Poglavlju 3.2.4.2.

3.2.4.5. Priprema hranjive podloge za šaržni uzgoj kvasca Kluyveromyces marxianus NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe

U dobivenu tekuću fazu nakon kiselinske predobrade izluženih rezanaca šećerne repe (Poglavlje 3.2.2.) dodane su izračunate i odvagane odgovarajuće količine kvašćevog ekstrakta i peptona (Poglavlje 3.1.4.2.) te 2-3 kapi protupjeniča. Pripremljena podloga sterilizirana je u autoklavu pri 120 °C tijekom 20 minuta. Pripremljena sterilna hranjiva podloga je prepumpana u bioreaktor u aseptičnim uvjetima. Volumen pripremljene podloge iznosio je 2 L. Za šaržni

uzgoj u aerobnim, odnosno anaerobnim, uvjetima korišten je po 1 L podloge. Za podešavanje pH vrijednosti na 6 korištena je prethodno pripremljena otopina sumporne kiseline te natrijeve lužine (Poglavlje 3.2.3.), a temperatura podloge za oba uzgoja iznosila je 30 °C.

3.2.5. Provedba i nadzor uzgoja odabranih sojeva kvasca *Kluyveromyces*

3.2.5.1. Uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na različitim izvorima ugljika

Provedeno je ukupno 36 uzgoja (tri različite koncentracije za četiri različita izvora ugljika ispitivana za tri soja kvasca *Kluyveromyces*) na hranjivim podlogama čija je priprema opisana u Poglavlju 3.2.4.2. Uzgoj se provodio u Erlenmeyerovim tikvicama na tresilici, uz konstantno miješanje pri 250 rpm, na temperaturi od 30 °C. Pripremljene podloge volumena 200 mL nacijepljene su s 10 mL inokuluma (Poglavlje 3.2.1.). Uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama trajao je 24h, a provodio se kroz 2 seta eksperimenata. U prvom setu eksperimenata ispitivan je rast odabranih sojeva kvasca *Kluyveromyces* na glukozu i arabinozi kao izvoru ugljika, a u drugom ciklusu na ksilozi i glicerolu kao izvoru ugljika. U određenim vremenskim intervalima sterilno je izuzimano po 5 ml uzorka iz svake tikvice. Najprije je očitana optička gustoća pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini 600 nm, a zatim su uzorci centrifugirani pri 7000 rpm, 7 minuta. Dobiveni supernatant analiziran je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC) u svrhu praćenja promjene koncentracije supstrata i produkata.

3.2.5.2. Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, u aerobnim i anaerobnim uvjetima, u bioreaktorima s miješalom na podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe

Šaržni uzgoj u aerobnim uvjetima proveden je u biorektoru Biostat Cplus korisnog volumena 2 L na hranjivoj podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe čija je priprema opisana u Poglavlju 3.2.4.3. Podloga je inokulirana s 400 mL inokuluma pripremljenog prema poglavlju 3.2.1. Uzgoj je vođen pri temperaturi od 35 °C, pH vrijednosti podloge 6,0 uz protok zraka od 2,0 L/min te konstantno miješanje od 400 rpm. Regulacija pH vrijednosti podloge provodila se automatskim doziranjem 3 M H₂SO₄, odnosno 3 M NaOH. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima tijekom 24 h uzgoja. Praćena je optička gustoća podloge pomoću spektrofotometra, suha tvar biomase gravimetrijski te je analizirana promjena koncentracija supstrata i produkata UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja uzorka.

Šaržni uzgoj u anaerobnim uvjetima proveden je u bioreaktoru Biostat Cplus korisnog volumena 29,4 L. Za razliku od prethodno opisanog uzgoja, osim anaerobnih uvjeta uzgoja, podloga je inokuliran sa 600 mL inokuluma.

*3.2.5.3. Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, u aerobnim i anaerobnim uvjetima, u bioreaktorima s miješalom na podlozi s glicerolom*

Šaržni uzgoj u aerobnim uvjetima proveden je u bioreaktoru Biostat Cplus korisnog volumena 21 L na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi s glicerolom kao izvorom ugljika čija je priprema opisana u Poglavlju 3.2.4.4. Podloga je inokulirana s 400 mL inokuluma pripremljenog prema poglavlju 3.2.1. Uzgoj je vođen pri temperaturi od 30 °C, pH vrijednosti podloge 6,0 uz protok zraka od 2,0 L/min te konstantno miješanje od 450 rpm. Regulacija pH vrijednosti podloge provodila se automatskim doziranjem 3 M H₂SO₄, odnosno 3 M NaOH. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima tijekom 30 h uzgoja. Praćena je optička gustoća podloge pomoću spektrofotometra te je analizirana promjena koncentracija suptrata i produkata UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja uzoraka.

Šaržni uzgoj u anaerobnim uvjetima proveden je u bioreaktoru Biostat Cplus. Za razliku od prethodno opisanog uzgoja, osim anaerobnih uvjeta uzgoja, podloga je inokuliran sa 600 mL inokuluma.

*3.2.5.4. Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, u aerobnim i anaerobnim uvjetima, u bioreaktorima s miješalom na kiselinskom hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe*

Šaržni uzgoj, u aerobnim i anaerobnim uvjetima, proveden je u staklenom bioreaktoru korisnog volumena 2 L na tekućem hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe. U oba uzgoja podloga (Poglavlje 3.2.4.5.) je inokulirana s 200 mL inokuluma pripremljenog prema Poglavlju 3.2.1. Uzgoj je vođen pri temperaturi od 30 °C, pH vrijednosti podloge 6,0 uz protok zraka od 2,0 L/min u aerobnim uvjetima, te konstantno miješanje od 450 rpm za aerobne uvjete, a 250 rpm u anaerobnim uvjetima. Regulacija pH vrijednosti podloge provodila se automatskim doziranjem 3 M H₂SO₄, odnosno 3 M NaOH. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima tijekom 48 h uzgoja. Praćena je optička gustoća podloge pomoću spektrofotometra te je analizirana promjena koncentracija suptrata i produkata UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja uzoraka.

3.2.6. Analitičke metode

Tijekom uzgoja odabranih sojeva kvasaca *Kluyveromyces* praćena je optička gustoća podloge spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije izuzetih uzoraka, kemijski sastav podloge UPLC analizom, te koncentracija biomase gravimetrijski.

3.2.6.1. Određivanje optičke gustoće spektrofotometrijski

Optička gustoća (OD) izuzimanih uzoraka tijekom svakog uzgoja određivana je pomoću spektrofotometra Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies). Prije mjerenja, uzorak je homogeniziran na vrtložnoj miješalici te su 2,5 mL uzoraka analizirana u staklenoj kiveti pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}) u svrhu praćenja rasta biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712.

3.2.6.2. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

UPLC analiza korištena je za određivanje i praćenje promjene koncentracije supstrata i produkata tijekom provedenih uzgoja. U 750 μ L supernatanta uzorka dodano je 750 μ L 10 %-tne otopine cinkova sulfata. Nakon toga je dvostruko razrijeđeni uzorak vorteksiran i ostavljen na sobnoj temperaturi 15 minuta kako bi se provela reakcija između dodanog cinkovog sulfata i proteina te ostalih prisutnih nečistoća. Centrifugiranjem uzoraka 5 minuta na 10000 rpm izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant je profiltriran kroz mikrobiološki filter promjera pora 0,2 μ m u staklenu bočicu. Na taj način su uzorci pripremljeni za UPLC analizu.

Korištena mobilna faza je 0,0025 M otopina sulfatne kiseline pripremljena razrjeđivanjem 139 μ L 96 % H_2SO_4 u 1 L destilirane vode. Dobivena otopina je filtrirana vakuum filterom te dekarbonizirana djelovanjem ultrazvučne kupelji. Zatim je 10 μ L pripremljenog uzorka propušteno kroz kolonu pri 60 °C, protokom od 0,6 mL/min. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa OpenLAB CDS. Koncentracije supstrata i produkata u uzorcima izračunate su iz jednadžbi pravaca baždarnih dijagrama prikazanih u Prilogu 1.

3.2.6.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase

U osušene i izvagane kivete otpipetirano je 5 mL uzorka izuzetog tijekom uzgoja. Biomasa je izdvojena centrifugiranjem pri 7000 o/min tijekom 7 minuta. Nakon centrifugiranja, dobiven talog je sušen na 50 °C do konstantne mase, nakon čega su kivete ohlađene u eksikatoru

i izvagane na analitičkoj vagi. Koncentracija biomase u uzorku (X) izračunala se prema jednadžbi 1:

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

m_{ok} - masa kivete s osušenom biomasom,

m_{pk} - masa prazne kivete,

V_{uz} - volumen uzorka

3.2.6.4. *Određivanje specifične brzine potrošnje kisika u bioreaktoru s miješalom*

Specifična brzina potrošnje kisika u bioreaktoru s miješalom određena je direktnom metodom prilikom vođenja uzgoja u bioreaktoru s miješalom na podlozi koja simulira kiselinski hidrolizat šećerne repe. U 2., 4., 6., i 8. satu uzgoja prekinuta je dobava zraka u bioreaktor i brzina miješanja je smanjena na 150 o/min. U vremenskom intervalu od 80 sekundi, svakih 5 sekundi zabilježena je vrijednost postotka zasićenja podloge. Prije postizanja kritične vrijednosti koncentracije otopljenog kisika u podlozi (kada vrijednost specifične brzine respiracije (q_{o2}) prestaje biti konstanta, ponovno je pokrenuta aeracija. Vrijednost specifične brzine potrošnje kisika opisana je u jednadžbi 2:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_S - C_L) - q_{o2} X \quad [2]$$

C_L - koncentracija otopljenog kisika u podlozi [mol ili g O₂/m³];

$K_L a$ - volumni koeficijent prijenosa kisika [1/h];

t - vrijeme [h];

C_S - koncentracija zasićenja podloge kisikom [mol ili g O₂/m³];

q_{o2} - specifična brzina potrošnje kisika [mol ili g O₂/ h g];

X - koncentracija biomase [g/L].

Prvi član u jednadžbi opisuje prijenos kisika iz zraka u podlogu dok drugi predstavlja potrošnju kisika kojeg stanica kvasca koristi tijekom rasta. S prekidom aeracije, potrošnja kisika u sustavu ostaje konstanta zbog čega dobivamo linearnu ovisnost koncentracije kisika u podlozi o vremenu. Nagib pravca predstavlja potrošnju kisika u sustavu, a specifična brzina potrošnje

kisika se odredi na temelju koncentracije biomase (X) u satu u kojem je proveden prekid aeracije.

3.2.7. Proračun pokazatelja uspješnosti provođenja procesa

Prinos produkta (Y_P) računa se prema izrazu:

$$Y_P = P - P_0 \quad [3]$$

Y_P - prinos produkta [g/L],

P - konačna koncentracija produkta [g/L],

P_0 - početna koncentracija produkta [g/L]

Ukupna potrošnja supstrata računa se prema izrazu:

$$Y_S = S_0 - S \quad [4]$$

Y_S - potrošnja supstrata [g/L],

S_0 - početna koncentracija supstrata [g/L],

S - konačna koncentracija supstrata [g/L]

Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) računa se prema izrazu:

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad [5]$$

$Y_{P/S}$ - koeficijent konverzije supstrata u produkt [g/g],

Y_P - prinos produkta [g/L],

Y_S - ukupna potrošnja supstrata [g/L]

Produktivnost se računa prema izrazu:

$$Pr = \frac{Y_P}{t_{uk}} \quad [6]$$

Pr - produktivnost [g/L h],

Y_P - prinos produkta [g/L],

t_{uk} - ukupno vrijeme trajanja uzgoja [h]

Specifična brzina potrošnje supstrata r_S (1/h) te specifična brzina sinteze produkata r_P (1/h) određene su kao reakcije prvog reda (Marđetko i sur., 2018) iz eksperimentalnih podataka, a opisane su izrazima 7 i 8:

$$\ln S_0 = \ln S + r_S \times t \quad [7]$$

$$\ln P = \ln P_0 + r_P \times t \quad [8]$$

gdje su r_S i r_P određene kao koeficijent smjera pravca linearizirane regresijske funkcije.

Specifična brzina rasta mikroorganizma se računa prema izrazu:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \times t \quad [9]$$

X_0 - početna koncentracija biomase [g/L],

X - konačna koncentracija biomase [g/L]

μ - specifična brzina rasta mikroorganizma [1/h].

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedeni su uzgoji kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na različitim hranjivim podlogama. Najprije je ispitivan rast odabranih sojeva kvasca *Kluyveromyces* na hranjivim podlogama s četiri različita izvora ugljika, kao i utjecaj različite koncentracije supstrata u podlozi na rast kvasaca. Na osnovu rezultata dobivenih tijekom uzgoja na različitim vrstama izvora ugljika, kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 je odabran za daljnje istraživanje u većem mjerilu. Ispitivana je sposobnost rasta te potencijal proizvodnje vrijednih proizvoda (šećernih alkohola), tijekom šaržnih uzgoja u aerobnim i anaerobnim uvjetima na kemijski definiranim te kompleksnim hranjivim podlogama. Za provedene uzgoje grafički je prikazana promjena koncentracije biomase, supstrata i produkata (slike 5.-19.) Na temelju dobivenih rezultata izračunati su pokazatelji uspješnosti procesa.

U Poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u Erlenmeyerovim tikvicama na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika u različitim koncentracijama.

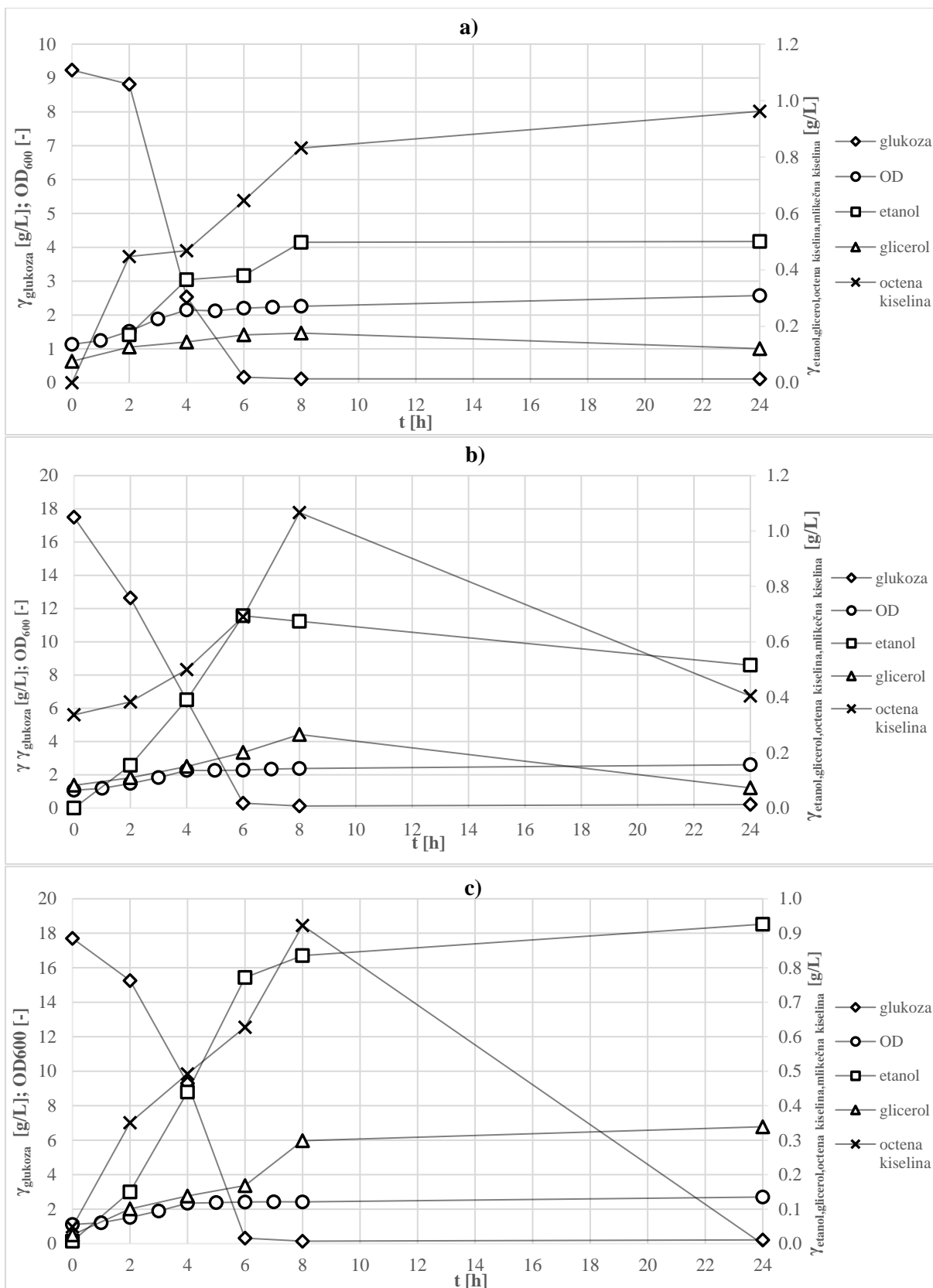
U Poglavlju 4.2. prikazani su rezultati šaržnog uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, u bioreaktoru s miješalom, na hranjivoj podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih reznaca šećerne repe u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

U Poglavlju 4.3. prikazani su rezultati šaržnog uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu izluženih reznaca šećerne repe.

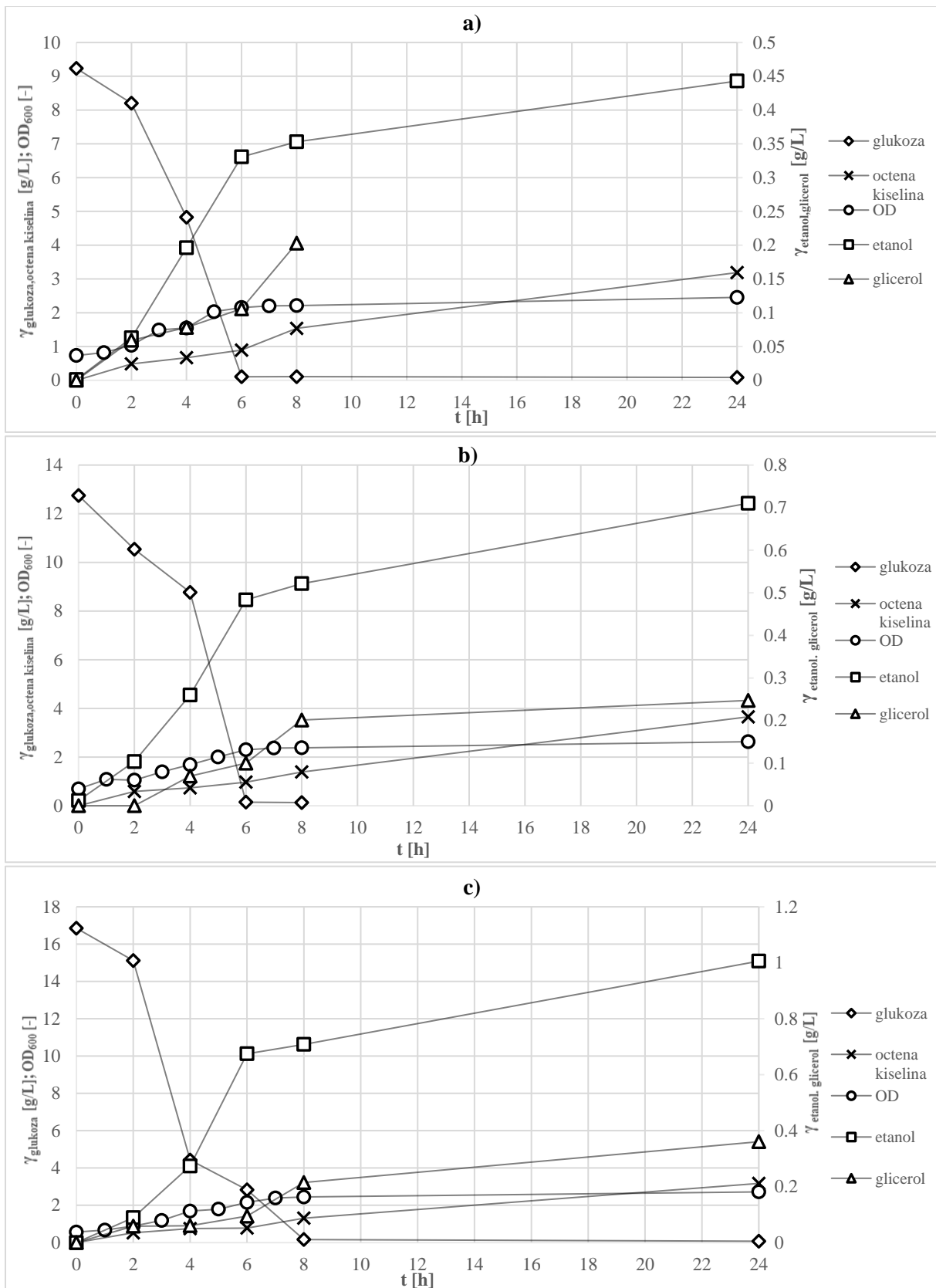
U Poglavlju 4.4. prikazani su rezultati šaržnog uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, u bioreaktoru s miješalom, na podlozi s glicerolom kao glavnim izvorom ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

4.1. UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 te *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 NA PODLOGAMA S RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA U RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA

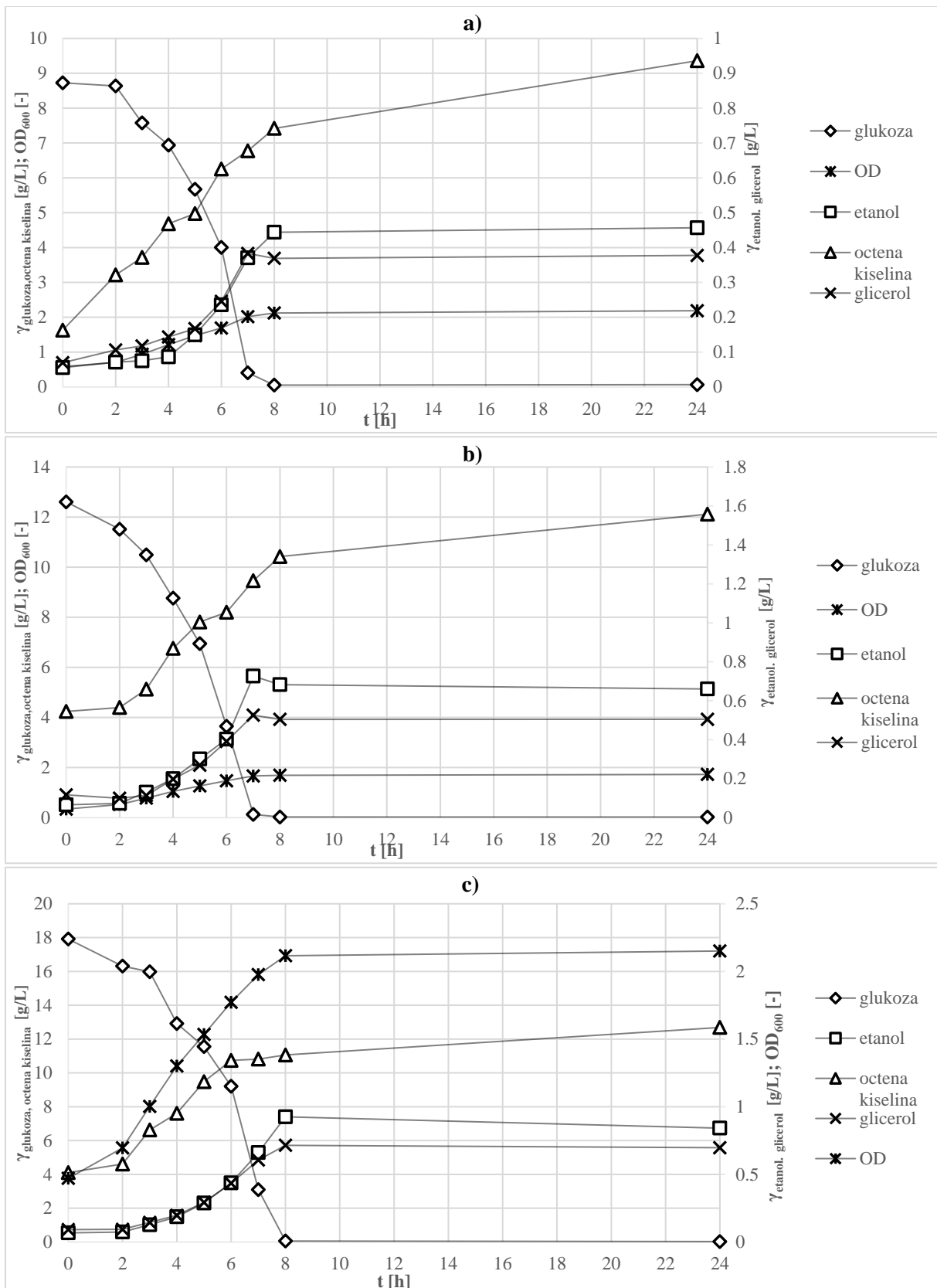
Istraživanje sposobnosti rasta te potencijala proizvodnje šećernih alkohola ovisno o izvoru ugljika u podlozi kao i koncentraciji istog provedeno je u Erlenmeyerovim tikvicama za sva tri odabrana soja kvasca *Kluyveromyces*, a sastav podloga prikazan je u tablici 4. (Poglavlje 3.1.4.1.). Podloge su pripremljene na način opisan u Poglavlju 3.2.4.2., a tijek provedbe uzgoja opisan je u Poglavlju 3.2.5.1. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata, produkata te optičke gustoće podloge pri 600 nm (direktan pokazatelj rasta kvasčevebiomase) za rast na glukozu za kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 prikazan je na slici 5., za kvasac *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 na slici 6., a kvasac *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na slici 7. Rast na arabinozi grafički je prikazan redom na slikama 7., 8. i 9. za kvasce *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712. Grafički prikaz spomenutih promjena prilikom rasta na glicerolu prikazan je na slikama 10., 11. i 12., a na ksilozi na slikama 13., 14., te 15. redom za kvasce *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712. Parametri uspješnosti vođenja procesa, koncentracije biomase određivana gravimetrijski, te specifične brzine potrošnje suptrata i sinteze produkta prikazane su u tablici 7.



Slika 5. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 10 g/L glukoze (a), 15 g/L glukoze (b), 20 g/L glukoze (c)



Slika 6. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 u podlogama s 10 g/L glukoze (a), 15 g/L glukoze (b), 20 g/L glukoze (c)



Slika 7. Promjena optičke gustoće OD_{600} , koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L glukoze (a), 15 g/L glukoze (b), 20 g/L glukoze (c)

Na temelju rezultata prikazanih na slici 5., i u tablici 7. utvrđeno je da kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 ostvaruje najveću specifičnu brzinu rasta (0,10 1/h) prilikom rasta na podlozi s koncentracijom glukoze od 15 g/L (P2), iz čega proizlazi da je upravo ta koncentracija optimalna za rast kvasca. Direktnom konverzijom šećera u alkohol, uzgojem na podlozi P3 ostvaren je najveći prinos etanola koji iznosi 0,93 g/L, dok prinos glicerola, koji je tipičan nusprodukt fermentacije etanola u kvascu koji nastaje kao odgovor na potrebu za uravnoteženjem citoplazmatske oksidacije NADH iznosi 0,34 g/L (Pentjuss i sur., 2017.). Prilikom svakog uzgoja potrošena je sva glukoza u podlozi. Uzgojem na P2 te P3 podlozi ostvaren je manji prinos ostalih proizvoda metabolizma – octene kiseline, u odnosu na uzgoj u podlozi P1, budući da je zbog količine kvašćeve biomase proizvedene tijekom uzgoja, kvasac nakon potrošnje ukupne količine šećera u podlozi, trošio proizvode vlastitog metabolizma kao izvore ugljika.

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 na podlozi s glukozom prikazani su na slici 6., te u tablici 7. Sva glukoza u podlozi utrošena je prilikom uzgoja na svakoj od korištenih podloga – P1, P2 i P3. Najveća specifična brzina rasta iznosi 0,05 1/h te je ostvarena prilikom uzgoja na P2 podlozi. Prilikom uzgoja na podlozi P3 izmjerena je najveća vrijednost optičke gustoće pri 600 nm (OD_{600}), a iznosi 2,64. Zbog prisutne najveće količine glukoze u podlozi izraslo je najviše kvašćeve biomase. Usporedbom rasta na tri različite podloge, P1, P2, i P3, u podlozi P1 prisutna je limitacija rasta izvorom ugljika, dok je u podlozi P3 prisutna inhibicija rasta supstratom. Direktnom konverzijom šećera u alkohol, najveći prinos etanola ostvaren je prilikom uzgoja na podlozi P3 (1,01 g/L), kao i glicerola (0,36 g/L). Najveći koeficijent konverzije supstrata u proizvod iznosi 0,03 g/g za octenu kiselinu prilikom uzgoja na podlozi P2, gdje je zabilježen i najveći prinos octene kiseline.

Za kvasac *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 rezultati uzgoja na podlogama s različitim koncentracijama glukoze prikazani su na slici 7. te tablici 7. Kao i u prethodna dva slučaja, najveća specifična brzina rasta kvasaca (0,08 1/h) postignuta je prilikom uzgoja na podlozi P2. Najveći prinos kvašćeve biomase zabilježen je prilikom rasta na podlozi P3, gdje vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) iznosi 1,88.

Na temelju rezultata prikazanih na slikama 5., 6. i 7. te tablici 7. za sva tri odabrana soja kvasca *Kluyveromyces* uočeno je da nakon trećeg sata uzgoja ulaze u ekspanzionalnu fazu rasta u trajanju od tri do četiri sata nakon čega započinje stacionarna faza rasta kojom uzgoj završava. Zbog korištenog inokuluma uzgojenog na YPD podlozi, kvašćeva biomasa je ušla u ekspanzionalnu fazu rasta trošeći šećere prisutne u kvašćevom ekstraktu i peptonu, dok je

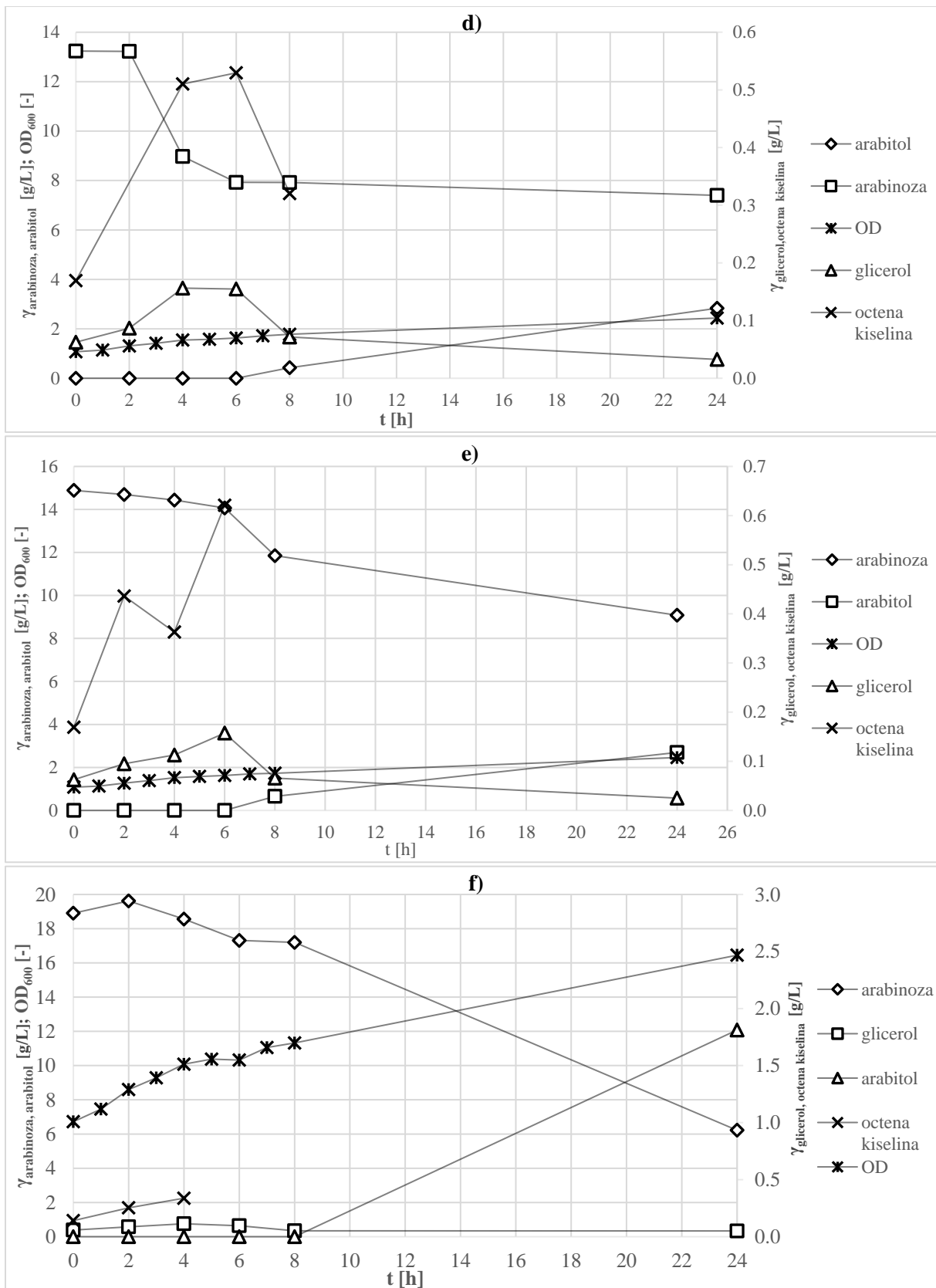
potrošnja glukoze započela intenzivnije u drugom satu uzgoja. Kvasac oznake NBRC 1777 ima najveću specifičnu brzinu rasta zbog čega izvore ugljika metabolički troši za vlastiti rast i razmnožavanje, te je prilikom rasta na podlozi P3 zabilježena najveća vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}), čija vrijednost iznosi 2,72. Kvasac oznake DKMU 3-1042 ima najveću sposobnost metaboliziranja izvora ugljika u visokovrijedne proizvode metabolizma. Kvasac oznake CBS 712 u usporedbi s druga dva odabrana soja kvasca *Kluyveromces* ne pokazuje bolje rezultate ni značajnija odstupanja.

Prema istraživanju Maderia i sur. (2018) soj *K. marxianus* NCYC 587 i *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D (kontrolni soj) ostvarili su prinos etanola od 0,39 g/g glukoze (sintetski medij) na 37 °C, dok su sojevi *K. marxianus* NCYC 3396 i UFV-3 postigli prinose od 0,38 i 0,40 g/g glukoze, redom, na 48 °C. U drugoj studiji, kvasci *K. marxianus* K213 i *S. cerevisiae* (kontrolni soj), oba uzgojena u mediju YPD, pokazali su slične prinose etanola (0,43 g/g) na 30 °C, dok je kvasac *S. cerevisiae* pokazao gubitak sposobnosti proizvodnje etanola pri povišenoj temperaturi od 45 °C (Yan i sur., 2015), dok su kvasci korišteni u ovom istraživanju i uzgajani prema spomenutim uvjetima, ostvarili značajno manje prinose etanola prikazane u tablici 7.

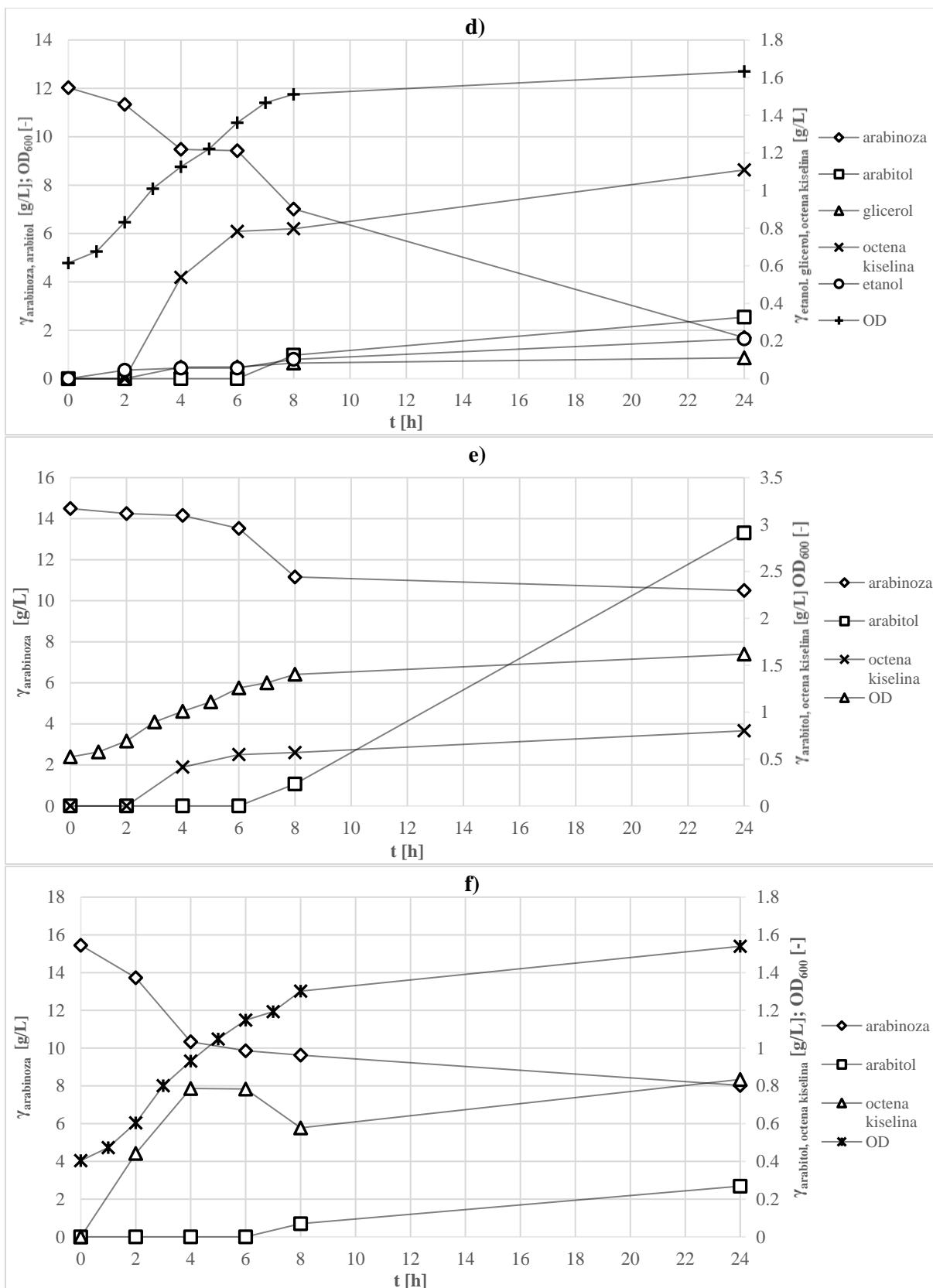
Tablica 7. Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata, sinteze produkta i rasta kvaščeve biomase tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L glukoze (P1), 15 g/L glukoze (P2), 20 g/L glukoze (P3)

Parametri:	<i>K. marxianus</i> NBRC 1777			<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042			<i>K. marxianus</i> CBS 712		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Y_S (glukoza) [g/L]	9,23	13,64	17,72	9,23	12,75	18,87	8,73	12,61	17,91
Y_P (EtOH) [g/L]	0,51	0,52	0,93	0,44	0,71	1,01	0,46	0,67	0,85
Y_P (glicerol) [g/L]	0,13	0,08	0,34	0,21	0,25	0,36	0,38	0,50	0,69
Y_P (o.k.) [g/L]	0,97	0,41	0,25	3,19	3,65	3,17	0,94	1,56	1,59
$Y_{P/S}$ (EtOH) [g/g]	0,06	0,04	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
$Y_{P/S}$ (glicerol) [g/g]	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04
$Y_{P/S}$ (o.k.) [g/g]	0,10	0,03	0,02	0,04	0,29	0,17	0,11	0,12	0,09
Pr_{EtOH} [g/L h]	0,02	0,02	0,04	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,04
$Pr_{glicerol}$ [g/L h]	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03
$Pr_{o.k.}$ [g/L h]	0,04	0,02	0,01	0,13	0,15	0,13	0,04	0,06	0,07
r_S [1/h]	0,18	0,19	0,22	0,19	0,21	0,23	0,20	0,27	0,27
r_{EtOH} [1/h]	0,35	0,36	0,38	0,35	0,37	0,37	0,38	0,38	0,38
$r_{glicerol}$ [1/h]	0,30	0,33	0,34	0,32	0,33	0,34	0,38	0,36	0,37
$r_{o.k.}$ [1/h]	0,33	0,34	0,38	0,43	0,44	0,43	0,38	0,40	0,40
μ [1/h]	0,08	0,09	0,08	0,03	0,06	0,03	0,07	0,08	0,08

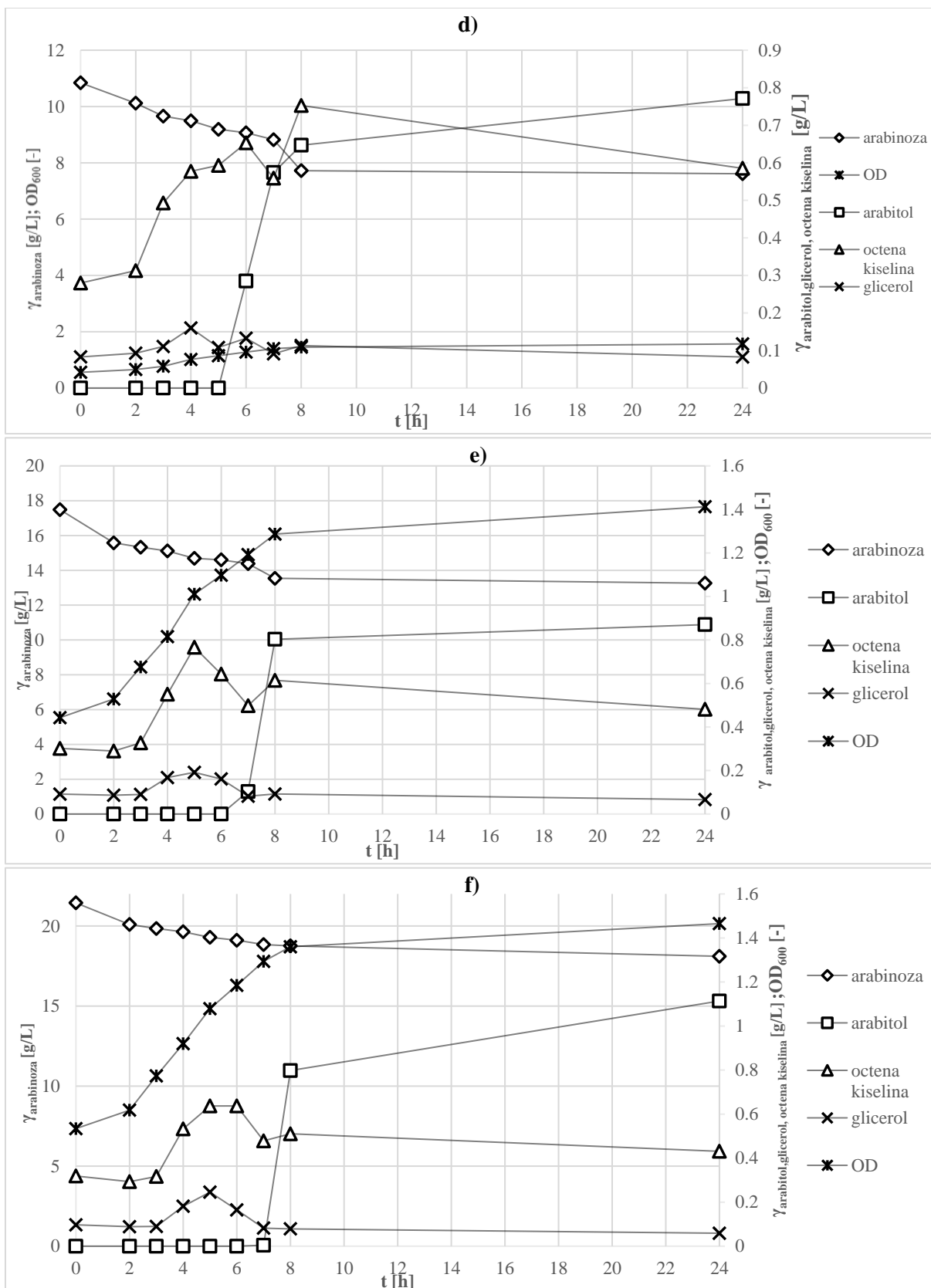
EtOH-etanol; o.k.-octena kiselina



Slika 8. Promjena optičke gustoće OD_{600} , koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlogama s 10 g/L arabinoze (d), 15 g/L arabinoze (e), 20 g/L arabinoze (f)



Slika 9. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 u podlogama s 10 g/L arabinoze (d), 15 g/L arabinoze (e), 20 g/L arabinoze (f)



Slika 10. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L arabinoze (d), 15 g/L arabinoze (e), 20 g/L arabinoze (f)

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlogama s različitim koncentracijama arabinoze prikazani su na slici 8. i u tablici 8. Prilikom rasta na podlozi P4, gdje je početna koncentracija arabinoze iznosila 10 g/L, utrošeno je 44,1 % arabinoze od početne koncentracije, rastom na podlozi P5 s početnom koncentracijom 15 g/L arabinoze u podlozi utrošeno je 39,2 % od početne koncentracije, dok je prilikom rasta na podlozi P6 s početnom koncentracijom arabinoze 20 g/L utrošeno 20,1 % od početne koncentracije arabinoze. Najveća specifična brzina rasta postignuta je prilikom rasta na podlozi P5, a iznosi 0,11 l/h. Proizvodnja arabitola započela je nakon 6h uzgoja na podlozi P4 i P5, dok je na podlozi P6 započela nakon 8h uzgoja. Najveći prinos arabitola postignut je prilikom uzgoja na podlozi P5 te iznosi 2,84 g/L, dok su vrijednosti optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) i zaokružene na dvije decimale jednake za sva tri provedena uzgoja na podlozi P4, P5 i P6 (2,46) iz čega proizlazi da različita koncentracija arabinoze u podlozi nije utjecala na rast kvašćeve biomase.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 9. i u tablici 8. utvrđeno je da je kvasac *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 prilikom rasta na podlozi P4 utrošio 41,7 % početne koncentracije arabinoze, na podlozi P5 26,7 %, dok je na podlozi P6 utrošio 36,2 % od početne koncentracije arabinoze. Direktnom konverzijom šećera u alkohol, proizvodnja arabitola započela je nakon šestog sata uzgoja u ekspanzionalnoj fazi rasta kvasca. Najveći prinos arabitola ostvaren je prilikom rasta na podlozi P6 i iznosi 2,69 g/L, 5,33 % više u usporedbi s prinosom ostvarenim prilikom uzgoja na podlozi P4 (2,53 g/L), odnosno 2,85 % više u usporedbi s prinosom ostvarenim prilikom uzgoja na podlozi P5 (2,61 g/L). Maksimalna vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) postignuta je na kraju uzgoja i iznosi 1,62 za sve tri podloge P4, P5 i P6.

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na podlogama s različitim koncentracijama arabinoze prikazani su na slici 10. i u tablici 8. Prilikom rasta na podlozi P4, utrošeno je 32,30 % arabinoze od početne koncentracije, rastom na podlozi P5 utrošeno je 28,18 % od početne koncentracije, dok je prilikom rasta na podlozi P6 utrošeno 16,5 % od početne koncentracije arabinoze. Proizvodnja arabitola u podlozi započela je u petom satu uzgoja na podlozi P4, u šestom satu uzgoja na podlozi P5 te u sedmom satu uzgoja u podlozi P6, a završila je sa završetkom uzgoja te je najveći prinos arabitola postignut prilikom uzgoja na podlozi P6 čija vrijednost iznosi 1,12 g/L. Maksimalna vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) postignuta je na kraju uzgoja i iznosi 1,42 za podlogu P4, 1,41 za podlogu P5, odnosno 1,47 za podlogu P6.

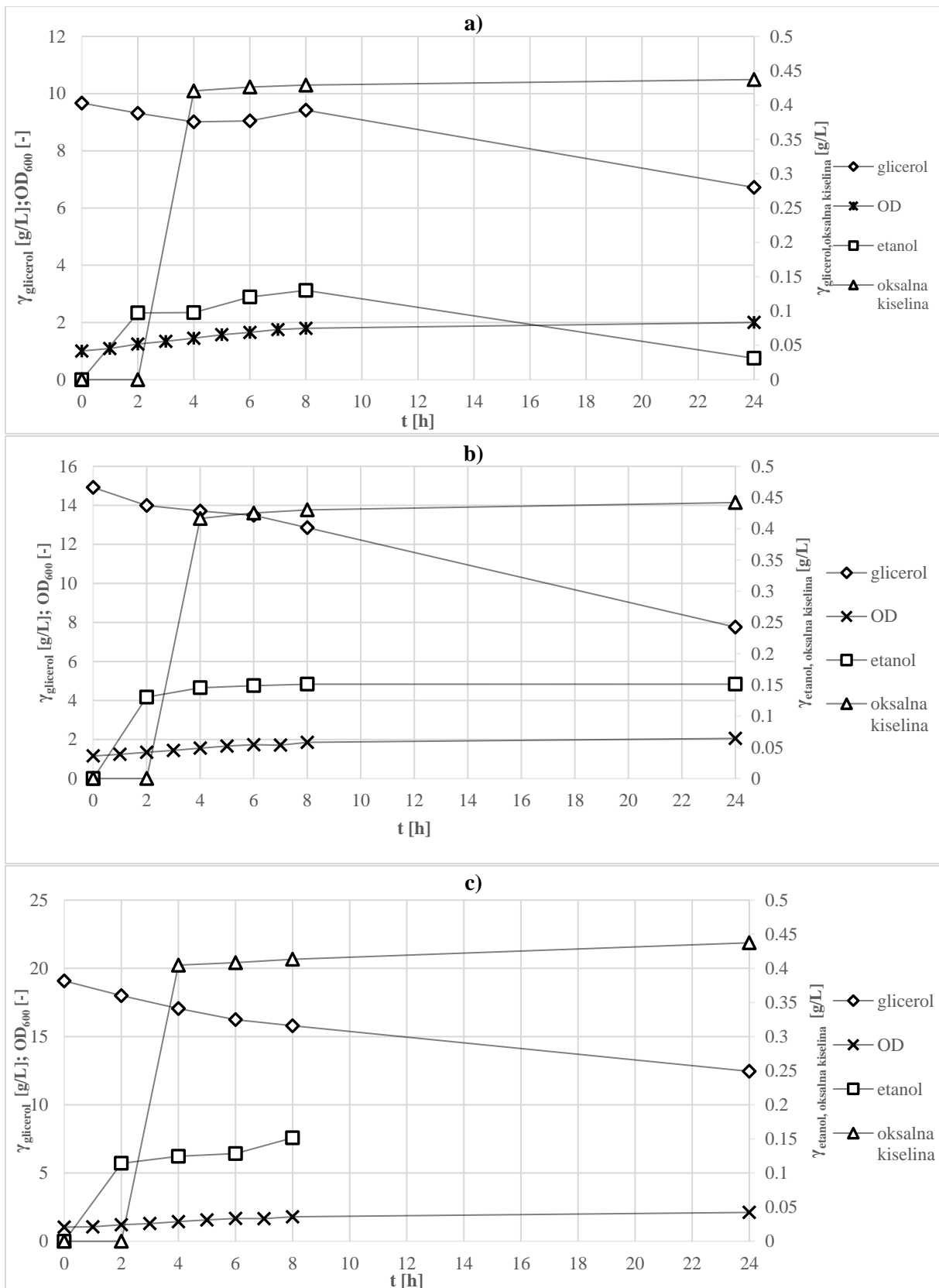
Usporedbom rezultata prikazanih na slikama 8., 9. i 10. te u tablici 8, sva tri odabrana soja kvasca *Kluyveromyces* prilikom rasta na arabinozi kao visokovrijedne proizvode metabolizma produciraju arabitol, glicerol i octenu kiselinu. U početku uzgoja kvasci su prinos kvašćeve biomase ostvarivali asimilirajući trehalozu i glukozu prisutne u kvašćevom ekstraktu i peptonu dodanom u YPD podlogu, dok su nakon postizanja koncentracije octene kiseline u podlozi veće od 1 g/L, započeli koristiti octenu kiselinu kao izvor ugljika iz čega proizlazi da im arabinoza nije preferirani supstrat kojeg troše što potvrđuje i zaostala arabinoza u podlozi nakon svakog provedenog uzgoja. Uočeno je da kvasac oznake NBRC 1777 najuspješnije metabolizira arabinozu budući da je postignuta maksimalna vrijednost koncentracije kvašćeve biomase (2,46 g/L) kao i najveći prinos arabitola (2,83 g/L), dok je kvasac oznake CBS 712 imao značajno manje specifične brzine rasta kvašćeve biomase u odnosu na druga dva odabrana soja kvasca *Kluyveromyces*, 89,67 % manju specifičnu brzinu rasta u odnosu na kvasca oznake NBRC 1777, odnosno 80,30 % manju u odnosu na kvasca oznake DMKU 3-1042. Različita koncentracija arabinoze u podlozi nije imala utjecaj na metabolizam kvasca što je vidljivo iz približno sličnih pokazatelja uspješnosti vođenja procesa za svaki kvasac pojedinačno.

Kordowska-Wiater i sur. (2008) ispitali su rast šest sojeva kvasca sposobnih za proizvodnju arabitola na podlozi s L-arabinozom. *Candida parapsilosis* pokazala se kao najučinkovitija trošeći od 10–14 g/L arabinoze u podlogama s maksimalno 20 g/L arabinoze, uzgajana u različitim uvjetima uzgoja, uz postignuti prinos arabitola od 0,51–0,78 g/g arabinoze. Za usporedbu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, kvasci roda *K. marxianus* trošili su približno slične koncentracije arabinoze u podlozi, dok su postignuti veći prinosi arabitola. Rezultati su prikazani u tablici 8.

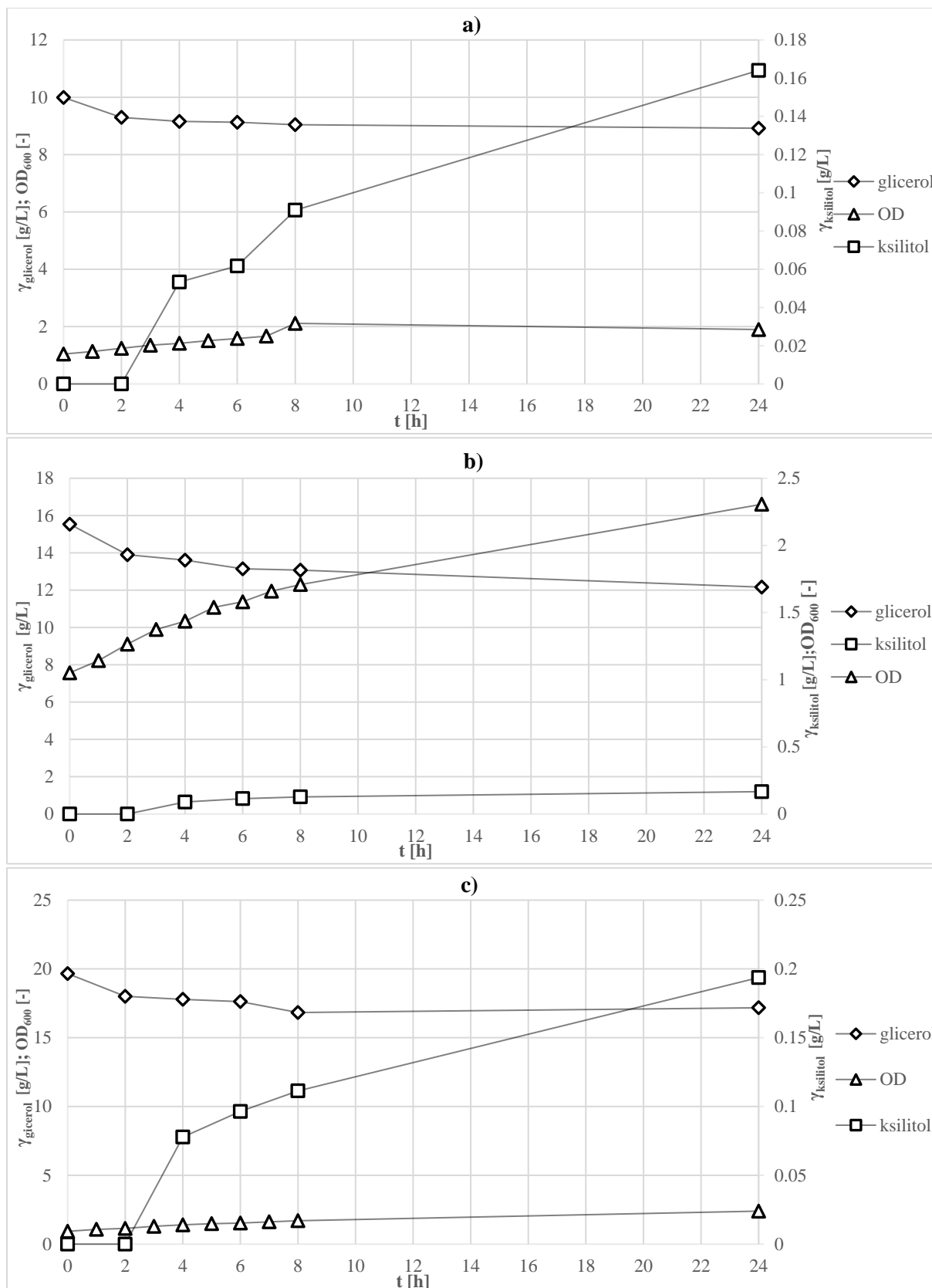
Tablica 8. Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata, sinteze produkta i rasta kvaščeve biomase tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L arabinoze (P4), 15 g/L arabinoze (P5), 20 g/L arabinoze (P6)

	<i>K. marxianus</i> NBRC 1777			<i>K. marxianus</i> DKMU 3-1042			<i>K. marxianus</i> CBS 712		
Parametri:	P4	P5	P6	P4	P5	P6	P4	P5	P6
Y _S (arabinoza) [g/L]	5,85	5,89	6,69	5,02	3,99	5,59	3,23	4,23	3,31
Y _P (arabitol) [g/L]	2,80	2,84	1,82	2,54	2,61	2,69	0,77	0,87	1,11
Y _P (glicerol) [g/L]	0,03	0,04	0,06	0,11	0,01	0,01	0,08	0,07	0,43
Y _P (o.k.) [g/L]	0,23	0,63	0,35	0,13	0,14	0,16	0,59	0,48	0,06
Y _{P/S} (arabitol) [g/g]	2,70	2,83	1,81	2,54	2,91	2,69	0,77	0,87	1,11
Y _{P/S} (glicerol.) [g/g]	0,16	0,16	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,19	0,18
Y _{P/S} (o.k.) [g/g]	0,53	0,62	0,34	1,11	0,80	0,83	0,75	0,77	0,64
Pr _{arabitol} [g/L h]	0,12	0,12	0,76	0,11	0,11	0,12	0,03	0,04	0,05
Pr _{glicerol} [g/L h]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,01	0,05
Pr _{o.k.} [g/L h]	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
r _S [1/h]	0,02	0,02	0,05	0,02	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01
r _{arabitol} [1/h]	0,43	0,43	0,41	0,43	0,43	0,43	0,37	0,38	0,39
r _{glicerol} [1/h]	0,31	0,31	0,29	0,29	0,29	0,30	0,31	0,32	0,33
r _{o.k.} [1/h]	0,36	0,37	0,34	0,39	0,38	0,38	0,37	0,37	0,37
μ [1/h]	0,05	0,10	0,06	0,04	0,05	0,05	0,01	0,01	0,01

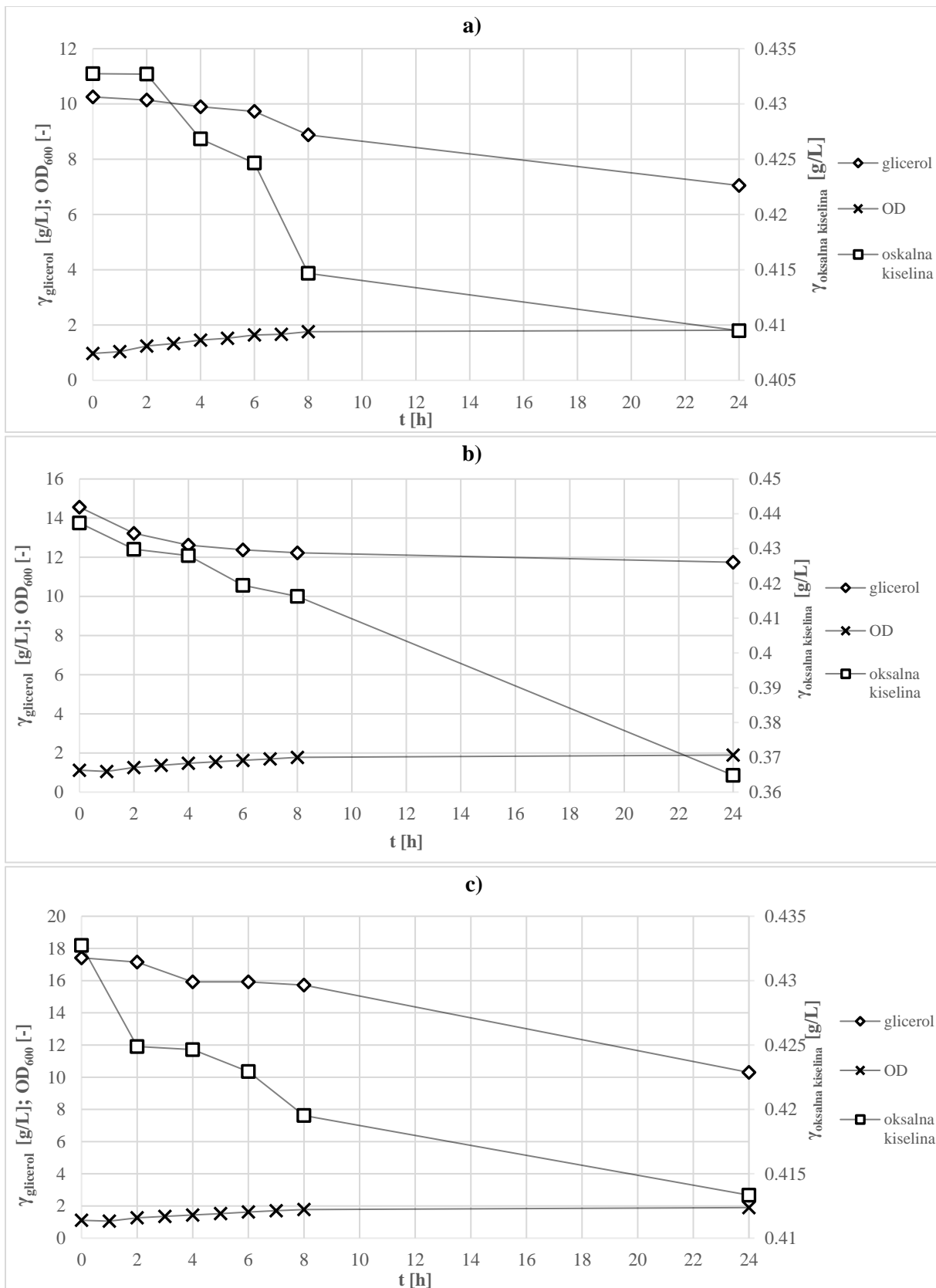
o.k.-octena kiselina



Slika 11. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianu* NBRC 1777 u podlogama s 10 g/L glicerola (a), 15 g/L glicerola (b), 20 g/L glicerola (c)



Slika 12. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianu* DMKU 3-1042 u podlogama s 10 g/L glicerola (a), 15 g/L glicerola (b), 20 g/L glicerola (c)



Slika 13. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianu* CBS 712 u podlogama s 10 g/L glicerola (a), 15 g/L glicerola (b), 20 g/L glicerola (c)

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlogama s različitim koncentracijama glicerola prikazani su na slici 11. i u tablici 9. Prilikom rasta na podlozi P7, gdje je početna koncentracija glicerola iznosila 10 g/L, utrošeno je 29,51 % glicerola od početne koncentracije, rastom na podlozi P8 s početnom koncentracijom 15 g/L glicerola u podlozi utrošeno je 47,6 % od početne koncentracije, dok je prilikom rasta na podlozi P9 s početnom koncentracijom glicerola 20 g/L utrošeno 33,14 % od početne koncentracije glicerola. Mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm (OD_{600}) uočeno je da kvaščeva biomasa ne raste značajno prilikom uzgoja na glicerolu te je maksimalna vrijednost izmjerena na kraju uzgoja na podlozi P7 iznosila 2,00, na podlozi P8 2,06 te na podlozi P9 2,11. Metabolizmom glicerola, kvasac oznake NBRC 1777 proizvodi etanol. Prilikom uzgoja na podlozi P9 uočena je najveća produktivnosti procesa (0,01 g/(Lh)) te je ujedno postignut i najveći prinos etanola (1,15 g/L). Budući da glicerol nije potrošen u potpunosti u podlozi nije djelovao kao limitirajući izvor supstrata.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 11. i u tablici 9. utvrđeno je da je kvasac *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 prilikom rasta na podlozi P7 utrošio 10,79 % početne koncentracije glicerola, na podlozi P8 22,49 %, dok je na podlozi P9 utrošio 12,41 % od početne koncentracije glicerola. Maksimalna vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) koja je direktan pokazatelj rasta kvaščeve biomase postignuta je na kraju uzgoja i iznosi 1,891 za podlogu P7, 2,31 za podlogu P8, odnosno 2,39 za podlogu P9. Jedinu proizvod metabolizma kvasca oznake DMKU 3-1042 na glicerolu je octena kiselina čija je proizvodnja započela nakon drugog sata uzgoja. Najveći prinos ksilitola ostvaren je prilikom uzgoja na podlozi P3 čija vrijednost iznosi 0,19 g/L.

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na podlogama s različitim koncentracijama glicerola prikazani su na slici 10. i u tablici 9. Prilikom rasta na podlozi P5, utrošeno je 32,02 % glicerola od početne koncentracije, rastom na podlozi P5 utrošeno je 28,18 % od početne koncentracije, dok je prilikom rasta na podlozi P6 utrošeno 16,5 % od početne koncentracije glicerola. Maksimalna vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) postignuta je na kraju uzgoja i iznosi 1,81 za podlogu P7, 1,89 za podlogu P8, odnosno 1,90 za podlogu P9. Sinteza proizvoda metabolizma glicerola započela je u 2 satu uzgoja. Kvasac oznake CBS 712 metabolizira glicerol u oksalnu kiselinu. Najveća produktivnost procesa zabilježena je prilikom rasta na podlozi P7.

Usporedbom rezultata prikazanih na slikama 11., 12. i 13. te u tablici 9., sva tri odabrana soja kvasca *Kluyveromyces* pokazuju sposobnost rasta na glicerolu kao glavnom izvoru ugljika.

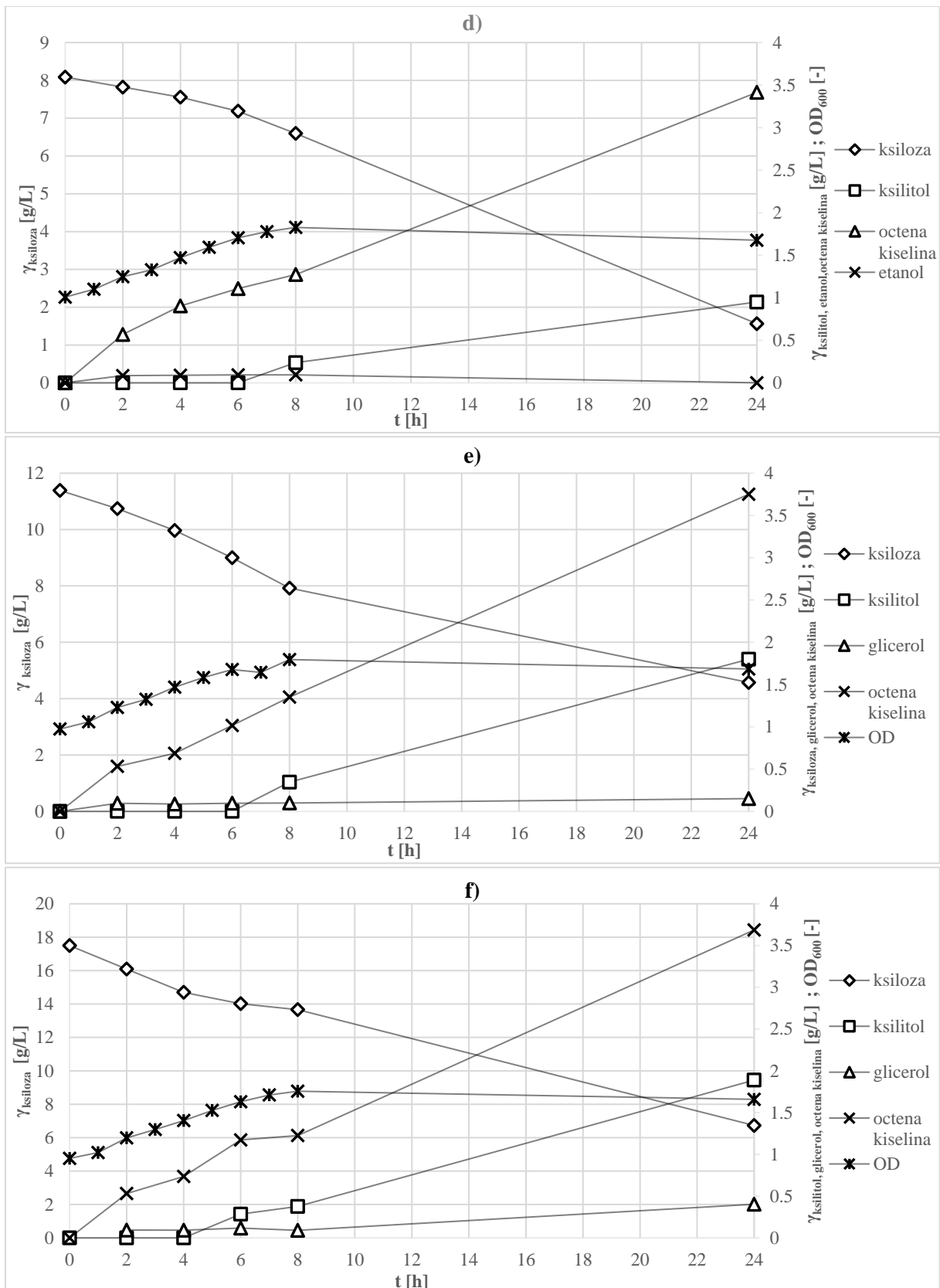
Početak rasta kvaščeve biomase rezultat je potrošnje glukoze i trehaloze prisutnih u YPD podlozi u kojoj je uzgajan inokulum, te je u drugom satu uzgoja započela potrošnja glicerola. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u usporedbi s druga dva odabrana soja kvasca *Kluyveromyces* ostvaruje najveću produktivnost procesa prilikom rasta na glicerolu te ostvaruje najveće prinose proizvoda metabolizma. Ksilitol je jedini proizvod metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 prilikom rasta na glicerolu, iz čega proizlazi da kvasac metabolizam glicerola usmjerava za dobivanje spojeva potrebnih za rast i razmnožavanje kvaščeve biomase što pokazuje i najveća postignuta vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) na podlozi P9 (2,40). Kvasac *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u odnosu na kvasac oznake DMKU 3-1042 ostvaruje veću produktivnost procesa, dok u usporedbi s kvascem oznake NBRC 1777 troši manje glicerola. Prilikom rasta na glicerolu na kraju svakog provedenog uzgoja zaostalo je glicerola u podlozi zbog čega nije djelovao kao limitirajući supstrat za rast u koncentraciji od 10 g/L. Najveća potrošnja glicerola (7,15 g/L) zabilježena je kod uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlozi P8 (15 g/L glicerola).

Zhang i sur. (2014) proveli su uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* na podlozi s ksiloza i glicerolom u različitim koncentracijama te postigli prinos ksilitola od 99,29 g/L s produktivnošću 4,14 g/(Lh) na podlozi s 99,55 g/L ksiloze i 37,43 g/L glicerola. Pri koncentraciji 151,91 g/L ksiloze te 56,12 g/L glicerola, proizvedeno je 149,60 g/L ksilitola s maksimalnom produktivnošću od 3,40 g/(Lh). Uzgojem pri 45 °C u podlozi sa 101,41 g/L ksiloze s 37,79 g/L glicerola proizvedeno je 101,30 g/L ksilitola s produktivnošću od 2,81 g/(Lh). Većina studija o biokonverziji sirovog glicerola koristi *Debaryomyces* sp. i *Candida quercitrusa* kao radne mikroorganizme. U seriji provedenih uzgoja, do 85 g/L arabitola dobiveno je sa spomenutim kvascima s prinosima od 0,41 – 0,63 g/g glicerol (Filippousi i sur., 2019; Yoshikawa i sur., 2014b; Koganti i sur., 2011). Produktivnosti ovih procesa bile su vrlo niske, u rasponu od 0,12 do 0,35 g/(Lh). Uzgojem na glicerolu u ovom istraživanju ostvareni su značajno manji prinosi ksilitola, dok je osim ksilitola, dobiven i etanol kao proizvod metabolizma. Prinosi proizvoda prikazani su u tablici 9.

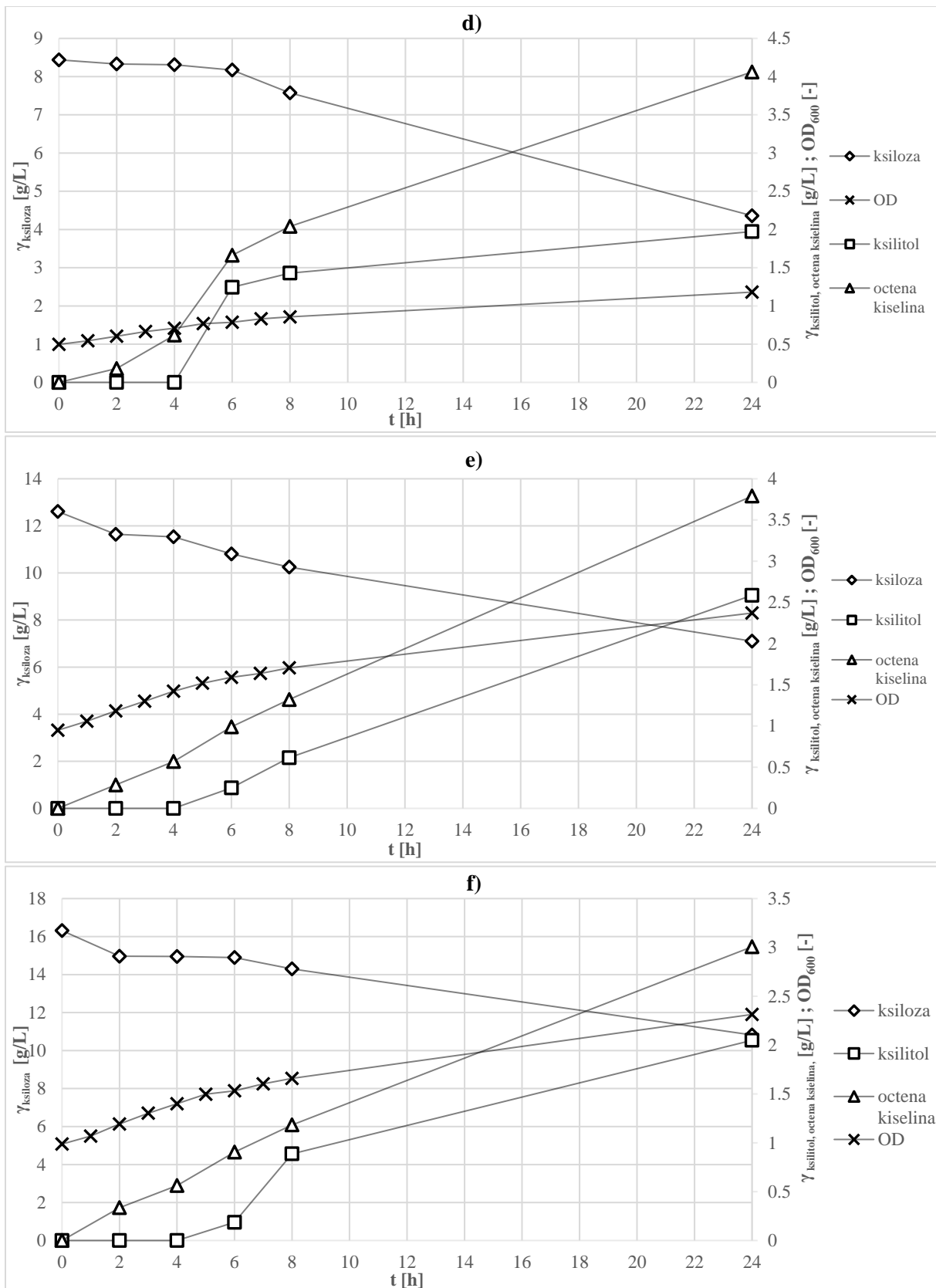
Tablica 9. Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkta tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L glicerola (P7), 15 g/L glicerola (P8), 20 g/L glicerola (P9)

Parametri:	<i>K. marxianus</i> NBRC 1777			<i>K. marxianus</i> DKMU 3-1042			<i>K. marxianus</i> CBS 712		
	P7	P8	P9	P7	P8	P9	P7	P8	P9
Y _S (glicerol) [g/L]	2,95	7,15	6,63	1,08	3,37	2,48	3,20	2,81	7,12
Y _P (EtOH) [g/L]	0,13	1,15	1,15	-	-	-	-	-	-
Y _P (ksilitol) [g/L]	-	-	-	0,16	0,17	0,19	-	-	-
Y _P (oks.k.) [g/L]	-	-	-	-	-	-	0,41	0,36	0,41
Y _{P/S} (EtOH) [g/g]	0,04	0,16	0,17	-	-	-	-	-	-
Y _{P/S} (ksilitol)[g/g]	-	-	-	0,15	0,05	0,08	-	-	-
Y _{P/S} (oks.k.) [g/g]	-	-	-	-	-	-	0,14	0,12	0,06
Pr _{EtOH} [g/L h]	0,01	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-
Pr _{oks.k} [g/(L h)]	-	-	-	-	-	-	0,02	0,01	0,01
r _S [1/h]	0,02	0,03	0,09	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
r _{EtOH} [1/h]	0,30	0,39	0,39	-	-	-	-	-	-
r _{ksilitol} [1/h]	-	-	-	0,31	0,31	0,32	-	-	-
r _{oks.k.} [1/h]	-	-	-	-	-	-	0,35	0,32	0,35

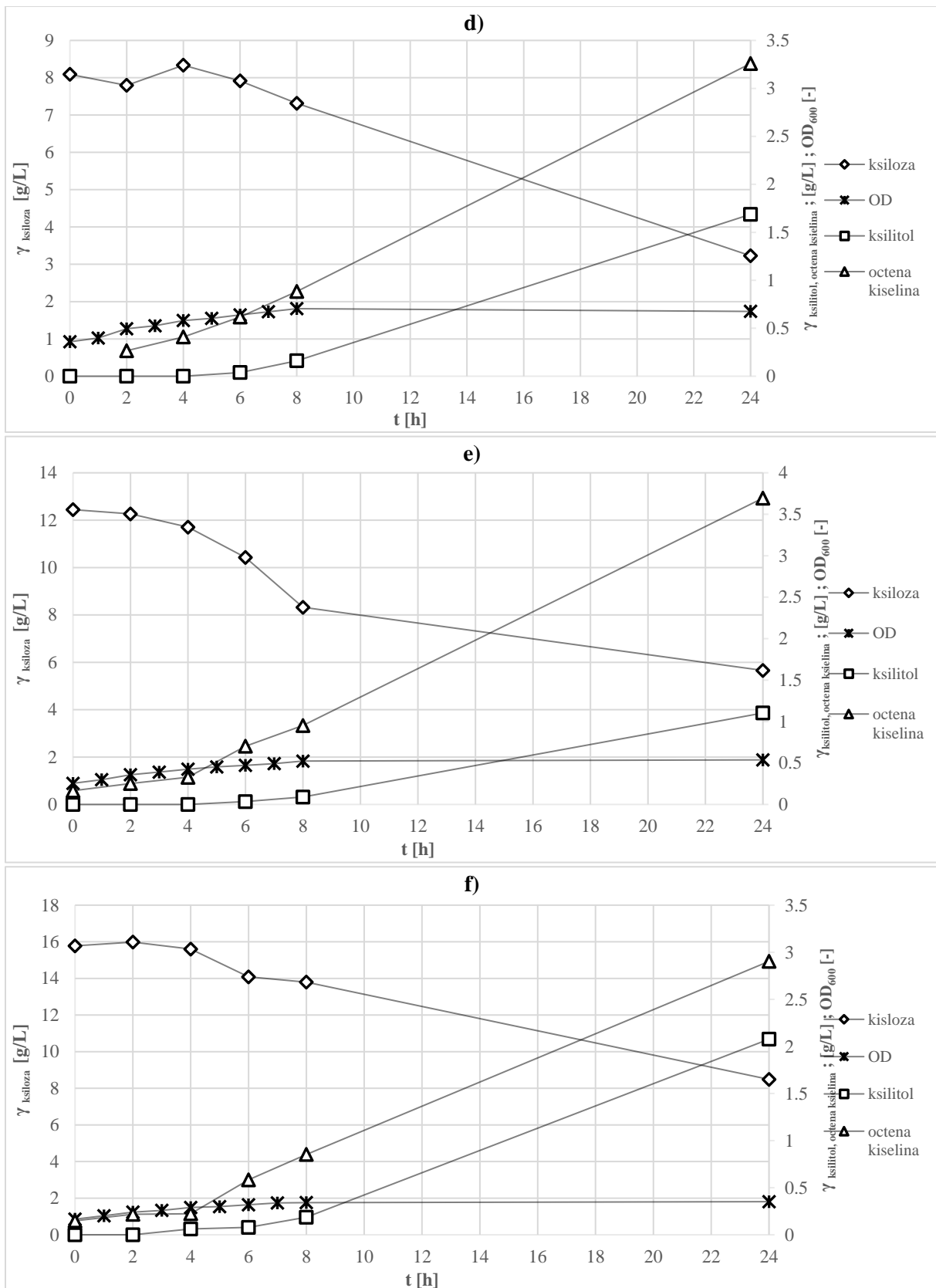
EtOH-etanol; oks.k.-oksalna kiselina



Slika 14. Promjena optičke gustoće OD_{600} , koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NCRB 1777 u podlogama s 10 g/L ksiloze (d), 15 g/L ksiloze (e), 20 g/L ksiloze (f)



Slika 15. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* DKMU 3-1042 u podlogama s 10 g/L kisloze (d), 15 g/L ksiloze (e), 20 g/L ksiloze (f)



Slika 16. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L ksioze (d), 15 g/L ksilitola (e), 20 g/L ksilitola (f)

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlogama s različitim koncentracijama ksiloze prikazani su na slici 14. i u tablici 10. Prilikom rasta na podlozi P10, gdje je početna koncentracija ksiloze iznosila 10 g/L, utrošeno je 65,26 % ksiloze od početne koncentracije, rastom na podlozi P11 s početnom koncentracijom 15 g/L ksiloze u podlozi utrošeno je 58,74 % od početne koncentracije, dok je prilikom rasta na podlozi P12 s početnom koncentracijom ksiloze 20 g/L utrošeno 53,82 % od početne koncentracije ksiloze. Mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm (OD_{600}) uočeno je da na rast kvaščeve biomase ne utječe različita koncentracija ksiloze u podlozi, budući da je na kraju svakog uzgoja zaostalo supstrata u podlozi, a izmjerena vrijednost OD za P10 podlogu iznosi 1,68, za P11 podlogu 1,68 te za P12 podlogu 1,66. Tijekom drugog sata uzgoja započela je konverzija šećera u alkohol, te je na kraju uzgoja najveći prinos ksilitola (2,89 g/L) postignut tijekom uzgoja na podlozi P12. Osim ksilitola, glicerol i octena kiselina su druga dva proizvoda metabolizma kvasca oznake NBRC 1777. Prilikom rasta na ksilozi, ostvaren je značajan prinos octene kiseline u koncentraciji od 3,41 g/L na podlozi P10, 3,75 g/L na podlozi P11 te 3,99 g/L na podlozi P12.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 15. i u tablici 10. utvrđeno je da je kvasac *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 prilikom rasta na podlozi P10 utrošio 40,7 % početne koncentracije ksiloze, na podlozi P11 45,9 %, dok je na podlozi P12 utrošio 33,66 % od početne koncentracije ksiloze. Direktnom konverzijom šećera u alkohol, proizvodnja ksilitola započela je u drugom satu uzgoja u eksponencijalnoj fazi rasta kvasca. Najveći prinos ksilitola ostvaren je prilikom rasta na podlozi P11 i iznosi 2,59 g/L, 46,99 % više u usporedbi s prinosom ostvarenim prilikom uzgoja na podlozi P10 (1,37 g/L), odnosno 20,71 % više u usporedbi s prinosom ostvarenim prilikom uzgoja na podlozi P12 (2,05 g/L). Na podlozi P10 ostvaren je najveći prinos octene kiseline (4,07 g/L), a najmanji ksilitola, iz čega proizlazi da je kvasac usmjerio metabolizam u proizvodnju octene kiseline. Maksimalna vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) postignuta je na kraju uzgoja i iznosi 2,36 za podlogu P10, 2,37 za podlogu P11, odnosno 2,31 za podlogu P12.

Rezultati uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 na podlogama s različitim koncentracijama ksiloze prikazani su na slici 16. i u tablici 10. Prilikom rasta na podlozi P10, utrošeno je 48,62 % ksiloze a od početne koncentracije, rastom na podlozi P11 utrošeno je 44,25 % od početne koncentracije, dok je prilikom rasta na podlozi P12 utrošeno 48,61 % od početne koncentracije glicerola. Maksimalna vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) postignuta je na kraju uzgoja i iznosi 1,74 za podlogu P10, 1,88 za podlogu P11, odnosno 1,81 za podlogu P12. Sinteza proizvoda metabolizma ksiloze započela je u 2 satu uzgoja. Kvasac

oznake CBS 712 metabolizira ksilozu u ksilitol i octenu kiselinu. Najveći prinos ksilitola ostvaren je prilikom rasta na podlozi P12 te iznosi 2,08 g/L, a octene kiseline prilikom rasta na podlozi P11 (3,69 g/L).

Usporedbom rezultata prikazanih na slikama 14., 15. i 16. te u tablici 10., sva tri odabrana soja kvasca *Kluyveromyces* pokazuju sposobnost rasta na ksilozi kao glavnom izvoru ugljika. Početak rasta kvašćeve biomase rezultat je potrošnje glukoze i trehaloze prisutnih u YPD podlozi u kojoj je uzgajan inokulum, te je u drugom satu uzgoja započela potrošnja ksiloze. Proizvodnja ksilitola započela je u drugom satu uzgoja, a osim ksilitola proizvodi metabolizma su octena kiselina za kvasce oznake NBRC 1777 te DMKU 3-1042, dok kvasac oznake CBS 712 proizvodi uz ksilitol i octenu kiselinu. Kvasac oznake DMKU 3-1042 izvore ugljika metabolički troši za vlastiti rast i razmnožavanje, što je uočeno iz izmjerenih vrijednosti optičke gustoće na kraju uzgoja, kao direktnog pokazatelja prinosa kvašćeve biomase, koje su za 28,78 % veće u odnosu na kvasac soja NBRC 1777, odnosno za 22,98 % veće u odnosu na kvasac soja CBS 712. Prilikom rasta na ksilozi na kraju svakog provedenog uzgoja zaostalo je neiskorištene ksiloze u podlozi zbog čega nije djelovala kao limitirajući supstrat za rast u koncentraciji od 10 g/L. Najveća potrošnja ksiloze (10,77 g/L) zabilježena je kod uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlozi P20 (20 g/L ksiloze).

Općenito, prinosi ksilitola iz lignoceluloznih supstrata kreću se između 0,40 i 0,95 g/g (Erian i Sauer, 2021). Junior i sur. (2019) su istražili 218 sojeva kvasca (*Cyberlindnera*, *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces*, *Spathaspora*, *Meyerozyma*, *Hansenia*) izoliranih iz tla i trulog drveta radi ispitivanja njihove sposobnosti rasta na ksilozi i konverziji ksiloze u ksilitol. Optimizacijom procesa, najveća koncentracija ksilitola od 109 g/L dobivena je uzgojem kvasca *Cyberlindnera tropicalis*, na hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe uz postignuti prinos od 2,81 g/(Lh) s koeficijentom konverzije od 0,86 g/g. Genetički konstruirani sojevi *C. tropicalis*, *K. marxianus* i *S. cerevisiae* ostvarili su proizvodnju ksilitola s prinosima od 91-102 g/L iz čistog tekućeg ksiloznog sirupa (Zhang i sur., 2021a). U ovom istraživanju postignuti su manji prinosi ksilitola u odnosu na spomenuta istraživanja. Maksimalni prinos ksilitola (2,89 g/L) postignut je uzgojem kvasca *K. marxianus* NBRC 1777 na podlozi s 20 g/L ksiloze.

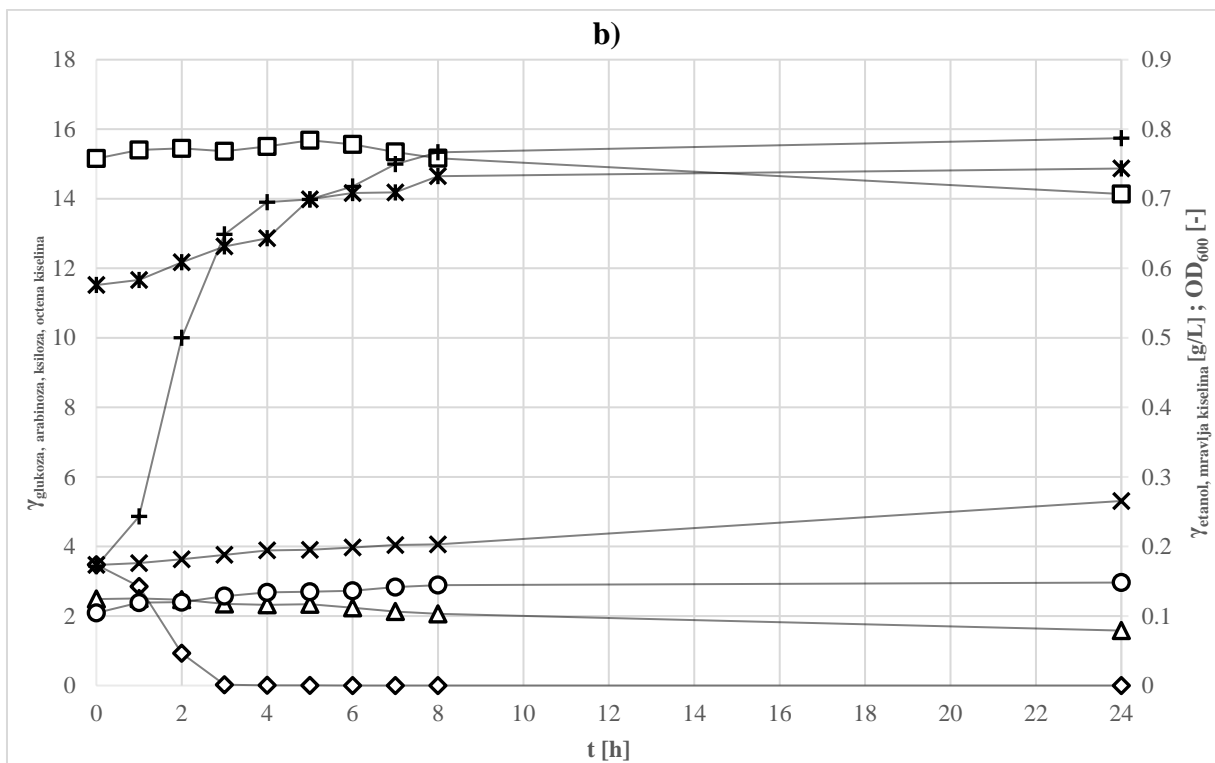
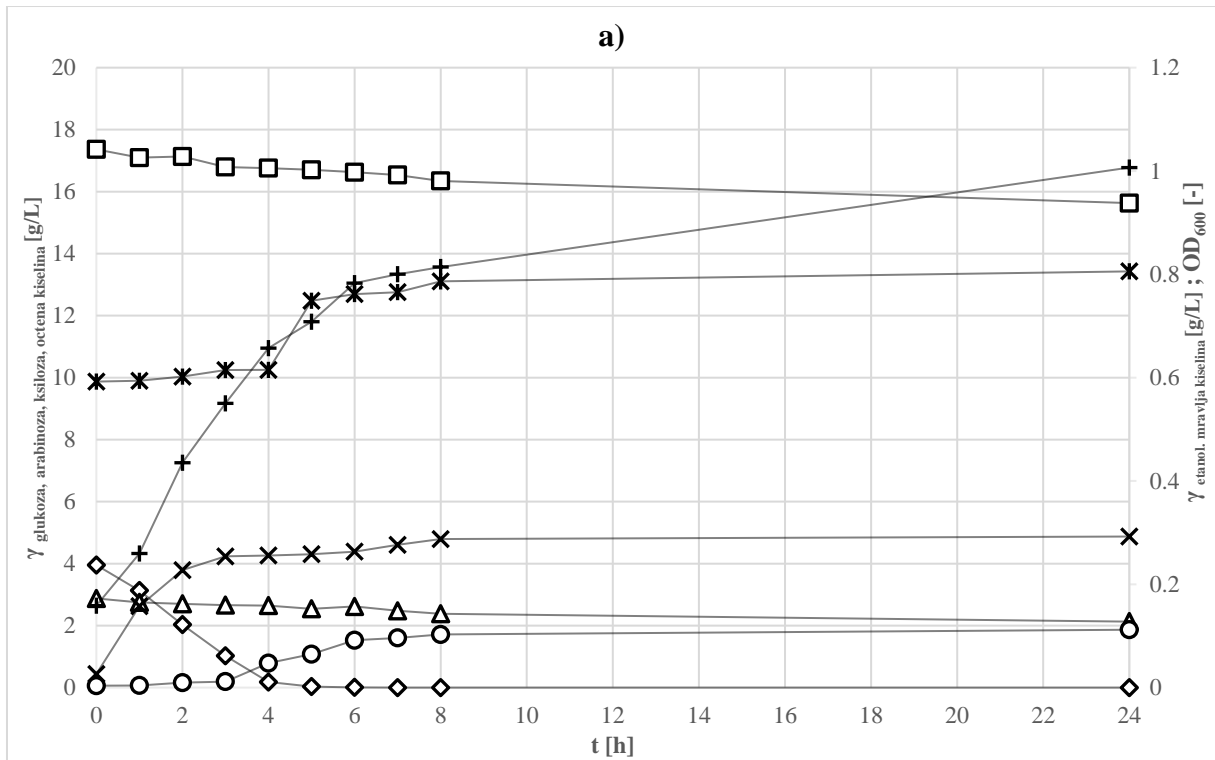
Tablica 10. Parametri uspješnosti, specifične brzine potrošnje supstrata i sinteze produkta tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 i *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 u podlogama s 10 g/L ksiloze (P10), 15 g/L ksiloze (P11), 20 g/L ksiloze (P12)

Parametri:	<i>K. marxianus</i> NBRC 1777			<i>K. marxianus</i> DKMU 3-1042			<i>K. marxianus</i> CBS 712		
	P10	P11	P12	P10	P11	P12	P10	P11	P12
Y _S (ksiloza) [g/L]	6,53	6,81	10,77	4,08	5,51	5,49	4,86	6,79	7,29
Y _P (ksilitol) [g/L]	1,35	1,79	2,89	1,37	2,59	2,05	1,68	1,10	2,08
Y _P (glicerol) [g/L]	0,32	0,52	0,40	-	-	-	-	-	-
Y _P (o.k.) [g/L]	3,41	3,75	3,99	4,06	3,79	3,01	3,26	3,69	2,90
Y _{P/S} (ksilitol) [g/g]	0,21	0,26	0,27	0,34	0,47	0,37	0,35	0,16	0,28
Y _{P/S} (glicerol)[g/g]	0,05	0,08	0,04	-	-	-	-	-	-
Y _{P/S} (o.k.) [g/g]	0,52	0,55	0,37	0,99	0,69	0,55	0,67	0,55	0,40
Pr _{ksilitol} [g/L h]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
Pr _{glicerol} [g/L h]	0,01	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-
Pr _{o.k.} [g/L h]	0,02	0,02	0,02	0,04	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02
r _S [1/h]	0,07	0,08	0,04	0,03	0,02	0,02	0,04	0,38	0,03
r _{ksilitol} [1/h]	0,38	0,41	0,41	0,41	0,42	0,41	0,41	0,39	0,41
r _{glicerol} [1/h]	0,42	0,31	0,35	-	-	-	-	-	-
r _{o.k.} [1/h]	0,43	0,44	0,44	0,44	0,44	0,42	0,43	0,44	0,43

o.k.-octena kiselina

4.2. ŠARŽNI UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 U BIOREKTORU S MIJEŠALOM NA PODLOZI KOJA SIMULIRA SASTAV KISELINSKOG HIDROLIZATA IZLUŽENIH REZANACA ŠEĆERNE REPE U AEROBNIM I ANAEROBNIM UVJETIMA

Sposobnost potrošnje supstrata i sinteze vrijednih proizvoda metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe ispitana je u šaržnim uzgojima u biorekatoru s miješalom u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Sastav podloge prikazan je u tablici 5., podloga za uzgoj pripravljena je na način opisan u Poglavlju 3.2.4.3., a uzgoj je vođen prema opisu u Poglavlju 3.2.5.2. Uzgoj je vođen 24 h i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima, a grafički prikaz promjene koncentracije supstrata, produkata te optičke gustoće podloge pri 600 nm (direktan pokazatelj rasta bakterijske biomase) prikazan je na slici 17. Pokazatelji uspješnosti vođenja procesa prikazani su u tablici 11.



Slika 17. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi koja simulira tekući hidrolizat izluženih rezanca šećerne repe u aerobnim uvjetima (a), te anaerobnim (b) (—◇—glukoza —□—arabinoza —△—ksiloz —×—octena kiselina —*—mravlja kiselina —○—etanol —+—OD)

Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, na podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe vođen je tijekom 24 h i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Tijekom uzgoja kvasac je imao na raspolaganju glukozu, ksilozu i arabinozu te octenu i mravljuu kiselinu kao izvore ugljika, koje počinje trošiti nakon što su utrošeni šećeri prisutni u YPD inokulumu, glukozu te trehalozu koja je sadržana u kvašćevom ekstraktu i peptonu.

U aerobnim uvjetima, glukozu je potpuno utrošena u četvrtom satu uzgoja, nakon čega je započela potrošnja ksiloze koje je utrošeno 82,19 % od početne vrijednosti 3 g/L. Tijekom cijelog vođenja uzgoja kvasac je trošio arabinozu u vrlo malim količinama te je ukupna potrošnja arabinoze iznosila 6,01 % od početne vrijednosti 15 g/L. Zbog spomenutog primijećen je diaoksičan rast na glukozu i arabinozi, odnosno ksilozi i arabinozi. U anaerobnim uvjetima glukozu je u potpunosti utrošena u trećem satu uzgoja, nakon čega je započela potrošnja ksiloze koje je utrošeno 69,74 % od početne koncentracije 3 g/L. Potrošnja arabinoze započela je u petom satu uzgoja i potrošeno je 8,57 % od početne koncentracije 15 g/L. Od proizvoda metabolizma sintetiziran je etanol i octena kiselina. Veći prinos etanola za 3,52 % postignut je tijekom uzgoja u anaerobnim uvjetima, a postignuta vrijednost iznosi 5,3076 g/L. Zabilježeni prinos octene kiseline u aerobnim uvjetima iznosi 0,81 g/L i veći je za 7,71 % u odnosu na anaerobne uvjete. Izmjerena vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) u aerobnim uvjetima iznosi 1,07, a u anaerobnim 0,79. Budući da je optička gustoća direktan pokazatelj rasta kvašćeve biomase u podlozi, proizlazi da u aerobnim uvjetima kvasac usmjerava metabolizam u rast kvašćeve biomase, dok u anaerobnim uvjetima ostvaruje veći prinos proizvoda metabolizma.

Feng i sur. (2021) proveli su ispitivanje rasta kvasca *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 na glukozu, ksilozi te lignoceluloznim susprtatima u različitim uvjetima aeracije. Iz istraživanja proizlazi da kvasac može kofermentirati glukozu i ksilozu kako bi istovremeno proizvodio etanol i ksilitol. Treba napomenuti da je ksiloza minimalno potrošena nakon što je glukozu iscrpljena u podlozi u uvjetima bez aeracije. Rezultati istraživanja pokazali su da je mikroaeracija korisna za ublažavanje stresa višestrukih inhibitora prisutnih u lignoceluloznim supstratima. Spomenute tvrdnje potvrdilo je i ovo istraživanje, budući da su kao proizvodi metabolizma dobiveni i etanol i ksilitol s prinosima prikazanim u tablici 11.

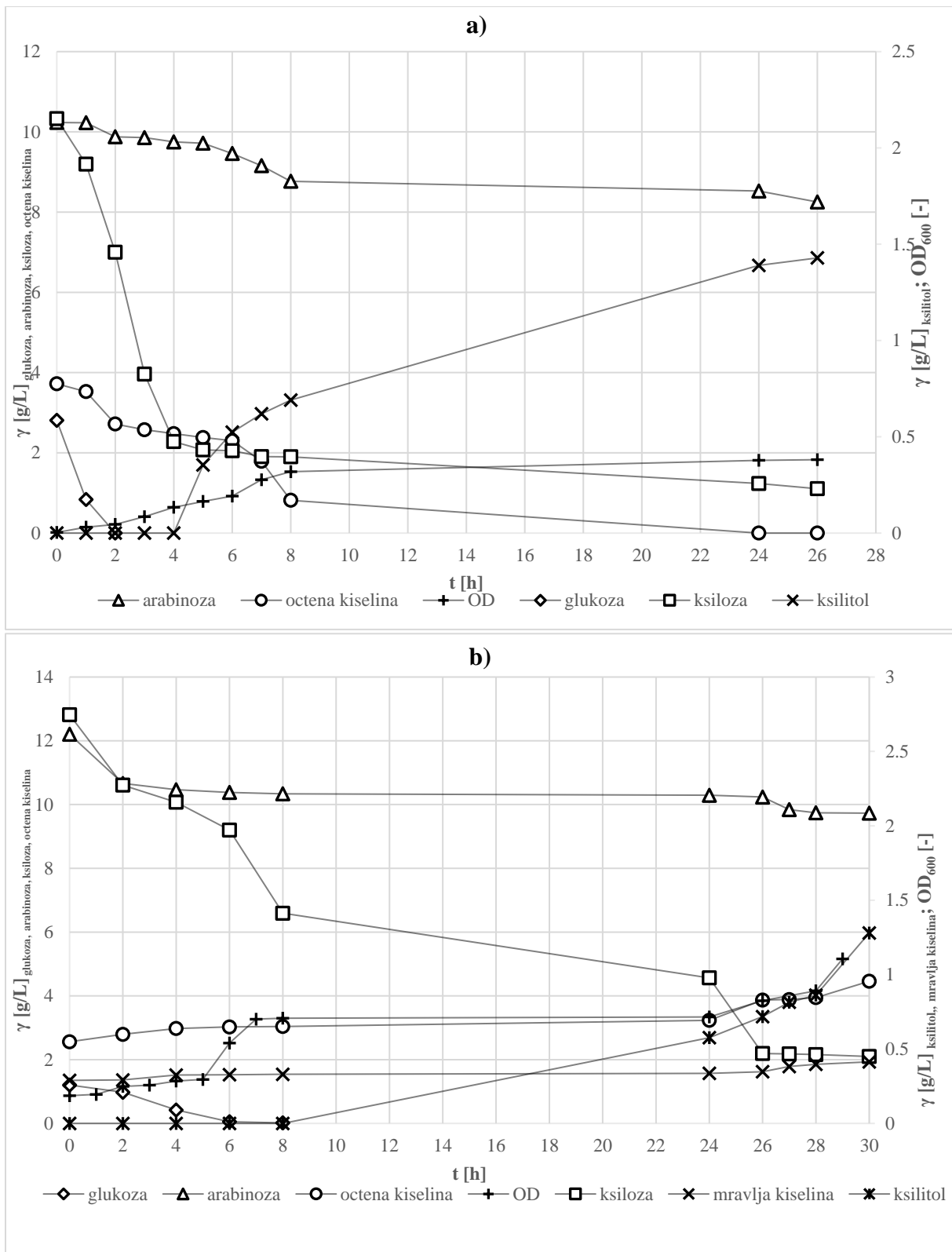
Tablica 11. Pokazatelji uspješnosti uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi koja simulira tekući hidrolizat izluženih rezanaca šećerne repe u aerobnim i anaerobnim uvjetima

Procesni parametri	Aerobni uzgoj	Anaerobni uzgoj
Y_S (glukoza) [g/L]	4,76	4,76
Y_S (ksiloza) [g/L]	2,47	2,09
Y_S (arabinoza) [g/L]	0,90	1,29
Y_P (EtOH) [g/L]	5,12	5,31
Y_P (o.k.) [g/L]	0,81	0,74
Pr_{EtOH} [g/L h]	0,21	0,22
$Pr_{o.k.}$ [g/L h]	0,03	0,03
r_S (glukoza) [1/h]	0,45	0,45
r_S (ksiloza) [1/h]	0,01	0,03
r_S (arabinoza) [1/h]	0,01	0,01
r_{EtOH} [1/h]	0,29	0,30
$r_{o.k.}$ [1/h]	0,45	0,45
$r_{m.k.}$ [1/h]	0,37	0,37

EtOH-etanol; o.k.-octena kiselina

4.3. ŠARŽNI UZGOJ KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 U BIOREKTORU S MIJEŠALOM NA KISELINSKOM HIDROLOZATU IZLUŽENIH REZANACA ŠEĆERNE REPE U AEROBNIM I ANAEROBNIM UVJETIMA

Sposobnost potrošnje supstrata i sinteze vrijednih proizvoda metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na kiselinskom hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe ispitana je u šaržnim uzgojima u bioreктору s miješalom u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Sastav tekućeg kiselinskog hidrolizata prikazan je u tablici 2., a način dobivanja istog opisan je u Poglavlju 3.2.2.. Podloga je pripremljena na način opisan u Poglavlju 3.2.4.5., a vođenje uzgoja opisano je u Poglavlju 3.2.5.4. U aerobnim uvjetima uzgoj je vođen 26 h, dok je u anaerobnim uvjetima trajao 30h, a grafički prikaz promjene koncentracije supstrata, produkata te optičke gustoće podloge pri 600 nm (direktan pokazatelj rasta kvaščevebiomase) prikazan je na slici 18. Pokazatelji uspješnosti vođenja procesa prikazani su u tablici 12.



Slika 18. Promjena optičke gustoće OD₆₀₀, koncentracije supstrata i koncentracije produkata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na tekućem hidrolizatu izluženih rezanca šećerne repe u aerobnim uvjetima (a), te anaerobnim uvjetima (b)

Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe vođen je tijekom 26 h u aerobnim i 30h u anaerobnim uvjetima. Tijekom uzgoja kvasac je imao na raspolaganju glukozu, ksilozu i arabinozu te octenu i mravlju kiselinu kao izvore ugljika.

U aerobnim uvjetima, glukoza je potpuno utrošena u drugom satu uzgoja, uz istovremenu potrošnju ksiloze koje je utrošeno 89,78 % od početne vrijednosti 2,75 g/L. Tijekom cijelog vođenja uzgoja kvasac je trošio arabinozu u vrlo malim količinama te je ukupna potrošnja arabinoze iznosila 27,02 % od početne vrijednosti 12,21 g/L. Zbog istovremene potrošnje glukoze, ksiloze i arabinoze primijećen je triauksični rast. U anaerobnim uvjetima glukoza je u potpunosti utrošena u šestom satu uzgoja, nakon čega je započela značajnija potrošnja ksiloze koje je utrošeno 93,93 % od početne koncentracije 2,76 g/L. Veća potrošnja arabinoze je bila tijekom prva dva sata uzgoja te je ukupno utrošeno 28,51 % od početne koncentracije 12,21 g/L. Od proizvoda metabolizma sintetiziran je ksilitol i octena kiselina. Prema detektiranim vrijednostima proizvoda metabolizma, ksilitol je proizvedeno 10,23 % više u aerobnim uvjetima s prinosom od 1,43 g/L. U anaerobnim uvjetima zabilježen je veći prinos octene kiseline te iznosi 4,46 g/L. Izmjerena vrijednost optičke gustoće mjerene pri 600 nm (OD_{600}) u aerobnim uvjetima iznosi 1,83, a u anaerobnim 0,61. Budući da je optička gustoća direktan pokazatelj rasta kvaščeve biomase u podlozi, proizlazi da u aerobnim uvjetima kvasac usmjerava metabolizam u rast kvaščeve biomase, dok u anaerobnim uvjetima ostvaruje veći prinos proizvoda metabolizma.

Liu i sur. (2023) proveli su uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* na lignoceluloznoj sirovini, tekućem kiselinskom hidrolizatu riže te je postignuta koncentracija etanola iznosila $(52,68 \pm 14,45)$ mg/L, a koncentracija octene kiseline iznosila je $(32,67 \pm 1,57)$ mg/L, dok je u ovom istraživanju postignuta veća koncentracija octene kiseline s rezultatima prikazanim u tablici 12.

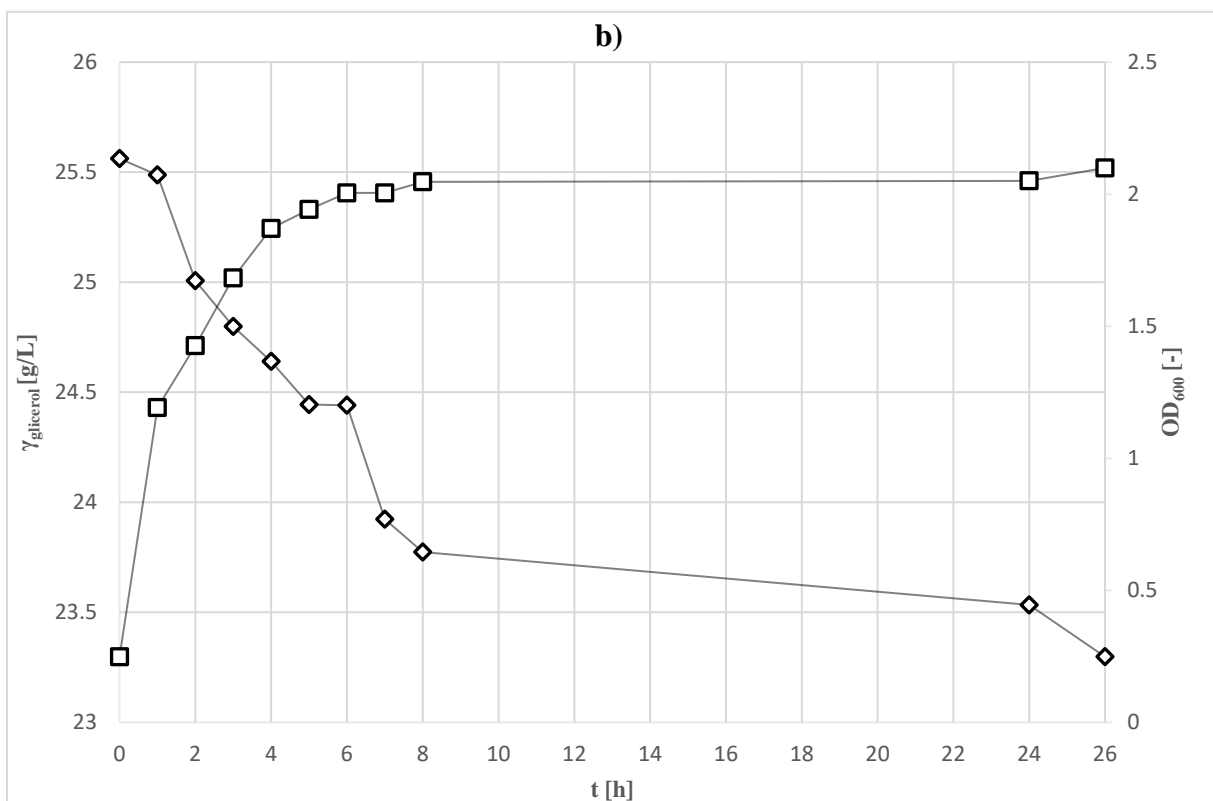
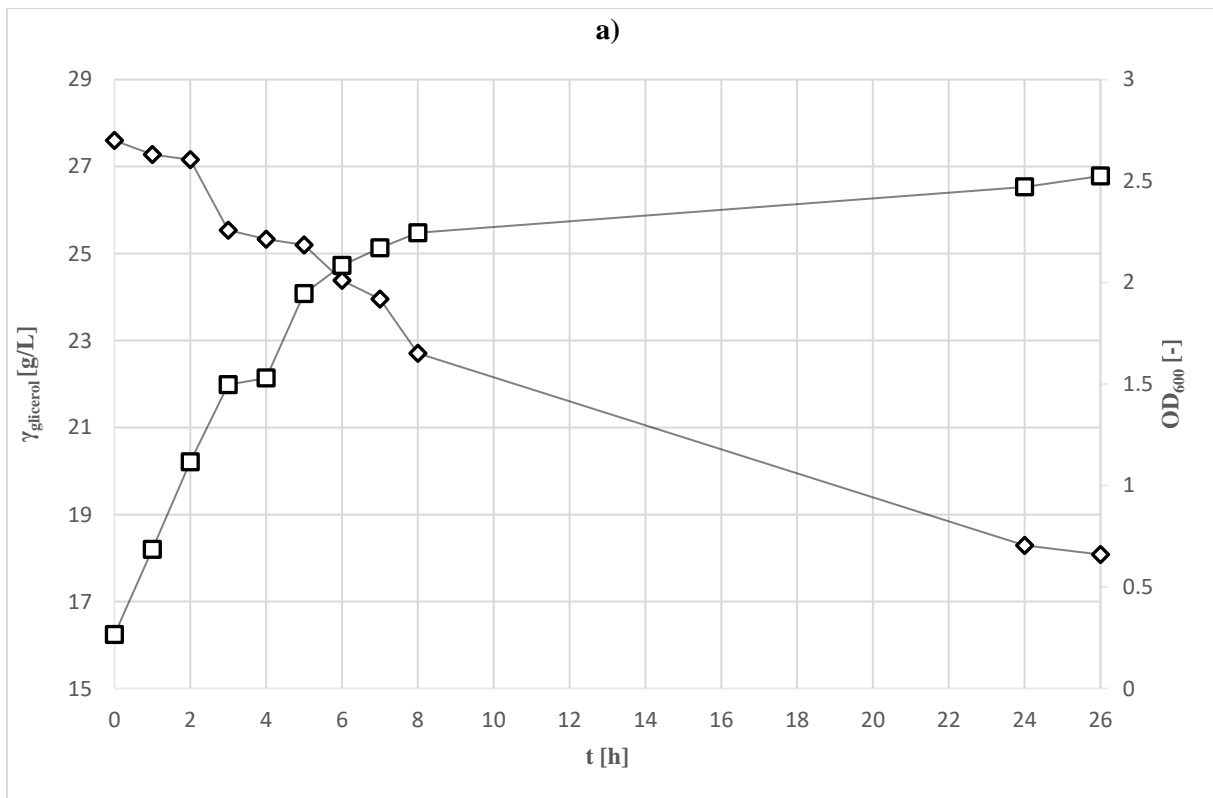
Tablica 12. Pokazatelji uspješnosti uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na tekućem hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe u aerobnim i anaerobnim uvjetima

Procesni parametri	Aerobni uzgoj	Anaerobni uzgoj
Y_S (glukoza) [g/L]	0,63	1,44
Y_S (ksiloza) [g/L]	2,05	2,58
Y_S (arabinoza) [g/L]	3,30	3,48
Y_P (ksilitol) [g/L]	1,43	1,28
Y_P (o.k.) [g/L]	0,82	4,46
$Pr_{ksilitol}$ [g/(Lh)]	0,06	0,05
$Pr_{o.k.}$ [g/(Lh)]	0,03	0,19
r_S (glukoza) [1/h]	0,36	0,19
r_S (ksiloza) [1/h]	0,10	0,12
r_S (arabinoza) [1/h]	0,01	0,02
$r_{ksilitol}$ [1/h]	0,40	0,39
$r_{o.k.}$ [1/h]	0,36	0,45

o.k.-octena kiselina

4.4. ŠARŽNI UZGOJA KVASCA *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777, U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM, NA KEMIJSKI DEFINIRANOJ PODLOZI S GLICEROLOM KAO GLAVNIM IZVOROM UGLJIKA U AEROBNIM I ANAEROBNIM UVJETIMA.

Sposobnost potrošnje supstrata i sinteze vrijednih proizvoda metabolizma kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 na podlozi s 25 g/L glicerola, kao jedinog izvora ugljika, ispitana je u bioreaktoru s miješalom u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Sastav podloge prikazan je u tablici 6., podloga je pripremljena na način opisan u Poglavlju 3.2.4.4., a vođenje uzgoja opisano je u Poglavlju 3.2.5.3. Uzgoj je vođen 26h šaržno. Na slici 19. grafički je prikazana potrošnja glicerola te promjena optičke gustoće podloga mjerene pri 600 nm (OD_{600}).



Slika 19. Promjena optička gustoća OD_{600} i koncentracije supstrata tijekom uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u podlozi s glicerolom u aerobnim (a) i anaerobnim uvjetima (b) (\blacklozenge glycerol \square OD)

Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, u podlozi s glicerolom kao jedinim izvorom ugljika vođen je tijekom 26 h u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Uzgojem u aerobnim uvjetima postignut je veći prinos kvašćeve biomase što uočavamo iz izmjerene vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm (OD_{600}) u vrijednosti 2,52 na kraju uzgoja u odnosu na uzgoj u anaerobnim uvjetima gdje je na kraju uzgoja izmjerena vrijednost optičke gustoće podloge iznosila 2,10. U anaerobnim uvjetima kvasac je potrošio 7,93 % glicerola od početne koncentracije (2,01 g/L), dok je u aerobnim uvjetima ostvarena veća potrošnja glicerola, 31,49 % od početne vrijednosti (8,31 g/L). Na temelju dobivenih rezultata proizlazi da kvasac soja NBRC 1777 u aerobnim uvjetima ostvaruje veću potrošnju glicerola za 74,75 % u usporedbi s potrošnjom u anaerobnim uvjetima. Prema analizi dobivenih kromatograma pretpostavlja se da kvasca soja NBRC 1777 može proizvesti određene proizvode metabolizma koji nisu uspješno identificirani budući da postignute koncentracije istih nisu signifikantne, zbog čega je potrebno provesti daljnja istraživanja uz optimizaciju procesa. Način na koji bi se moglo nastaviti istraživanja za postizanje većih prinosa proizvoda metabolizma može se provesti uzgojem u uvjetima osmotskog stresa kada je povećan unos, ekspresija i efluks glicerola (Duskova i sur., 2014).

U studiji koju su proveli Zhang i sur. (2020), u kvascu *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777 identificiran je gen *KmSTL1* koji kodira za protein prijenosnik glicerola, te gen *KmSTL1* koji je bitan za osmotoleranciju *K. marxianus*. Pod hiperosmotskim stresom, *K. marxianus* povećava sintezu glicerola povećanjem ekspresije *KmGPD1* gena, te povećava prijenos glicerola iz izvanstaničnog medija u unutrašnjost stanice, dok povećanjem ekspresije *KmSTL1* gena se smanjuje refluks glicerola. Ovi putovi bi trebali biti korisni za konstrukciju genetički modificiranih stanica *K. marxianus* sa sposobnošću proizvodnje visokovrijednih proizvoda metabolizma asimilacijom sirovog glicerola koji se koristi kao supstrat ili pod hiperosmotskim stresom. Budući da se podloga s glicerolom koju sam koristila u ovom istraživanju nije pokazala dobrim izborom za uzgoj kvasca *K. marxianus*, spomenuto istraživanje može se koristiti kao smjernica za nastavak ovog istraživanja.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata tijekom provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Prilikom ispitivanja rasta na glukozi kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 ostvaruje najveću specifičnu brzinu rasta 0,10 1/h, dok kvasac *K. marxianus* DKMU 3-1042 ostvaruje najveće prinose visokovrijednih proizvoda metabolizma (1,01 g/L etanola). Tijekom rasta na arabinozi kvasac *K. marxianus* NBRC 1777 najuspješnije troši i metabolizira arabinozu za rast i razvoj kvaščeve biomase s postignutim prinosom od 2,46 g/L, te s postignutim najvećim prinosom arabitola u koncentraciji od 2,84 g/L. Tijekom uzgoja na glicerolu zabilježen je najmanji prirast kvaščeve biomase odabranih sojeva kvasca *Kluyveromyces*. Kvasac *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 jedini proizvodi etanol prilikom rasta na glicerolu s maksimalnim postignutim prinosom od 1,15 g/L. Najveća potrošnja ksiloze zabilježena je kod uzgoja kvasca soja NBRC 1777 uz ostvaren najveći prinos ksilitola (2,89 g/L).
2. Rezultati šaržnog uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, na podlozi koja simulira sastav kiselinskog hidrolizata izluženih rezanaca šećerne repe pokazuju da je veći prinos etanola postignut tijekom uzgoja u anaerobnim uvjetima, a postignuta vrijednost iznosi 5,31 g/L, dok je veći prinos kvaščeve biomase zabilježen prilikom uzgoja u aerobnim uvjetima.
3. Rezultati šaržnog uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, na kiselinskom hidrolizatu izluženih rezanaca šećerne repe proveden je u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Od proizvoda metabolizma sintetiziran je ksilitol i octena kiselina. Također je uočeno je da u anaerobnim uvjetima kvasac metabolizam usmjerava u prinos proizvoda s postignutom koncentracijom octene kiseline od 4,46 g/L na kraju uzgoja te ksilitola u koncentraciji od 1,28 g/L.
4. Šaržni uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777 u bioreaktoru s miješalom, na glicerolu kao jedinom izvoru ugljika, proveden je u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Uzgojem u aerobnim uvjetima kvasac je uspješnije trošio glicerol te je ostvaren veći prinos kvaščeve biomase. Prinosi proizvoda metabolizma nisu prikazani, budući da postignute koncentracije nisu signifikantne zbog čega treba provoditi daljnja istraživanja.

6. LITERATURA

Ali N, Zhang Q, Liu ZY, Li FL, Lu M, Fang XC (2020) Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 455–473. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10158-w>.

Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci* **18**, 768–778. doi: 10.1002/elsc.201800039.

Anonymous (2014) Structure od lignocellulose – Scitable by nature education. <https://www.nature.com/scitable/content/structure-of-lignocellulose-14464273/>. Pristupljeno 14. travnja 2023.

Awuchi CG, (2017) Sugar Alcohols: Chemistry, Production, Health Concerns and Nutritional Importance of Mannitol, Sorbitol, Xylitol, and Erythritol *In. J Adv Acad Res* **3(2)**, 31-66. https://www.researchgate.net/publication/315784468_Sugar_Alcohols_Chemistry_Production_Health_Concerns_and_Nutritional_Importance_of_Mannitol_Sorbitol_Xylitol_and_Erythritol

Baptista M, Dominguse L (2022) *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnol Adv* **60**, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108027>

Baruah J, Nath BK, Sharma R, Kumar S, Deka RC, Baruah DC, Kalita E (2018) Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Front Energy Res* **6**, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>

Berlowska J, Cieciora-Włoch W, Kalinowska H, Kregiel D, Borowski S, Pawlikowska E, i sur. (2018) Enzymatic conversion of sugar beet pulp: A comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation for lactic acid production. *Food Technol Biotechnol* **56(2)**, 188. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5390>

Berlowska J, Pielech-Przybylska K, Balcerek M, Cieciora W, Borowski S, i sur. (2017) Integrated bioethanol fermentation/anaerobic digestion for valorization of sugar beet pulp. *Energies* **10(9)**, 1255. <https://doi.org/10.3390/en10091255>

- Bilal M, Xu S, Iqbal HMN, Cheng H (2020) *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Crit Rev Food Sci Nutr* **61**(4), 535–552. <https://doi:10.1080/10408398.2020.1739000>
- 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 Biotechnol* **56**, 289–311. <https://doi:10.17113/ftb.56.03.18.5546>.
- Castillo-Plata AK, Sigala JC, Lappe-Oliveras P, Le Borgne S (2022) KCl/KOH supplementation improves acetic acid tolerance and ethanol production in a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from henequen (*Agave fourcroydes*) *Rev Me. Ing Quim* **21**(1), 1-18. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2567>
- Chen H (2014) *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer, Dordrecht, str. 1-185.
- Chi Z, Chi Z, Zhang T, Liu G, Li J, Wang X (2009) Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol Adv* **27**, 236–255. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.002
- Choudhary J, Singh S, Nain L (2016) Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology* **21**, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>
- Converti Atillio, Parego P, Dominguez JM (1999) Xylitol Production from Hardwood Hemicellulose Hydrosylates *App Biochem and Biotechn* **82**, 141–151. doi:10.1385/abab:82:2:14
- Cunha JT, Romaní A, Costa CE, S´ a-Correia I, Domingues L (2019) Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulosebased process conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 159–175. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9478-3>
- Da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Ad* **27**(1), 30-9. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.006. Epub 2008 Aug 16. PMID: 18775486.

Da Silveira FA, Diniz RHS, Sampaio GMS, Brandão RL, da Silveira WB, Castro IM (2018) Sugar transport systems in *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. *Antonie van Leeuwenhoek* **112**, 211–223. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1143-4>

Dash RP, Srinivas NR, Babu RJ, (2019) Use of sorbitol as pharmaceutical excipient in the present day formulations – issues and challenges for drug absorption and bioavailability. *Drug Dev Ind Pharm* **45(9)**, 1421–1429. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1640722>.

Del Amo-Mateos E, López-Linares JC, García-Cubero MT, Lucas S, Coca M (2022) Green biorefinery for sugar beet pulp valorisation: Microwave hydrothermal processing for pectooligosaccharides recovery and biobutanol production. *Ind Crops Prod* **184**, 115060. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115060>

Du C, Li Y, Zhao X, Pei X, Yuan W, Bai F, Jiang Y (2019) The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 2845–2855. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09625-1>

Duskova M, Ferreira C, Lucas C, Sychrova H (2015) Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Mol Microbiol* **97(3)** 541–559. doi: 10.1111/mmi.13048

Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M (2009) The Effect of Glycerol as Sole and Secondary Substrate on Growth and Fatty Acid Composition of *Rhodotorula glutinis* *Bioresource Tech*, **100(1)**, 356-361. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.030

Erian AM, Sauer M (2022) Utilizing yeasts for the conversion of renewable feedstocks to sugar alcohols-a review. *Bioresour Technol* **346**, 126296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126296>

Feng H, Li Y, Du C, Yuan W (2021) Effect of microaeration on cell growth and glucose/xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* from the imitate lignocellulosic-derived hydrolysate. *Process Biochem* **101**, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.025>

Filippousi R, Antoniou D, Tryfinopoulou P, Nisiotou AA, Nychas G-J, Koutinas A. A, Papanikolaou S (2019) Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *J Appl Microbiol* **127(4)**, 1080–1100. <https://doi.org/10.1111/jam.14373>.

- Hassan SS, Williams GA, Jaiswal AK, (2019) Lignocellulosic biorefineries in Europe: current state and prospects. *Trends Biotechnol* **37**, 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.002>.
- Hendriks ATWM, Zeeman G, (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* **100**, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hensing M, Vrouwenvelder H, Hellinga C, Baartmans R, Van Dijken H, (1994) Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 516–521 <https://doi.org/10.1007/BF00173914>
- Hillman ET, Li M, Hooker CA, Englaender JA, Wheeldon I, Solomon KV (2021) Hydrolysis of lignocellulose by anaerobic fungi produces free sugars and organic acids for two-stage fine chemical production with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Progr* <https://doi.org/10.1002/btpr.3172>
- Izawa S, Ikeda K, Maeta K, Inoue Y (2004) Deficiency in the glycerol channel Fps1p confers increased freeze tolerance to yeast cells: application of the fps1delta mutant to frozen dough technology. *Appl Microbiol Biotechnol* **66** (3), 303–305. doi: 10.1007/s00253-004-1688-1
- Ji H, Lu X, Zong H, Zhuge B (2018) Functional and expression studies of two novel STL1 genes of the osmotolerant and glycerol utilization yeast *Candida glycerinogenes*. *Journal Gen Appl Microbiol* **64**(3), 121-126. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.10.001>
- Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* **6**, 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
- Kassaye S, Pant KK, Jain S (2016) Synergistic effect of ionic liquid and dilute sulphuric acid in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Fuel Process Technol* **148**, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.12.032>
- Kelly P (1983) Sugar Beet Pulp—A Review. *Anim Feed Sci Technol* **8**, 1–18. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(83\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0377-8401(83)90038-X)

- Klein BC, de Mesquita Sampaio IL, Mantelatto PE, Filho RM, Bonomi A (2019) Beyond Ethanol, Sugar, and Electricity: A Critical Review of Product Diversification in Brazilian Sugarcane Mills. *Biofuel Bioprod Biorefin* **13**, 809–821. <https://doi.org/10.1002/bbb.1969>
- Klein M, Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E (2017) Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities, *Environ Microbiol* **19(3)** 878–893. doi: 10.1111/1462-2920.13617
- Koganti S, Ju LK (2013) *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochem Eng J* **79**, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.014>
- Koganti S, Kuo TM, Kurtzman CP, Smith N, Ju LK (2011) Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 257–267 <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3015-3>
- Koganti S, Kuo TM, Kurtzman CP, Smith N, Ju L-K, (2011) Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol* **90 (1)**, 257–267. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3015-3>
- Kordowska-Wiater M., Targonski Z, Jarosz A (2008) Biotransformation of L-arabinose to arabitol by yeasts from genera *Pichia* and *Candida*. *Biotechnologia* **1**, 177–188.
- Kręgiel D, Pawlikowska E, Antolak H (2017) Non-conventional yeasts in fermentation processes: potentialities and limitations, U: Lucas C, Pais C (ured.), *Old Yeasts - New Questions*, 5. izd., IntechOpen, River str. 98-145. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70404>
- Kucharska K, Rybarczyk P, Hołowacz I, Łukajtis R, Glinka M, Kaminski M, (2018) Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules* **23**, 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kumar P, Barrett D, Delwiche M, Stroeve P (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res* **48(8)**, 3713-3729.
- Kumar R, Wyman CE (2009) Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnol Bioeng* **103**, 252–267. <https://doi.org/10.1002/bit.22258>
- Kumdam H, Murthy SN, Gummadi SN (2013) Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB Express* **3**, 23 <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-23>

- Lane MM, Burke N, Karreman R, Wolfe KH, O'Byrne CP, Morrissey JP (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **100(4)**, 507–519. doi:10.1007/s10482-011-9606-x
- Lane MM, Morrissey JP (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol Rev* **24**, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>
- Leonel LV, Arruda PV, Chandel AK, Felipe MGA, Sene L (2021) *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. *Crit Rev Biotechnol* **41(8)**, 1131-1152. doi:10.1080/07388551.2021.1917505
- Lertwattanasakul N, Suprayogi Murata M, Rodrussamee N, Limtong S, Kosaka T, Yamada M (2013) Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *Antonie van Leeuwenhoek* **103(4)**, 933–945. doi:10.1007/s10482-012-9874-0
- Livesey G (2003) Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutr Res Rev* **16(2)**, 163–191. <https://doi.org/10.1079/NRR200371>
- Madeira Jr JV, Gombert AK (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. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.010>
- Malav M, Sushil Kumar Kharia S, KR Sheetal S, Kannojiya S (2017) Furfural and 5-HMF: Potent fermentation inhibitors and their removal techniques. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **6(3)**, 2060–2066. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.235>
- Martinez-Jimenez FD, Neitzel T, Biazi LE, Pereira IO, dos Santos LV (2012) Exploiting the non-conventional yeast *Spathaspora passalidarum* as a platform for hemicellulosic hydrolysate conversion into bioproducts: A mini review, *BioEnergy Res* **14(2)**, 689-708. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10257-5>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7392-0>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.007>

Miake Y, Saeki Y, Takahashi M, Yanagisawa T (2013) Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. *J Electron Microsc* **52**, 471–6. doi:10.1093/jmicro/52.5.471. PMID 14700079.

Mingguo J, Wang B, Yang L, Lin S, Cheng H, (2011) Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. *J Microbiol Biotechnol* **21(1)**, 43–49. doi:10.4014/jmb.1006.06012

Morais Junior WG, Pacheco TF, Trichez D, Almeida JRM, Gonçalves SB, (2019) Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *Yeast* **36**, 349–361. <https://doi.org/10.1002/yea.3394>

Münnich M, Khiaosa-Ard R, Klevenhusen F, Hilpold A, Khol-Parisini A, Zebeli Q. (2017) A meta-analysis of feeding sugar beet pulp in dairy cows: Effects on feed intake, ruminal fermentation, performance, and net food production. *Anim Feed Sci Technol*, **224**, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.12.015>

Nakanishi SC, Soares LB, Biazi LE, Nascimento VM, Costa AC (2017) Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol Bioeng* **114**, 2211-2221. <https://doi.org/10.1002/bit.26357>

Nonklang S, Abdel-Banat BMA, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, i sur. (2008) High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol* **74(24)**, 7514–7521. doi:10.1128/aem.01854-08

Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* **1**, 7 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>

Padilla B, Gil J V, Manzanares P (2016) Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front Microbiol* **7**, 411 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>

Pappenberger G, Hohmann HP (2014) Industrial production of L-ascorbic Acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **143**, 143–188. https://doi.org/10.1007/10_2013_243.

Park JB, Kim JS, Jang SW, Hong E, Ha SJ (2015). The application of thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* as a potential industrial workhorse for biofuel production. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* **30**, 125-131. <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2015.30.3.125>

Pavlečić M, Rezić T, Šantek MI, Horvat P, Šantek B (2017) Bioethanol production from raw sugar beet cossettes in horizontal rotating tubular bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* **40(11)**, 1679–1688. doi:10.1007/s00449-017-1823-x

Pavlečić M, Vrana I, Vibovec K, Ivančić Šantek M, Horvat P, Šantek B Ethanol Production from Different Intermediates of Sugar Beet Processing *Food Technol Biotechnol* **48(3)**, 362-367.

Pentjuss A, Stalidzans E, Liepins J, Kokina A, Martynova J, Zikmanis P, i sur (2017) Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol* **44(8)**, 1177-1190. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1946-8>

Perković L (2020) Proizvodnja etanola s pomoću kvasaca iz roda *Spathaspora* na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom izluženih rezanaca šećerne repe, (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Poole D, Citerio G, Helbok R, Ichai C, Meyfroidt G, Oddo M, Payen JF, Stocchetti N, (2020) Evidence for Mannitol as an Effective Agent Against Intracranial Hypertension: An Individual Patient Data Meta-analysis. *Neurocrit Care* **32 (1)**, 252–261. <https://doi.org/10.1007/s12028-019-00771-y>.

Potters G, Van Goethem D, Schutte F (2010) Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. *Nature Education* **3(9)** 14 <https://www.nature.com/scitable/topicpage/promising-biofuel-resources-lignocellulose-and-algae-14255919/> Pristupljeno 14. svibnja 2023.

Rao RS, Jyothi ChP, Prakasham RS, Sarma P, Rao LV (2006). Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource Tech* **97(15)**, 1974–1978. doi:10.1016/j.biortech.2005.08.015. PMID 16242318

- Rice T, Zannini E, K Arendt E, Coffey A (2019) A review of polyols – biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60(12)**, 2034–2051. doi:10.1080/10408398.2019.1625859
- Rocha SN, Abrahão-Neto J, Gombert AK (2011) Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **100(4)**, 619–630. doi:10.1007/s10482-011-9617-7
- Rouwenhorst RJ. (1990) Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces yeasts* (doktorska disertacija) Delft University of Technology, Delft
- Saini P, Beniwal A, Kokkiligadda A, Vij S (2017) Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. *Process Biochem* **62**, 69–79. doi:10.1016/j.procbio.2017.07.013 10.1016/j.procbio.2017.07.013
- Semkiv MV, Dmytruk KV, Abbas CA, Sibirny AA (2017) Metabolic engineering for high glycerol production by the anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol Biotechnol* **101(11)**, 4403–4416. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8202-z>
- Shafiei M, Kumar R, Karimi K (2015) Pretreatment of lignocellulosic biomass. U: Karimi K (ured.) *Lignocellulose-Based Bioproducts. Biofuel and Biorefinery Technologies*, Springer, Switzerland
- Sharma YC, Singh B, Upadhyay SN (2008) Advancements in development and characterization of biodiesel: A review *Fuel* **(87)12**, 2355.-2373. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.01.014>
- Sun S, Sun S, Cao X, Sun R (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour Technol* **199**, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Suryawati L, Wilkins MR, Bellmer DD, Huhnke RL, Maness NO, Banat IM, (2008) Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering* **101**, 894-902. <https://doi.org/10.1002/bit.21965>
- Suzuki T, Hoshino T, Matsushika A (2019) High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains. *Enzyme Microb Technol* **129**, 109359. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109359>

Ubando AT, Felix CB, Chen, WH (2020) Biorefineries in Circular Bioeconomy: A Comprehensive Review. *Bioresour Technol* **299**, 122585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122585>

Usmani Z, Sharma M, Diwan D, Tripathi M, Whale E, Jayakody LN, i sur. (2022). Valorization of sugar beet pulp to value-added products: A review. *Bioresour Technol*, **346**, 126580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126580>

Varela JA, Gethins L, Stanton C, Ross P, Morrisay JP (2017) Applications of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnology. U: Satyanarayana T, Kunze G, (ured.), Yeast diversity in human welfare, Springer, Singapur, str. 439–453.

Varela JA, Gethins L, Stanton C, Ross P, Morrissey JP (2017) Applications of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnology. U: Satyanarayana T, Kunze G (ured.) Yeast Diversity in Human Welfare, Springer Nature, Singapore, str. 439–453. https://doi:10.1007/978-981-10-2621-8_17
[10.1007/978-981-10-26](https://doi:10.1007/978-981-10-26)

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

Vučurović D (2015) Model bioprocesa proizvodnje etanola iz među- i nusproizvoda prerade šećerne repe (doktorska disertacija) Tehnološki fakultet Novi Sad, Sveučilište u Novom Sadu, Novi Sad.

Wang YJ, Ying BB, Shen W, Zheng RC, Zheng YG (2017) Rational design of *Kluyveromyces marxianus* ZJB14056 aldo–keto reductase KmAKR to enhance diastereoselectivity and activity. *Enzyme Microb Technol* **107**, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.012>

Xiang J, Yang S, Zhang J, Wu J, Shao Y, Wang Z, Yang M, (2021) The preparation of sorbitol and its application in polyurethan. *Poly Bull* **79**, 2667–2684 <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03639-4>.

Yan J, Wei Z, Wang Q, He M, Li S, i sur. (2015) Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide-pretreated water hyacinth via simultaneous saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioresour Technol* **193**, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.069>

- Yoshikawa J, Habe H, Morita T, Fukuoka T, Imura T, Iwabuchi H, et al. (2014) Production of D-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**(7), 2947–2953. doi:10.1007/s00253-013-5449-x
- Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding SY (2014) Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Curr Opin Biotechnol* **27**, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.008>
- Zhang B, Ren L, Wang H, Xu D, Zeng X, Li F (2020) Glycerol uptake and synthesis systems contribute to the osmotic tolerance of *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb Technol* **140**, 109641. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109641.
- Zhang B, Zhu Y, Zhang J, Wang D, Sun L, Hong J (2017) Engineered *Kluyveromyces marxianus* for pyruvate production at elevated temperature with simultaneous consumption of xylose and glucose. *Bioresour Technol* **224**, 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.110> 10.1016/j.biortech.2016.11.110
- Zhang J, Zhang B, Wang D, Gao X, Hong J (2014). Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol* **152**, 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.109>
- Zhang J, Zhang B, Wang D, Gao X, Hong J (2015) Improving xylitol production at elevated temperature with engineered *Kluyveromyces marxianus* through over-expressing transporters. *Bioresour Technol* **175**, 642–645. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.150
- Zhang L, Chen Z, Wang J, Shen W, Li Q, Chen X (2021) Stepwise metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient xylitol production from xylose mother liquor. *Microb Cell Fact* **20**, 105. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01596-1>
- Zoghalmi A, Paës G (2019) Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Fron Chem* **7**, 874. doi.org/10.3389/fchem.2019.0087

7. PRILOZI

Prilog 1. Standardi korišteni za UPLC analizu

t_R	SPOJ	JEDNADŽBA BAŽDARNOG PRAVCA	R^2
(min)			(-)
5.080	glukoza	Area = 140381.12 $g_{glukoza}$ - 157.58	1.0000
5.590	ksiloza	Area = 14424 $g_{ksiloza}$ - 1142,6	0.9991
6.08	arabinoza	Area = 11977 $g_{arabinoza}$ - 1302,3	0.9994
6.124	oksalna kiselina	Area = 142894 $g_{oksalna kiselina}$ - 26067	0.9989
6.283	arabitol	Area = 133897.92 $g_{arabitol}$ + 192.30	1.0000
6.235	rubitol	Area = 139500 $g_{rubitol}$ + 10358	1.0000
6.427	ksilitol	Area = 141414.03 $g_{ksilitol}$ + 799.15	1.0000
7.292	glicerol	Area = 115438 $g_{glicerol}$ + 2603.5	0.9999
7.683	octena kiselina	Area = 25538 $g_{octena kiselina}$ + 4404.1	0.98
10.074	etanol	Area = 484161 g_{etanol} + 737.97	0.9999

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MIJA KASELJ 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.



Vlastoručni potpis