

Izolacija i selekcija kvasaca za proizvodnju bioetanola iz kiselinskog hidrolizata pivskog tropa

Vičević, Renata

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:541091>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Renata Vičević

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Renata Vičević

Predala je izrađen diplomski rad dana: 11. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Martina Sudar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 14. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Renata Vičević

Izolacija i selekcija kvasaca za proizvodnju bioetanola iz kiselinskog hidrolizata
pivskog tropa

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Anita Šalić

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

doc. dr. sc. Martina Sudar

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Šalić na prilici za izradu ovog diplomskog rada, pomoći u laboratoriju, strpljenju te mnoštvu savjeta koji su poboljšali ovaj rad. Hvala Vam na svom prenesenom znanju i pruženim prilikama u ove dvije godine!

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na izoliranim kvascima potrebnima za provedbu ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji bez koje završetak ovog studija ne bi bio moguć!

I za kraj, posebno hvala Luki koji je uvijek vjerovao u mene kada god ja to nisam.

SAŽETAK

Bioetanol je alkohol proizveden mikrobnom fermentacijom. U svrhu proizvodnje etanola najviše se koriste šećerna trska, repa i kukuruz, ali se sve više kao zamjenski supstrat spominje lignoceluloza, jeftin, obnovljivi izvor energije, kojeg u prirodi ima u velikim količinama. Proces proizvodnje etanola fermentacijom najčešće se provodi korištenjem kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*. U procesu proizvodnje etanola iz lignocelulozne sirovine, nedostatak korištenja *S. cerevisiae* je nemogućnost rasta na pentozama, laktozi i polisaharidima zbog toga što njegov metabolizam ne stvara odgovarajuće enzime, a pentofosfatni put ne radi učinkovito. Zbog toga se sve više istražuju mikroorganizmi s mogućnošću fermentacije tih spojeva (kvasci *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, rodovi *Candida* i *Pichia*).

Cilj ovog rada bio je izolirati kvasce koje mogu učinkovito proizvesti bioetanol iz heksoza i pentoza. U tu svrhu, izolirani su i identificirani kvasci *Kluyveromyces marxianus* i *Candida krusei*. Tijekom preliminarnih istraživanja ispitana je učinkovitost procesa fermentacije glukoze kvascem *S. cerevisiae* u membranskom reaktoru pri čemu je učinkovitost procesa iznosila $E = 18,015 \pm 5,370\%$ što je znatno manje u usporedbi sa šaržnim procesom pri istim početnim koncentracijama kvasca i šećera, gdje je učinkovitost procesa iznosila $E = 80,668 \pm 0,561\%$. U sljedećem koraku ispitan je utjecaj početne koncentracije šećera glukoze (5, 10 i 50 g/L) i ksiloze (5, 10 i 20 g/L) na proizvodnju bioetanol korištenjem kvasca *K. marxianus* i *C. krusei*. Prilikom fermentacije glukoze kvascem *K. marxianus* najveći koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S} = 0,093 \pm 0,006$ g/g), učinkovitost procesa ($E = 18,194 \pm 1,278$ %) i produktivnost procesa ($Pr = 0,141 \pm 0,009$ g/(L·h)) postignuti su prilikom fermentacije glukoze čija je početna koncentracija iznosila 5 g/L. Prilikom fermentacije glukoze kvascem *C. krusei*, najveći koeficijent konverzije ($Y_{P/S} = 0,105 \pm 0,009$ g/g) i učinkovitost procesa ($E = 20,559 \pm 1,702$ %) postignuti su prilikom fermentacije 5 g/L glukoze dok je najveća produktivnost procesa ($Pr = 0,038 \pm 0,002$ g/(L·h)) postignuta fermentacijom 10 g/L glukoze. Analizom dobivenih produkata na kraju procesa fermentacije ustanovljeno je da niti jedan kvasac nije učinkovit u proizvodnji bioetanol iz ksiloze, ali oba kvasca proizvode druge vrijedne sirovine poput 2,3-butandiola. Najveće koncentracije 2,3-butandiola, $\gamma_{BT} = 0,412 \pm 0,018$ g/L za kvasac *K. marxianus* i $\gamma_{BT} = 1,860 \pm 0,044$ g/L za *C. krusei*, dobivene su fermentacijom podloga koje su sadržale 10 g/L, odnosno 20 g/L ksiloze. S obzirom na dobivene rezultate, na kraju istraživanja provedena je dvostupanjska fermentacija na kiselinskom hidrolizatu pivskog tropa. U prvom stupnju je

provedena fermentacija heksoza pomoću kvasca *S. cerevisiae*, a u drugom fermentacija pentozna pomoću kvasaca *K. marxianus* i *C. krusei* pri čemu su dobiveni sljedeći pokazatelji uspješnosti za *K. marxianus* $Y_{P/S} = 6,024 \pm 0,326$ g/g, $Y_{P/S} = 0,451 \pm 0,024$ g/g, $E = 88,350 \pm 4,776$ %, $Pr = 0,262 \pm 0,014$ g/(L·h) i $\gamma_{BT} = 1,710 \pm 0,043$ g/L te za *C. krusei* $Y_{P/S} = 5,632 \pm 0,193$ g/g, $Y_{P/S} = 0,421 \pm 0,014$ g/g, $E = 82,589 \pm 2,830$ %, $Pr = 0,245 \pm 0,008$ g/(L·h) i $\gamma_{BT} = 1,019 \pm 0,022$ g/L.

Ključne riječi: bioetanol, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, fermentacija, pivski trop

SUMMARY

Bioethanol is an alcohol produced by microbial fermentation. Normally, sugarcane, beets and corn are the main crops used for ethanol production. However, there is a growing interest in using lignocellulose, an abundant and inexpensive renewable energy source, as a potential replacement substrate. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is typically used in the fermentation process for ethanol production. However, in ethanol production from lignocellulosic materials, *S. cerevisiae* encounters limitations in metabolizing pentoses, lactose, and polysaccharides due to the lack of suitable enzymes and inefficient functioning of the pentose phosphate pathway. Therefore, research efforts are increasingly focused on microorganisms capable of fermenting these compounds, such as the yeasts *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, and *Candida* and *Pichia* genera.

The aim of this study was to isolate yeasts capable of efficiently producing bioethanol from hexoses and pentoses. For this purpose, the yeasts *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* were isolated and identified. In preliminary studies, the efficiency of glucose fermentation by *S. cerevisiae* yeast in a membrane reactor was investigated. The result was a process efficiency of $E = 18.015 \pm 5.370\%$, which is significantly lower than batch processes with the same initial yeast and sugar concentrations, where the efficiency was $80.668 \pm 0.561\%$. Next, the influence of initial glucose (5, 10, and 50 g/L) and xylose sugar (5, 10, and 20 g/L) concentrations on bioethanol production with *K. marxianus* and *C. krusei* yeasts was investigated. Fermentation of glucose with yeast *K. marxianus* achieved the highest substrate-to-product conversion coefficient ($Y_{P/S} = 0.093 \pm 0.006$ g/g), process efficiency ($E = 18.194 \pm 1.278\%$), and process productivity ($Pr = 0.141 \pm 0.009$ g/(L·h)) when the initial glucose concentration was 5 g/L. In glucose fermentation with *C. krusei* yeast, the highest conversion coefficient ($Y_{P/S} = 0.105 \pm 0.009$ g/g) and process efficiency ($E = 20.559 \pm 1.702\%$) were obtained with 5 g/L glucose, while the highest process productivity ($Pr = 0.038 \pm 0.002$ g/(L·h)) was achieved with 10 g/L glucose. Analysis of the final fermentation products revealed that none of the yeasts was efficient in producing bioethanol from xylose, but both yeasts produced other valuable compounds such as 2,3-butanediol. The highest concentrations of 2,3-butanediol, $\gamma_{BT} = 0.412 \pm 0.018$ g/L for *K. marxianus* yeast and $\gamma_{BT} = 1.860 \pm 0.044$ g/L for *C. krusei*, were obtained during fermentation with a substrate containing 10 g/L and 20 g/L xylose, respectively. Based on the obtained results, two-stage fermentation with acid hydrolysate from brewer's grains was performed at the end of the study. In the first stage, hexose fermentation was performed with the yeast *S. cerevisiae*, while in the second

stage, pentose fermentation was performed with the yeasts *K. marxianus* and *C. krusei*. The following performance indicators were obtained for *K. marxianus*: $Y_{P/S} = 6.024 \pm 0.326$ g/g, $Y_{P/S} = 0.451 \pm 0.024$ g/g, $E = 88.350 \pm 4.776\%$, $Pr = 0.262 \pm 0.014$ g/(L·h), and $\gamma_{BT} = 1.710 \pm 0.043$ g/L, and for *C. krusei*: $Y_{P/S} = 5.632 \pm 0.193$ g/g, $Y_{P/S} = 0.421 \pm 0.014$ g/g, $E = 82.589 \pm 2.830\%$, $Pr = 0.245 \pm 0.008$ g/(L·h), and $\gamma_{BT} = 1.019 \pm 0.022$ g/L.

Keywords: bioethanol, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, fermentation, brewer's grains

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Biogoriva	3
2.2. Bioetanol	4
2.3. Sirovine za proizvodnju bioetanola	5
2.4. Proizvodnja bioetanola	6
2.4.1. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina	7
2.5. Kvasci	8
2.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.5.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	9
2.5.2.1. Glicerol	10
2.5.2.2. 2,3-Butandiol	11
2.5.3. <i>Candida krusei</i>	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.1.1. Materijali korišteni za izolaciju kvasaca	13
3.1.1.2. Kiselinski hidrolizat pivskog tropa	13
3.1.2. Oprema	14
3.2. Metode	14
3.2.1. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije glukoze	14
3.2.1.1. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije glukoze	14
3.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije ukupnih šećera	15
3.2.2.1. Priprema DNS reagensa	15
3.2.2.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih šećera	15
3.2.3. Mjerenje koncentracije bioetanola, glicerola i 2,3-butandiola plinskom kromatografijom	16
3.2.4. Određivanje koncentracije biomase	16
3.2.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje biomase	16
3.2.4.2. Gravimetrijsko određivanje biomase	16
3.2.5. Izolacija kvasaca	17
3.2.5.1. Izolacija kvasca iz biootpada	17
3.2.5.2. Izolacija kvasca iz trulog drveta	17
3.2.6. Uzgoj kvasaca <i>K. marxianus</i> i <i>C. krusei</i> na tekućim podlogama	18
3.2.7. Jednosupstratna fermentacija kvascima <i>K. marxianus</i> i <i>C. krusei</i> u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	18

3.2.8. Dvosupstratna fermentacija kvascima <i>K. marxianus</i> i <i>C.krusei</i> u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	19
3.2.8.1. Provedba jednostupanjske fermentacije modelne otopine glukoze i ksiloze u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	19
3.2.8.2. Provedba dvostupanjske fermentacije modelne otopine glukoze i ksiloze u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	19
3.2.9. Provedba fermentacije u kontinuiranom membranskom reaktoru $V = 10$ mL	20
3.2.10. Provedba fermentacije kiselinskog hidrolizata pivskog tropa	21
3.2.11. Pokazatelji uspješnosti bioprocasa	22
3.2.12. Matematički (reaktorski i kinetički) modeli procesa proizvodnje bioetanola	22
3.2.12.1. Šaržni reaktor	22
3.2.12.2. Membranski reaktor	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Izolacija kvasaca	25
4.2. Fermentacija glukoze u kontinuiranom membranskom reaktoru $V = 10$ mL	26
4.3. Utjecaj različite početne količine glukoze i ksiloze na produktivnost procesa i rast kvasca <i>K. marxianus</i> u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	27
4.4. Utjecaj različite početne količine glukoze i ksiloze na fermentaciju i rast kvasca <i>C. krusei</i> u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	32
4.5. Fermentacija hranjive podloge glukoze i ksiloze u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL	37
4.5.1. Jednostupanjska fermentacija	37
4.5.2. Dvostupanjska fermentacija	39
4.6. Dvostupanjska fermentacija hidrolizata pivskog tropa	41
5. ZAKLJUČAK	43
6. LITERATURA	45
7. POPIS SIMBOLA	49
8. PRILOZI	50

1. UVOD

Globalno zatopljenje predstavlja jedan od gorućih problema sadašnjice. Otapanje ledenjaka, porast razine mora, gubitak bioraznolikosti te povećana količina stakleničkih plinova (ugljičkov dioksid (CO₂), metan (CH₄), ozon (O₃) i dušikovi oksidi (N_xO)) u atmosferi samo su neke od izravnih posljedica izgaranja fosilnih goriva. Kada se govori o fosilnim gorivima, veliki problem predstavljaju i zalihe. Naime, zbog ubrzanog razvoja svjetskog prometa i gospodarstva dolazi do njihovog vrlo brzog iscrpljivanja te se smatra kako će, uz postojeće tehnologije proizvodnje, fosilnih goriva biti dovoljno za još samo nekoliko desetljeća.

Zbog svega navedenog, intenzivno se traga za alternativnim oblicima fosilnih goriva, a u tom se kontekstu često spominju biogoriva (bioetanol, biodizel, biovodik, biometan itd.). Biogoriva su obnovljivi i održivi izvori energije koji uz to doprinose smanjenju stakleničkih plinova u atmosferi. Osim toga, biogoriva su biorazgradiva te se smatraju relativno bezopasnim za okoliš [1]. Među spomenutim biogorivima, bioetanol se smatra najvjerojatnijom opcijom zamjene fosilnih goriva zbog trenutanih dostignuća u proizvodnji te mogućnosti njegovog korištenja u motornim vozilima (u raznim omjerima s benzinom) bez dodatne preinake motora [2]. Svjetska proizvodnja bioetanola premašuje 130 milijardi litara godišnje, pri čemu prednjače Sjedinjene Američke Države i Brazil [3].

Bioetanol je alkohol koji se trenutno najviše proizvodi postupkom mikrobnе fermentacije iz sirovina koje sadrže šećer (šećerna trska i repa) i škrob (kukuruz). Kao alternativni izvor šećera sve se više koristi lignoceluloza. Lignoceluloza je jeftina i široko dostupna sirovina koja se ne koristi u prehrani ljudi i životinja, te je stoga preferirani supstrat za njegovu proizvodnju. U današnje vrijeme, bioetanol se većinom proizvodi pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, ali nedostatak korištenja tog kvasca je nemogućnost fermentacije ksiloze, koja je sastavni dio lignoceluloznih materijala. S obzirom na to da su mikroorganizmi koji učinkovito i brzo fermentiraju ksilozu, ali i ostale šećere, u bioetanol ključni za razvoj ekonomičnog procesa fermentacije na industrijskog skali, provode se razna istraživanja s ciljem pronalaska odgovarajućih mikroorganizama. Najčešće istraživani mikroorganizmi su kvasci iz roda *Kluyveromyces*, *Candida* i *Pichia* [4].

Cilj ovog istraživanja je provesti izolaciju kvasaca iz prirode koji mogu učinkovito fermentirati heksoze i pentoze iz lignoceluloznog materijala, pivskog tropa, u bioetanol. Nakon izolacije, u seriji šaržnih pokusa ispitat će se utjecaj početne koncentracije šećera

glukoze (5, 10 i 50 g/L) i ksiloze (5, 10 i 20 g/L) na proizvodnju bioetanola kao i različiti načini provedbe procesa: šaržni proces (jednostupanjski i dvostupanjski), te membranski proces. Nakon odabira najboljeg procesa, provest će se proces proizvodnje bioetanola iz kiselinskog hidrolizata pivskog tropa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biogoriva

Biogoriva, prihvatljiva alternativa fosilnim gorivima, se dobivaju iz organskog materijala (škrob, celuloza, lignocelulozni materijal itd.), a mogu biti u kapljevitom (bioetanol, biobutanol, biodizel) ili plinovitom obliku (biometan, biovodik) [1]. Ovisno o vrsti sirovine iz koje se dobivaju, dijele se na biogoriva prve, druge i treće generacije [5].

- ***Biogoriva prve generacije***

Sirovine koje se koriste za dobivanje biogoriva prve generacije su poljoprivredne kulture kao što su kukuruz, šećerna trska, uljana repica te ulja i masti biljnog i životinjskog podrijetla. Goriva poput bioetanola, biopropanola i biobutanola se dobivaju fermentacijom šećera iz kukuruza, šećerne trske ili uljane repice pomoću mikroorganizama. Iako su procesi dobivanja biogoriva prve generacije učinkoviti, najveći problem je to što se spomenute sirovine upotrebljavaju i u proizvodnji hrane što otvara mnoga etička i ekonomska pitanja [1].

- ***Biogoriva druge generacije***

Biogoriva druge generacije proizvode se iz lignocelulozne biomase. Prednost lignocelulozne biomase (ostatci šumske, drvene i poljoprivredne proizvodnje) je njena velika dostupnost i cijena koja je niža od cijene šećernih i škrobnih sirovina [6]. Osim toga, proizvodnja biogoriva iz lignoceluloznih sirovina ne konkurira proizvodnji hrane i nije uzročnik oscilacije cijena prehrambenih sirovina. Nedostatak proizvodnje biogoriva druge generacije je to što je tehnološki značajno zahtjevnije za proizvodnju od biogoriva prve generacije.

- ***Biogoriva treće generacije***

Biogoriva treće generacije dobivaju se iz algi. Prednost korištenja algi je u tome što su za njihov rast potrebni samo ugljikov dioksid, nutrijenti, voda i sunčeva svjetlost, a neke kulture mogu rasti i u otpadnim vodama što smanjuje troškove proizvodnje. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je korištenjem algi moguće proizvesti do 30 puta više energije po hektaru nego što se to može dobiti iz žitarica poput soje. Osim toga, udio lipida u algama (više od 20% w/w) je značajnije veći od udjela lipida u tradicionalnim sirovinama. Proces proizvodnje biogoriva iz algi još nije komercijaliziran, ali smatra se da će u budućnosti donijeti revoluciju na energetsom tržištu [1].

2.2. Bioetanol

Bioetanol, alkohol (C_2H_6O), je bezbojna, bistra tekućina s mirisom sličnom eteru [4]. Bioetanol se danas u najvećoj mjeri proizvodi mikrobnom fermentacijom različitih sirovina kao što su kukuruz, soja i pšenična slama (bioetanol prve generacije), a u novije vrijeme i iz lignoceluloze (bioetanol druge generacije). Bioetanol se trenutno smatra najpopularnijom alternativom benzinu [2] unatoč njihovim značajnim razlikama u fizikalno-kemijskim karakteristikama koje su navedene u Tablici 1.

Tablica 1. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava benzina i etanola [4]

Svojstvo	Benzin	Etanol
Molekulska masa (g/mol)	100-105	46,07
Oktanski broj (-)	88-100	108
Gustoća (kg/L)	0,69-0,79	0,79
Vrelište (°C)	27-225	78
Ledište (°C)	-22,2	-96,1
Donja ogrjevna vrijednost $\cdot 10^3$ (kJ/L)	30-33	21,1
Latentna toplina isparavanja (kJ/kg)	289	854
Topljivost u vodi (-)	Ne	Da

Prednosti korištenja bioetanola u odnosu na benzin uključuju visoki oktanski broj, nisko vrelište, visoku toplinu isparavanja te obogaćenost kisikom (35 % w/w) što omogućuje smanjenje štetnih emisija iz motora [1]. Unatoč navedenim prednostima, korištenje bioetanola ima i nedostataka kao što su cijena sirovine za proizvodnju, cijena mikroorganizama koji se koriste u procesu fermentacija posebno ako se radi o genetski modificiranim organizmima, trošak detoksikacije i trošak uporabe etanola [2]. Osim toga, bioetanol ima nisku volumetrijsku energiju što znači da automobili zahtijevaju više bioetanola po kilometru u usporedbi s konvencionalnim gorivima. Također, još jedan nedostatak leži u činjenici da

bioetanol može degradirati određene elastomere i korodirati određene metale unutar vozila. Također, ukoliko se koristi čisti, 100%-tni bioetanol, za pokretanje vozila postoji mogućnost otežanog paljenja pri niskim vanjskim temperaturama. Kako bi prevladali navedeni problem, bioetanol se stoga miješa s manjim količinama benzina [1].

2.3. Sirovine za proizvodnju bioetanol

Kao što je navedeno, različite vrste sirovina mogu se koristiti za proizvodnju bioetanol. S obzirom na izvor ugljikohidrata dijele se u tri glavne skupine: sirovine koje sadrže šećer, sirovine koje sadrže škrob i lignocelulozne sirovine.

- **Sirovine koje sadrže šećer**

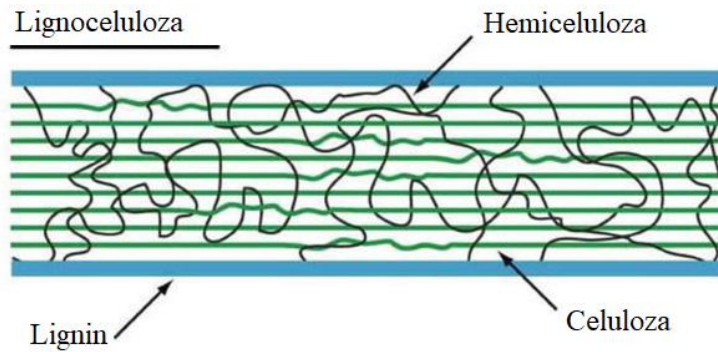
Najčešće upotrebljavane sirovine za proizvodnju bioetanol koje sadrže šećer su šećerna trska i repa, ali se za tu svrhu upotrebljavaju i proizvodi koji su nusprodukt u proizvodnji šećera kao što je melasa. Ovim sirovinama nije potrebna prethodna obrada osim usitnjavanja/mljevenja.

- **Sirovine koje sadrže škrob**

Škrob je mješavina linearnih (amiloza) i razgranatih (amilopektin) poliglukana, a nalazi se u žitaricama kao što su kukuruz, ječam i pšenica. Za proizvodnju bioetanol iz sirovina koje sadrže škrob potrebno je izvršiti hidrolizu škroba u glukozni sirup, najčešće djelovanjem enzima α -amilaze i glukoamilaze, koji se potom pomoću kvasca *S. cerevisiae* fermentira u bioetanol. Korak hidrolize je dodatni trošak u usporedbi s proizvodnjom bioetanol iz sirovina koje sadrže jednostavne šećer. Enzim α -amilazu proizvode genetički modificirani sojevi bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* dok glukoamilazu proizvode plijesni *Aspergillus niger* i rod *Rhizopus*.

- **Lignocelulozne sirovine**

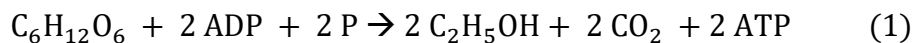
Lignoceluloza je gotovo ravnomjerno raspoređena na Zemlji što osigurava sigurnost opskrbe [4], a najčešće se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina organiziranih u kompaktnu strukturu (Slika 1.). Više o lignocelulozi u proizvodnji bioetanol biti će rečeno u poglavlju 2.4.1..



Slika 1. Komponente lignoceluloze [7]

2.4. Proizvodnja bioetanol

Fermentacija je proces pretvorbe fermentabilnih šećera u bioetanol pomoću mikroorganizama, a ukoliko se radi o glukozi odvija se prema sljedećoj jednačbi (jednačba 1):



Put razgradnje šećera do etanola uključuje glikolizu do piruvata, njegovu dekarboksilaciju u acetaldehid i potom redukciju u etanol. Teoretsko maksimalno iskorištenje etanola iznosi 51 % iz heksoza, ali zbog različitih nusprodukata alkoholne fermentacije praktična iskorištenja iznose 90-95% teoretskog iskorištenja [11].

Bioetanol se može proizvoditi šaržno, kontinuirano i šaržno s dotokom supstrata, a optimalni postupak proizvodnje ovisi o sirovini i korištenim mikroorganizmima.

U šaržnoj fermentaciji mikroorganizmi se inokuliraju u konstantni volumen hranjive podloge u reaktoru. Supstrat se postupno troši, a mikroorganizmi rastu i proizvode bioetanol. Nakon što se hranjive tvari potroše, fermentacija je završena. Prednost šaržne fermentacije je niska cijena, jednostavnost rada, niski rizik od kontaminacije i lagana sterilizacija, a nedostatak niži prinos u odnosu na šaržnu fermentaciju s dotokom i kontinuiranu fermentaciju.

Šaržna fermentacija s dotokom supstrata je slična šaržnoj fermentaciji, a razlikuje se po tome što se hranjive tvari postupno dodaju u reaktor tijekom cijele fermentacije. Ovo rezultira dodatnim porastom biomase što povećava prinos bioetanol. Nedostatak ovakve proizvodnje bioetanol je volumno ograničenje reaktora što može ograničiti količinu unosa supstrata.

Tijekom kontinuirane fermentacije, supstrat se kontinuirano uvodi u reaktor istom brzinom kojom nastaje bioetanol, a on se istovremeno odvodi iz reaktora zajedno s nusproduktima i toksičnim metabolitima. Kako se u kontinuiranim fermentacijama postiže konstantan volumen, maksimalni radni volumen ne ograničava količinu svježeg medija koji se može fermentirati. Ovakav sustav može kontinuirano proizvoditi bioetanol čak i do nekoliko mjeseci, ali zbog dugog vremena fermentacije, ovakve fermentacije su sklone kontaminaciji [3].

2.4.1. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina zahtijeva naprednije tehnologije i postrojenja zbog otpornosti i čvrste strukture materijala, a osim procesa fermentacije uključuje još 3 stupnja tj. dva stupnja predobrade i separaciju bioetanola na kraju procesa:

- predobrada sirovine
- hidroliza sirovine
- fermentacija
- separacija bioetanola.

Procesi predobrade se mogu podijeliti u 4 glavne skupine: fizikalne, biološke, kemijske i fizikalno-kemijske procese pri čemu su posljednja dva najčešće korištena. Koji postupak će se primjenjivati ovisi o korištenoj sirovini [4,8]. Neophodno je provesti neki od postupka predobrade za postizanje uspješnog procesa fermentacije kako bi se otvorila struktura lignocelulozne biomase te enzimi uspješno preveli celulozu i hemicelulozu u jednostavne šećere. Ovaj korak je neophodan, ali uzrokuje znatne dodatne troškove proizvodnje [9].

Cilj koraka hidrolize je pretvorba celuloze i hemiceluloze u jednostavne, fermentabilne šećere. Jedni od najčešćih inhibitora fermentacije, furfural i 5-hidroksimetil furfural, nastaju u ovom koraku [8]. Postoje kiselinska i enzimatska hidroliza, a razlikuju se po načinu cijepanja molekula celuloze. Kiselinskom hidrolizom se sirovina tretira s 0,1-3% (w/w) sumpornom kiselinom na temperaturama između 160-200 °C. Nedostatak ovakvog postupka je nizak prinos bioetanola i nužnost korištenja materijala koji su otporni na koroziju, te potreba za neutralizacijom kiseline što dovodi do nastajanja gips (CaSO_4) i ostalih produkata koji se trebaju naknadno ukloniti. Enzimatskom hidrolizom se celuloza i hemiceluloza prevode u jednostavne šećere djelovanjem celulolitičkih enzima, celulaze i hemicelulaze. Ova tehnika

hidrolize je okolišno prihvatljiva, ali problem predstavlja visoka cijena enzima i manja učinkovitost [10].

Nakon proizvodnje bioetanol, bioetanol je potrebno pročistiti. Čisti bioetanol se ne može izdvojiti jednostavnom destilacijom zbog toga što s vodom tvori azeotropnu smjesu ($w = 95,6\%$) pri $T = 78,15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz tog razloga izdvajanje bioetanol provodi u dva stupnja:

- jednostavna destilacija etanola iz podloge
- dehidracija bioetanol primjenom azeotropne destilacije, ekstraktivna destilacija, ekstrakcija tekuće-tekuće, adsorpcija [5].

2.5. Kvasci

Kvasci su heterogena skupina eukariotskih gljiva koji većinom postoje kao jednostanični organizmi, a imaju raznoliku primjenu i utjecaj na industriju, biotehnologiju i okoliš od drevnih civilizacija pa sve do današnjeg dana. Koriste se za proizvodnju hrane, pića, enzima, kemikalija i lijekova. Broj opisanih vrsta kvasaca raste svakim danom, međutim industrijska primjena je ograničena na mali broj vrsta koje uglavnom pripadaju rodu *Saccharomyces*, *Candida* i *Kluyveromyces*. Kada se govori o proizvodnji bioetanol iz hidrolizata lignocelulozne biomase najčešće se koriste kvasci roda:

- *Saccharomyces*
- *Candida*
- *Kluyveromyces*
- *Pichia (Scheffersomyces)*
- *Schizosaccharomyces*
- *Pachysolen*

Uz kvasac *S. cerevisiae*, koji je najviše istražen i korišten, istraživani su i kvasci *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* i *marxianus* te vrste koje pripadaju rodovima *Candida*, *Pichia (Scheffersomyces)* i *Pachysolen*. Pored kvasaca iz roda *Saccharomyces*, koji se najčešće koriste za komercijalno dobivanje bioetanol, smatra se da najveći potencijal za buduću industrijsku primjenu imaju kvasci iz roda *Pichia (Scheffersomyces)*[12,13].

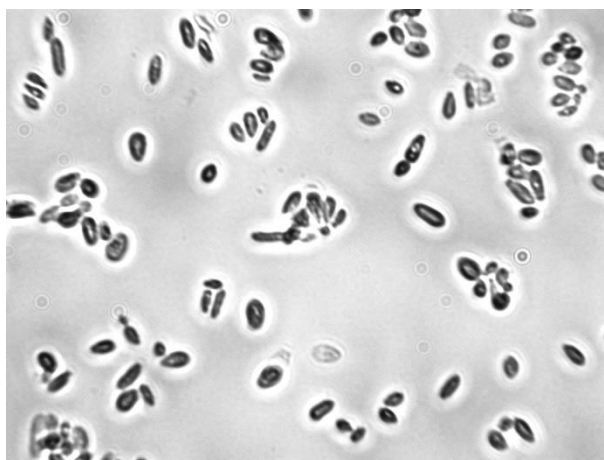
2.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Među korištenim kvascima *S. cerevisiae* je najkorišteniji kvasac u području biotehnologije zbog svoje dostupnosti, dobro istraženog genoma, poznate fizionomije i jednostavnosti korištenja [12]. Važnost ovog kvasca u proizvodnji bioetanola je neupitna, s obzirom na to da je to mikroorganizam koji se najčešće koristi za dobivanje bioetanola prve generacije (iz šećera i škrobnih sirovina) [14].

Posjeduje dobru sposobnost rasta pri visokim koncentracijama bioetanola i šećera u smjesi što rezultira visokim prinosom bioetanola do 0,45-0,50 g_{etanol}/g_{glukoza} te visokom produktivnosti od 2-5 g/(L·h). Kvascima *S. cerevisiae* ima i status GRAS organizma (engl. *Generally Recognised as Safe*) što pojednostavljuje proces proizvodnje. Iako najjednostavnije metabolizira glukozu, može metabolizirati još i fruktozu, saharozu i maltozu [5]. Glavni nedostatak korištenja *S. cerevisiae* u proizvodnji bioetanola je nemogućnost rasta na pentozama koje su vrlo zastupljene u lignocelulozi. Zbog toga se primjenjuju različiti pristupi kao što je to genetska modifikacija kako bi se metabolički putevi za korištenje ovih pentozama integrirali u kvasac [13].

2.5.2. *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus (Slika 2.) je prvi puta opisan i identificiran nakon izolacije iz grožđa kao kvasac koji pripada rodu *Saccharomyces* te je nazvan *Saccharomyces marxianus*. Vrsta je naknadno, zbog razlika s kvascima roda *Saccharomyces*, prebačena u rod *Kluyveromyces*[12].



Slika 2. Stanice kvasca *K. marxianus* [15]

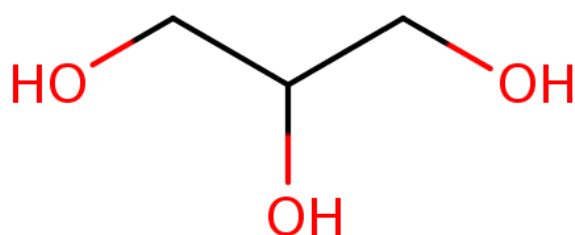
To je Crabtree-negativni, homotalični, hemiascomicenti kvasac s GRAS statusom koji je sestrinska vrsta poznatijeg kvasca *Kluyveromyces lactis*. Najčešće se izolira iz mliječnih izvora kao što su fermentirano mlijeko, jogurt i sirevi, a jedna od glavnih značajki ovog kvasca je sposobnost korištenja laktoze kao izvora ugljika [15]. Ovaj kvasac je od posebnog interesa za industrijsku primjenu zbog svojih specifičnih svojstava koja uključuju veću brzinu rasta od bilo kojeg drugog eukariota, termotolerantnost (sposobnost rasta do 52 °C), sposobnost asimilacije širokog spektra šećera, te proizvodnju bioetanola fermentacijom. Također, ovaj kvasac proizvodi i enzim inulinazu i β -galaktozidazu.

Rast ovog kvasca pri temperaturama do 52 °C i mogućnost provedbe fermentacije pri temperaturama iznad 40 °C vrlo je bitno s industrijskog gledišta. Brza fermentacija na povišenim temperaturama može smanjiti troškove hlađenja i kontinuirani prijelaz s fermentacije na destilaciju, smanjiti rizik od kontaminacije, te omogućuje provođenje istovremene saharifikacije i fermentacije. Osim toga, *K. marxianus* može za proizvodnju bioetanola koristiti širok raspon jeftinih supstrata poput melase i sirutke, a za razliku od *S. cerevisiae* kao supstrat za proizvodnju bioetanola može koristiti i ksilozu. Nedostatak mu je to što mu je rast inhibiran već i pri manjim koncentracijama bioetanola u smjesi [12]. Unatoč prethodno navedenim značajkama, intenzivnije proučavanje *K. marxianus* krenulo je tek nedavno, a dosadašnji rezultati pokazuju da ima potencijala postati vodeći kvasac za mnoge biotehnološke procese.

Osim u proizvodnji bioetanola, ovaj kvasac proizvodi i druge, industrijski bitne spojeve kao što su 2,3-butandiol i glicerol [16].

2.5.2.1. Glicerol

Glicerol ($C_3H_8O_3$) je organski spoj koji pripada skupini šećernih alkohola, a također je poznat pod nazivom 1,2,3 propantriol i glicerol. Njegova struktura prikazana je na Slici 3.

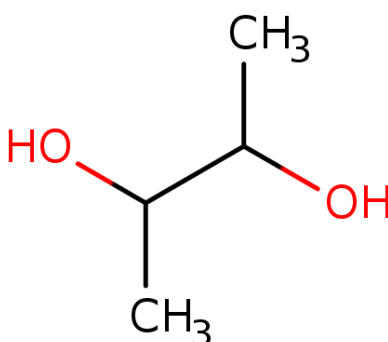


Slika 3. Struktura glicerola [17]

Može se proizvesti mikrobnom fermentacijom i kemijskom sintezom [18]. Glicerol je glavni nusprodukt fermentacije prilikom proizvodnje bioetanola, a koncentracija ostalih nusprodukata je značajno manja. Također, ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji osmotskog tlaka u stanici kvasca [5]. Ima širok raspon primjene u mnogim industrijama kao što su industrija boja, kozmetička, prehrambena i farmaceutska industrija [18].

2.5.2.2. 2,3-Butandiol

2,3-Butandiol ($C_4H_{10}O_2$) pripada skupini organskih spojeva poznatih kao 1,2-dioli. To su polioli koji sadrže hidroksilne skupine na dva susjedna C atoma (Slika 4.) [19].



Slika 4. Struktura 2,3-butandiola [19]

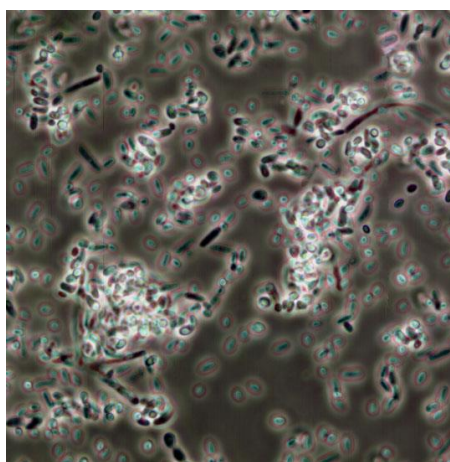
Potencijalno je važna sirovina za primjenu u kemijskoj, kozmetičkoj i poljoprivrednoj industriji. Koristi se kao prekursor za sintezu 1,3-butadiena koji je monomer korišten u proizvodnji sintetičke gume, a može se koristiti i kao sredstvo protiv smrzavanja. Osim toga, njegovi derivati se mogu koristiti kao sredstvo za poboljšanje okusa, za pospješivanje rasta biljaka, kao aditiv za tekuće gorivo itd.

Proizvodnja 2,3-butandiola putem mikrobnog fermentacije s bakterijama *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyveromyces oxytoca*, *Paenibacillus polymyxa*, i *Enterobacter* sp. rezultira visokom produktivnošću, ali istovremeno rezultira proizvodnjom različitih nusprodukata kao što su acetat, etanol, laktat itd. Komercijalizacija ovog spoja je usporena iz razloga što bakterije koje su njegovi proizvođači, većinom pripadaju klasi patogenih mikroorganizama što zahtijeva stroge sigurnosne propise u industrijskoj primjeni [20]. Osim toga, izdvajanje 2,3-butandiola iz fermentacijske smjese je problematično zbog niske koncentracije, topljivosti u vodi te prisutnosti ostalih spojeva [21].

2.5.3. *Candida krusei*

Candida krusei je nekonvencionalni kvasac poznat i pod imenima *Issatchenkia orientalis* i *Pichia kudriavzevii*. Može se lako izolirati iz prirode [22] i hrane kao što su fermentirane namirnice i mliječni proizvodi. Ovaj kvasac privlači pozornost sve većeg broja znanstvenika zbog biotehnološkog potencijala, ali još uvijek ima ograničenu primjenu zbog svoje patogene prirode.

Stanice *C. krusei* su izdužene poput oblika riže i dimenzija 2,2-5,6 μm x 4,3-15,2 μm (Slika 5.), a repliciraju se pupanjem [23]. Maksimalna temperatura na kojoj može rasti je 43 – 45 °C što je poželjno za fermentaciju. Ovaj kvasac otporan je i na razne inhibitore koji se dobivaju prethodnom obradom lignocelulozne biomase, tolerantan je na prisutnost octene kiseline (do 75 mmol/L) te mravlje kiseline (do 10 mmol/L). Otporan je i na različite okolišne uvjete kao što su promjene u pH, velike koncentracije soli i visoka temperatura. Zbog svoje velike otpornosti smatra se obećavajućom alternativom za održivu proizvodnju bioetanola [22]. Uz to, prilikom proizvodnje bioetanola ne proizvodi nusprodukta kao što je npr. jantarna kiselina koju proizvodi *S. cerevisiae* ili glicerol i 2,3-butandiol koje proizvodi *K. marxianus* [23].



Slika 5. Stanice kvasca *C. krusei* [23]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za provedbu eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- 2,3-butandiol, Acros Organics, Belgija
- 3,5-dinitrosalicinska kiselina, Fluka, Kina
- agar od sladnog ekstrakta, Biolife Italiana, Italija
- aktivni ugljen, Lach-Ner, Češka
- amonijev sulfat, Kemika, Hrvatska
- Analytical Profile Index (API 20 C AUX), BioMérieux®, Francuska
- D(+)-glukoza, Gram mol, Hrvatska
- di-amonijev hidrogenfosfat, Fluka, Kina
- di-natrijev hidrogenfosfat, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- etanol, Gram mol, Hrvatska
- glicerol, Gram mol, Hrvatska
- glukoza GOD-PAP test, Greiner, Njemačka
- kalijev natrijev tartarat tetrahidrat, Fluka, Francuska
- kalcijev hidroksid, Gram Mol, Hrvatska
- krumpir dekstroza agar, Biolife Italiana, Italija
- D(+)-ksiloza, VWR Chemicals, Belgija
- kvašćev ekstrakt, Liofilchem, Italija
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, Merck, Njemačka
- natrijev hidroksid, Gram Mol, Hrvatska

3.1.1.1. Materijali korišteni za izolaciju kvasaca

- biootpad – otpadci voća i povrća prikupljenih na zagrebačkim tržnicama
- komad trulog drveta prikupljenog u šumi

3.1.1.2. Kiselinski hidrolizat pivskog tropa

Kiselinski hidrolizat pivskog tropa dobiven je s Prehrambeno tehnološkog fakulteta u Zagrebu. Kiselinska hidroliza pivskog tropa provedena je na način da je 1 kg suhog pivskog tropa i 10 L 0,5 %-tne H_2SO_4 dodano u visokotlačni reaktor. Kiselinska hidroliza provedena

je 10 minuta pri 180 °C. Nakon obrade, 6,8 L kiselinskog hidrolizata je ohlađeno, centrifugirano 30 minuta na 5000 o/min nakon čega je izdvojen supernatant koji je korišten za daljnje eksperimente.

3.1.2. Oprema

Za provedbu eksperimenta korištena je sljedeća oprema:

- centrifuga, Universal 320 R, Hettich, SAD
- laboratorijska tresilica, Crux d.o.o., Hrvatska
- magnetska miješalica, MS-3000, Biosan, Latvija
- magnetska miješalica, Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija
- svjetlosni mikroskop, Olympus BX50, Keyence, Belgija
- pH-metar Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- plinski kromatograf (Shimadzu GC-2014, Japan) s FID detektorom i Zebron ZB-Wax GC kapilarnom kolonom (dužina 30 m, ID 0,53 mm i debljina filma 1,00 µm, Phenomenex, SAD)
- pumpa, Harvard PHD 4400 Programmable, Harvard Apparatus, Inc, SAD
- spektrofotometar, UV-1601, Shimadzu, Japan
- sterilizator, Sutjeska, Srbija
- sušionik, Sutjeska, Srbija
- vodena kupelj, Thermomix 1420, Braun, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije glukoze

Koncentracija glukoze u uzorcima određivana je pomoću enzimske GOD-PAP metode u kojoj enzim glukoza oksidaza katalizira oksidaciju glukoze i pritom oslobađa vodikov peroksid. U sljedećem koraku enzim reagira s 4-hidroksibenzoatom i 4-amino-fenazonom u prisutnosti peroksidaze stvarajući crveni kinonimin čiji je intenzitet obojenja proporcionalan količini glukoze prisutne u samom uzorku [25].

3.2.1.1. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije glukoze

Nepoznata koncentracija glukoze u uzorku određivana je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od $\lambda = 500$ nm uz pomoć baždarnog dijagrama. Za izradu baždarnog dijagrama

korištena je standardna otopina glukoze koncentracije 5,55 mmol/L koja je razrijeđena na šest otopina koncentracija u rasponu 0,17 – 5,55 mmol/L. Mjerenje se provodilo na način da se u prazne Eppendorf vijalice dodalo 10 μ L uzorka i 1 mL radnog reagensa (smjesa 4-aminoantipirina, glukoze oksidaze, peroksidaze, fosfatnog pufera pH = 7,5, fenola, detergenta i stabilizatora). Smjesa je potom homogenizirana te zagrijavana 10 minuta na $T = 37$ °C. Nakon točno 10 min, spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od $\lambda = 500$ nm. Svako mjerenje provedeno je u tri paralelne probe. Slijepa proba pripremljena je na isti način, pri čemu je umjesto 10 μ L uzorka dodana ista količina ultračiste vode. Dobiveni baždarni dijagram predstavlja ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji glukoze (Prilog 1.).

3.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije ukupnih šećera

Koncentracija ukupnih reducirajućih šećera u uzorku određivana je pomoću DNS reagensa. DNS reagens sadrži 3,5-dinitrosalicilnu kiselinu koja se u prisutnosti slobodnih karbonilnih skupina (C=O) u reducirajućim šećerima reducira u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu, aromatični spoj crvenkasto-smečkaste boje koji apsorbira svjetlost pri $\lambda = 575$ nm [26].

3.2.2.1. Priprema DNS reagensa

DNS reagens je pripremljen otapanjem 4,36 g 3,5-dinitrosalicinske kiseline u 160 mL otopine natrijeva hidroksida ($c = 0,5$ mol/L) u vodenoj kupelji na 70 °C. Otapanje je provedeno uz konstantno miješanje uz postupno dodavanja 60 g soli kalijeva natrijeva tartarata tetrahidrata. Nakon otapanja komponenti, DNS reagens je ohlađen na sobnu temperaturu ($T = 25$ °C) te nadopunjen ultračistom vodom do 200 mL. DNS reagens je potrebno čuvati na hladnom ($T = 4$ °C) i u tamnoj boci.

3.2.2.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih šećera

Nepoznata koncentracija ukupnih šećera u uzorku određivana je spektrofotometrijski pomoću baždarnog dijagrama (Prilog 2.). Za izradu dijagrama korištena je standardna otopina glukoze 5,55 mmol/L koja je razrijeđena u Eppendorf vijalicama na šest otopina koncentracije u rasponu između 0,17 – 5,55 mmol/L. U staklenu epruvetu se dodalo 1,5 mL DNS reagensa, 0,5 mL otopine glukoze i 0,5 mL ultračiste vode. Slijepa proba je umjesto 0,5 mL otopine glukoze sadržavala 0,5 mL ultračiste vode. Tako pripremljena smjesa zagrijavana je 15 min u vodenoj kupelji na $T = 100$ °C, a potom ohlađena u hladnoj ($T = 25$ °C) vodenoj kupelji 15

min. Ohlađenom uzorku mjerena je apsorbanca na valnoj duljini od $\lambda = 575$ nm u tri paralelne probe.

3.2.3. Mjerenje koncentracije bioetanol, glicerola i 2,3-butandiola plinskom kromatografijom

Koncentracije bioetanol, glicerola i 2,3-butandiola određivane su na plinskom kromatografu s plameno-ionizacijskim detektorom, na polarnoj koloni ZB-Wax ($l = 30$ m; ID = 0,53 mm; $d_t = 1$ μ m) i korištenjem plina dušika kao nosioca. Prije analize na plinskom kromatografu svaki uzorak je filtriran kako bi se uklonile stanice kvasca (Filter Chromafil Xtra PA-20/25; 0,2 μ m, 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka). Prilikom analize bioetanol temperatura injektora i detektora iznosila je $T = 240$ °C. Kolona se grijala 1 min na temperaturi $T = 50$ °C, nakon čega se zagrijavala na $T = 125$ °C tijekom 6 minuta. Vrijeme zadržavanja bioetanol bilo je 1,73 min. Prilikom analize glicerola i 2,3-butandiola temperatura injektora i detektora iznosila je 240 °C. Vrijeme zadržavanja 2,3-butandiola bilo je 1,746 min, a glicerola 6,220 min. Koncentracije produkata u uzorcima su određene pomoću baždarnih dijagrama (Prilozi 3., 4. i 5.).

3.2.4. Određivanje koncentracije biomase

3.2.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje biomase

Koncentracija biomase kvasca se tijekom uzgoja kvasca određivala spektrofotometrijski pri valnoj duljini od $\lambda = 600$ nm (OD_{600}). U određenim vremenskim intervalima uzimano je otprilike 1 mL uzorka stanica kvasaca koje je bilo potrebno razrijediti u slučaju da je apsorbanca veća od 1,0. Prije samog određivanja koncentracije kvasaca napravljen je baždarni dijagram mjerenjem apsorbanca suspenzija poznatih koncentracija kvasaca ($\gamma_x = (OD_{600} - 0,2208)/1,5562$).

3.2.4.2. Gravimetrijsko određivanje biomase

Mikrobni rast stanica kvasca može se pratiti i povećanjem mase stanica koja se može odrediti iz suhe tvari mikrobnih stanica u kulturi, odnosno gravimetrijskom metodom [11]. Nakon završetka fermentacije 10 mL uzorka uzimano je iz tikvica u prethodno izvagane Falcon epruvete. Uzorci su centrifugirani na 4500 o/min 10 minuta pri temperaturi od $T = 25$ °C. Epruvete sa talogom biomase su potom osušene u sušioniku ($T = 90$ °C) do konstantne

mase. Nakon sušenja, epruvete su izvagane, a iz razlika masa i poznatog početnog volumena uzorka izračuna se koncentracija biomase.

3.2.5. Izolacija kvasaca

3.2.5.1. Izolacija kvasca iz biootpada

Kvasac iz biootpada izoliran je na način da se 10 g suhe tvari biootpada dodalo u 100 mL sterilne vode. Tako pripremljena smjesa je potom homogenizirana na sobnoj temperaturi ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) tijekom 60 minuta na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min. Potom se 1 mL homogeniziranog uzorka otpipetira u Petrijevu zdjelicu i pomiješa s agarom od sladnog ekstrakta (*engl.* Malt Extract Agar). Inkubacija uzorka na temperaturi od $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ trajala je 3-5 dana. Nakon inkubacije određuje broj izraslih kolonija na agaru. Kolonija kvasca koja je bila morfološki različita od ostalih i koja je dominirala u odnosu na ukupni broj kolonija, precijepljena je više puta tehnikom iscrpljivanja u cilju dobivanja zasebne i čiste kolonije. Nakon dobivanja čiste kolonije, kvasac je mikroskopiran pod svjetlosnim mikroskopom te identificiran korištenjem API 20 C AUX.

3.2.5.2. Izolacija kvasca iz trulog drveta

Kvasac iz trulog drva (Slika 6.) izoliran je na način da se trulo drvo usitnilo i stavilo u 50 mL tekuće hranjive podloge krumpirovog dekstroznog agra (*engl.* Potato Dextrose Agar) s dodatkom ksiloze. Pripremljena suspenzija je potom homogenizirana 24 sata na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min na sobnoj temperaturi ($T = 25^{\circ}\text{C}$). Nakon homogenizacije, 1 mL suspenzije se otpipetiralo u Petrijevu zdjelicu te se dodao krumpir dekstroza agar. Petrijeve zdjelice s izoliranim kulturama su inkubirane 3-5 dana pri $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kolonija kvasca koja je morfološki različita i koja je dominirala u odnosu na ukupni broj kolonija, precijepljena je više puta tehnikom iscrpljivanja u cilju dobivanja zasebne i čiste kolonije. Nakon dobivanja čiste kolonije, kvasac je mikroskopiran pod svjetlosnim mikroskopom te identificiran pomoći API 20 C AUX .



Slika 6. Trulo drvo korišteno za izolaciju kvasaca

3.2.6. Uzgoj kvasaca *K. marxianus* i *C. krusei* na tekućim podlogama

Uzgoj izoliranih kvasaca *K. marxianus* i *C. krusei* proveden je na hranjivim podlogama koje su sadržavale kvašćev ekstrakt ($\gamma = 6,0$ g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 4,0$ g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 4,0$ g/L) i glukozu ($\gamma_G = 20$ g/L) otopljene u ultračistoj vodi.

Nakon pripreme, hranjive podloge su sterilizirane na temperaturi od $T = 121$ °C tokom 30 minuta. Nakon sterilizacije, tikvice sa sterilnim podlogama ohlađene su na sobnu temperaturu ($T = 25$ °C) nakon čega su nacijeppljene izoliranom kulturom kvasca. Kvasac se uzgajao na laboratorijskoj tresilici pri 100 o/min i sobnoj temperaturi ($T = 25$ °C). Tijekom vremena je praćena promjena koncentracije šećera, biomase kao i nastalog bioetanol.

3.2.7. Jednosupstratna fermentacija kvascima *K. marxianus* i *C. krusei* u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

Reakcija fermentacije glukoze i ksiloze pomoću kvasca *K. marxianus* i *C. krusei* koncentracije $\gamma_X = 1$ g/L provedena je na hranjivim podlogama različite početne koncentracije glukoze ($\gamma_G = 5$ g/L, $\gamma_G = 10$ g/L i $\gamma_G = 50$ g/L) i ksiloze ($\gamma_K = 5$ g/L, $\gamma_K = 10$ g/L i $\gamma_K = 20$ g/L). Hranjive podloge volumena 200 mL su osim šećera sadržavale i ultračistu vodu, kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L), soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L). Pripremljene hranjive podloge su sterilizirane u Erlenmeyer tikvicama na $T = 121$ °C i ohlađene na sobnu temperaturu ($T = 25$ °C). Fermentacija je započeta dodatkom kvasca u hranjivu podlogu. Proces je proveden u šaržnom reaktoru pri sobnoj temperaturi ($T = 25$ °C) i na laboratorijskoj tresilici pri 100 o/min. U vremenskim intervalima, iz tikvica su sterilno uzimani uzorci u kojima je praćena biomasa, a nakon filtracije (CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) i promjena koncentracije bioetanol i šećera. Na temelju dobivenih vrijednosti, izračunati su pokazatelji uspješnosti bioprocasa.

3.2.8. Dvosupstratna fermentacija kvascima *K. marxianus* i *C.krusei* u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

3.2.8.1. Provedba jednostupanjske fermentacije modelne otopine glukoze i ksiloze u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

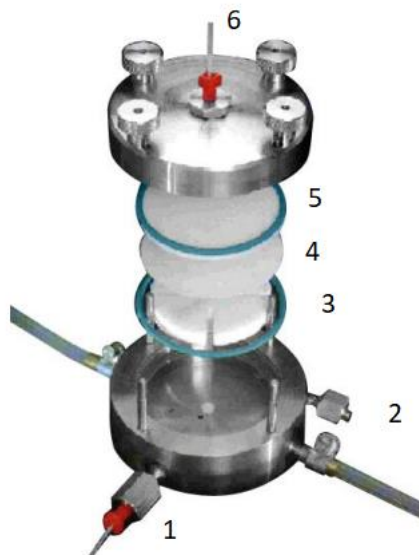
Jednostupanjska fermentacija glukoze i ksiloze pomoću kvasca *K. marxianus* i *C. krusei* provedena je na hranjivoj podlozi sljedećeg sastava: ultračista voda, kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L), soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L), glukoza ($\gamma_G = 18$ g/L) i ksiloza ($\gamma_K = 12$ g/L). Nakon sterilizacije podloge (30 minuta na $T = 121$ °C), u ohlađenu podlogu sterilno je nacijepljeno 1 g/L oba kvasca. Proces je proveden pri sobnoj temperaturi ($T = 25$ °C), a smjesa je miješana na laboratorijskoj tresilici pri 100 o/min. U vremenskim intervalima, iz tikvica su sterilno uzimani uzorci u kojima je praćena biomasa, a nakon filtracije (CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) i promjena koncentracije bioetanola i šećera. Na temelju dobivenih vrijednosti, izračunati su pokazatelji uspješnosti bioprocasa.

3.2.8.2. Provedba dvostupanjske fermentacije modelne otopine glukoze i ksiloze u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

Dvostupanjska fermentacija glukoze i ksiloze pomoću kvasca *K. marxianus* i *C. krusei* provedena je na hranjivoj podlozi sljedećeg sastava: ultračista voda, kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L), soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L), glukoza ($\gamma_G = 18$ g/L) i ksiloza ($\gamma_K = 12$ g/L). Nakon sterilizacije podloge (30 minuta na $T = 121$ °C), u ohlađenu podlogu sterilno je nacijepljen je kvasac *S. cerevisiae* $\gamma_X = 3,6$ g/L. Proces je proveden pri sobnoj temperaturi ($T = 25$ °C), a smjesa je miješana na laboratorijskoj tresilici pri 100 o/min. U vremenskim intervalima, iz tikvica su sterilno uzimani uzorci u kojima je praćena biomasa, a nakon filtracije (CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) i promjena koncentracije bioetanola i glukoze. Kada je sva glukoza potrošena, kompletna podloga je centrifugirana (10 min na 5000 o/min) kako bi se uklonile stanice kvasca. U sljedećem koraku je u istu podlogu dodano 1g/L kvasca *K. marxianus* ili *C. krusei*. Provedba pokusa nastavljena je pri istim procesnim uvjetima. U vremenskim intervalima, iz tikvica su sterilno uzimani uzorci u kojima je praćena biomasa, a nakon filtracije (CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) i promjena koncentracije bioetanola i ksiloze. Na temelju dobivenih vrijednosti, izračunati su pokazatelji uspješnosti bioprocasa.

3.2.9. Provedba fermentacije u kontinuiranom membranskom reaktoru $V = 10 \text{ mL}$

Reakcija fermentacije glukoze provedena je u kontinuiranom membranskom reaktoru prikazanom na Slici 7. Volumen membranskog reaktora iznosio je 10 mL, a izrađen je od nehrđajućeg čelika. U ovaj tip reaktora, reakcijska smjesa/supstrat se dobavlja s dna reaktora (1), a produkt izlazi na vrhu (6). Kako bi se pospješio prijenos tvari, a sama smjesa homogenizirala, unutar samog reaktora nalazi se magnetsko miješalo (3). Osim magnetskog miješala unutar reaktora nalazi se membrana (4) koja zadržava kvasac tijekom fermentacije dok istovremeno kroz nju prolazi smjesa glukoze i bioetanola te razdjeljivač protoka (5) kojim se ostvaruje jednolik dotok smjese na membranu. Kako bi proces fermentacije započeo, u reaktor se unose stanice kvasca kroz septum za uzimanje uzoraka (2). Konstantan protok kroz reaktor ostvaruje se pomoću klipne pumpe, a miješanje se osigurava pomoću magnetske miješalice na kojoj se nalazi reaktor (Slika 8.) [27].



Slika 7. Dijelovi membranskog reaktora



Slika 8. Aparatura potrebna za provedbu reakcije fermentacije pomoću membranskog reaktora

Fermentacija glukoze pomoću kvasca *S. cerevisiae* provedena je na hranjivoj podlozi sljedećeg sastava: ultračista voda, kvašćev ekstrakt ($\gamma = 1,5$ g/L), soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\gamma = 1,0$ g/L) i glukoza ($\gamma_G = 5$ g/L). Nakon sterilizacije podloge (30 minuta na 121 °C), podloga je ohlađena na sobnu temperaturu (25 °C), a kvasac ($\gamma_X = 1,0$ g/L) je injektiran u reaktor pomoću sterilne igle te je time započela reakcija fermentacije. U membranski reaktor dopremamo je $16,67$ $\mu\text{L}/\text{min}$ glukoze $\gamma_G = 5,0$ g/L. Protok toka svježeg supstrata izračunat je na temelju prosječne brzine potrošnje i koncentracije glukoze u toku svježeg supstrata [28].

3.2.10. Provedba fermentacije kiselinskog hidrolizata pivskog tropa

Za potrebe provedbe eksperimenta, uzeto je 400 mL kiselinskog hidrolizata pivskog tropa koji je centrifugiran 10 min na 5000 o/min kako bi se uklonile zaostale čvrste tvari. Supernatant je izdvojen i u njega je dodano 18 g/L aktivnog ugljena s ciljem dodatnog uklanjanja nečistoća. Suspenzija je miješana 60 min na magnetskoj mješalici. Aktivni ugljen je potom uklonjen vakuum-filtracijom na Büchnerovom lijevku. Dobivena otopina je u sljedećem koraku tretirana dodatkom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ do postizanja pH $5,8$. Nastali talog je uklonjen centrifugiranjem (10 min na 5000 o/min), a supernatant, odnosno pročišćeni hidrolizat pivskog tropa, korišten je za fermentaciju.

U dobiveni hidrolizat pivskog tropa je potom dodano $\gamma = 1,5$ g/L kvašćevog ekstrakta te $\gamma = 1,0$ g/L soli $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Smjesa je podijeljena u dva dijela te sterilizirana na temperaturi 121 °C u trajanju od 15 min.

Dvostupanjska fermentacija je provedena kao što je opisano u poglavlju 3.2.8.2.

3.2.11. Pokazatelji uspješnosti bioprocasa

Ocjena uspješnosti provedbe procesa fermentacije provedena je pomoću sljedećih pokazatelja [29]:

Prinos produkta (Y_P):

$$Y_P = \gamma_P - \gamma_{P_0} \text{ (g/L)} \quad (2)$$

Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$):

$$Y_{P/S} = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} \text{ (g/g)} \quad (3)$$

Učinkovitost bioprocasa (E):

$$E = \frac{Y_{P/S} \text{ (stvarni)}}{Y_{P/S} \text{ (teorijski)}} \cdot 100(\%) \quad (4)$$

Produktivnost bioprocasa (Pr):

$$Pr = \frac{Y_P}{t_u} \text{ (g/(L \cdot h))} \quad (5)$$

3.2.12. Matematički (reaktorski i kinetički) modeli procesa proizvodnje bioetanola

Matematički modela procesa fermentacije uključuje reaktorski i kinetički model. Prilikom razvoja modela potrebno je obratiti pažnju na značajke reakcijskog sustava (pH, temperatura, koncentracije produkata, reaktanata i stanica), značajke reakcije (termodinamičke i kinetičke konstante), značajke biokatalizatora kao i njihove međusobne zavisnosti.

3.2.12.1. Šaržni reaktor

Šaržni reaktor je tip reaktora za koji je karakteristično da nema izmjene tvari s okolinom tj. nema dodavanja reaktanta ili uklanjanja produkta tijekom provedbe reakcije. Reakcijska smjesa unese se u reaktor prije početka reakcije, a prazni se po završetku procesa. Ovakav tip reaktora se najčešće je korišteni tip reaktora u industriji. Matematički model reaktora predstavljaju bilance tvari za pojedine komponente koje se nalaze u reakcijskoj smjesi. Stoga je za razvijanje matematičkog modela fermentacije potrebno postaviti bilance za

supstrate glukozu (G), ksilozu (K), produkt bioetanol (E) i biomasu (X) - Jednadžbe 6,7,8,9 (Prilog 6.-8.) [30].

$$\frac{d\gamma_G}{dt} = -\mu \cdot \frac{\gamma_X}{Y_{X/G}} \quad (6)$$

$$\frac{d\gamma_K}{dt} = -\mu \cdot \frac{\gamma_X}{Y_{X/K}} \quad (7)$$

$$\frac{d\gamma_E}{dt} = \mu \cdot \frac{\gamma_X}{Y_{X/E}} \quad (8)$$

$$\frac{d\gamma_X}{dt} = \mu \cdot \gamma_X \quad (9)$$

Pri čemu je μ Monodova jednadžba (Jednadžba 10) proširena izrazom za inhibiciju supstrata s obzirom da visoke koncentracije bioetanola u smjesi inhibiraju rast stanica kvasca i brzinu nastajanja produkta [31].

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{\gamma_S}{K_S + \gamma_S} \right) \cdot \left(1 - \frac{\gamma_E}{\gamma_E'} \right) \quad (10)$$

3.2.12.2. Membranski reaktor

Membranski reaktor je reaktor za istovremeno izvođenje reakcije i odvajanje produkata pomoću membrane [32]. Ukoliko se u reaktoru nalazi jedan supstrat koji daje jedan produkt, bilanca tvari za membranski reaktor može se prikazati sljedećim jednadžbama (Prilog 9.).

$$\frac{d\gamma_X}{dt} = \mu \cdot \gamma_X - k_d \cdot \gamma_X \quad (11)$$

$$\frac{d\gamma_G}{dt} = \frac{\gamma_{G_0} - \gamma_G}{\tau} - \mu \cdot \frac{\gamma_X}{Y_{X/G}} \quad (12)$$

$$\frac{d\gamma_E}{dt} = -\frac{\gamma_E}{\tau} + \mu \cdot \frac{\gamma_X}{Y_{X/E}} \quad (13)$$

Pri čemu je μ Monodova jednadžba proširena izrazom za inhibiciju supstrata.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{\gamma_G}{K_S + \gamma_G} \right) \cdot \left(1 - \frac{\gamma_E}{\gamma_E'} \right) \quad (14)$$

3.2.12. Obrada podataka

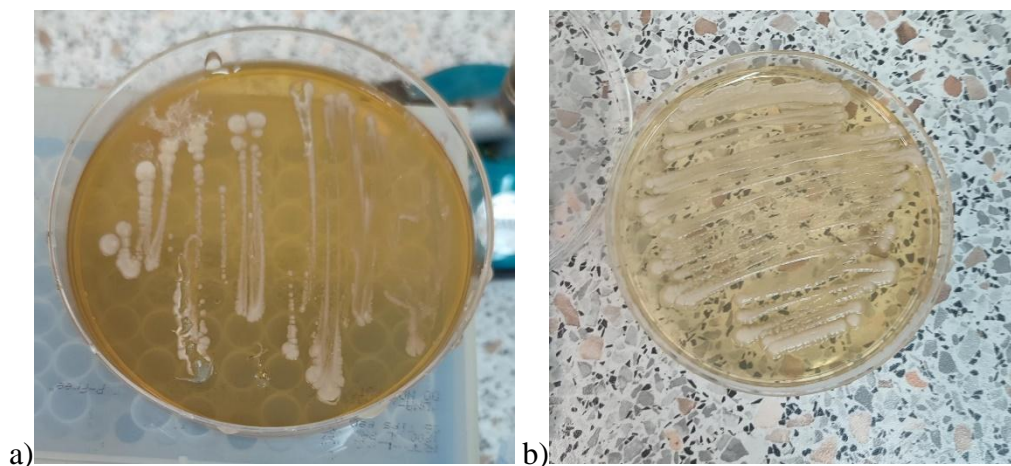
Eksperimentalno dobiveni podaci, koji uključuju ovisnost promjene koncentracije glukoze, ksiloze, bioetanola i biomase o vremenu, opisani su matematičkim modelom dobivenog pomoću programskog paketa SCIENTIST (MicroMath® Scientist® for Windows™, Version 2.0). Parametri modela procijenjeni su na temelju eksperimentalno dobivenih podataka korištenjem simpleks metode i metode najmanjih kvadrata koji predstavljaju usporedbu matematičkog modela s eksperimentalnim podacima sve dok se ne postigne minimalna greška između eksperimentalnog seta podataka i onih podataka dobivenih modelom. SCIENTIST daje razne statističke parametre koji govore o uspješnosti procjene kao što su suma kvadrata odstupanja, standardna devijacija i korelacija [27].

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je izolirati kvasce za proizvodnju bioetanolu iz kiselinskog hidrolizata pivskog tropa. Kvasac *K. marxianus* izoliran je iz biootpada, a iz *C. krusei* kore trulog drveta. Nakon izolacije kvasaca, fermentacija modelne otopine šećera je provedena u šaržnom reaktoru i to kao jednostupanjski i dvostupanjski proces te u membranskom reaktoru. Nakon određivanja optimalnih uvjeta, provedena je fermentacija kiselinskog hidrolizata pivskog tropa. Uz praćenje koncentracije bioetanolu, praćene su i koncentracije 2,3-butandiola i glicerola kao vrijednih nusprodukta fermentacije. Dobiveni rezultati mjerenja biomase kvasca, promjene koncentracije glukoze i ksiloze i koncentracije nastalog bioetanolu opisani su matematičkim modelima dobivenih pomoću programskog paketa SCIENTIST.

4.1. Izolacija kvasaca

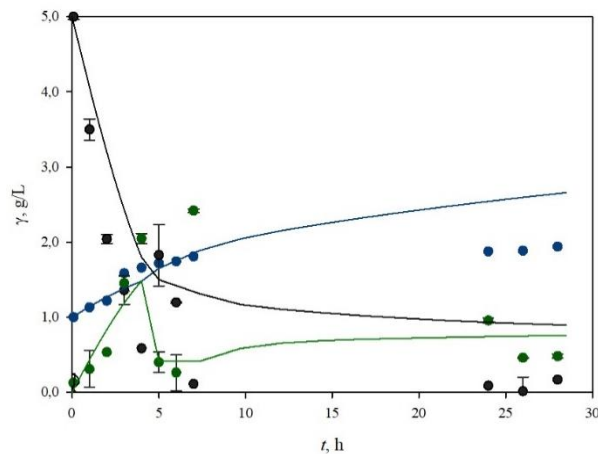
Prvi korak eksperimentalnog dijela bila je izolacija kvasaca iz biootpada i kore trulog drveta postupkom opisanim u poglavljima 3.2.5.1. i 3.2.5.2. s ciljem dobivanja kvasca sposobnog za fermentaciju šećera u bioetanol. Nakon provedbe izolacije, iz biootpada je izoliran kvasac *K. marxianus* (Slika 9a), a iz kore trulog drveta *C. krusei* (Slika 9b) koji su korišteni u daljnjem radu.



Slika 9. Izolirani kvasci a) *K. marxianus* i b) *C. krusei*

4.2. Fermentacija glukoze u kontinuiranom membranskom reaktoru $V = 10$ mL

U prethodnim istraživanjima [28] fermentacija glukoze provedena je u šaržnom reaktoru te šaržnom reaktoru s dotokom. S ciljem optimizacije procesa proizvodnje bioetanolu u ovom istraživanju ispitan je i membranski reaktor. Fermentacija glukoze je provedena pri prethodno određenim optimalnim uvjetima, odnosno s $\gamma_X = 1$ g/L kvasca *S. cerevisiae* i dotokom glukoze od $\gamma_G = 5$ g/L glukoze. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 10.



Slika 10. Promjena koncentracija glukoze (●), bioetanolu (●) i biomase (●) tijekom procesa fermentacije modelne otopine glukoze $\gamma_G = 5$ g/L kvascem *S. cerevisiae* u kontinuiranom membranskom reaktoru (— matematički model procesa)

Proces fermentacije modelne otopine glukoze u membranskom reaktoru provedena je u dva dijela. Prvi dio procesa fermentacije započet je kao šaržni proces kako ne bi došlo do inhibicije male koncentracije kvasca velikom koncentracijom glukoze u dotoku. Dotok glukoze u membranski reaktor uključen je nakon 4 sata kada je koncentracija glukoze u reaktoru iznosila $\gamma_G = 0,586 \pm 0,068$ g/L. U tom trenutku u membranskom reaktoru nastalo je $\gamma_E = 2,047 \pm 0,002$ g/L bioetanolu, što je rezultiralo učinkovitošću procesa od $E = 90,902 \pm 0,001$ % i produktivnošću $Pr = 0,409 \pm 0,001$ g/(L·h). Zbog prisutnosti otopljenog kisika u podlozi, u ovom periodu raste i biomasa. Nakon 4. sata uključen je dotok svježeg supstrata i odvodnja produkata. Rast stanica kvasca usporava, a započinje proces alkoholnog vrenja. U prva 3 h postignuta je najveća koncentracija bioetanolu od $\gamma_E = 2,418 \pm 0,001$ g/L. Nakon tog perioda, koncentracija bioetanolu postupno opada do konstantne vrijednosti od $\gamma_E = 0,459 \pm 0,137$ g/L što se može objasniti inhibicijom glukozom. U Tablici 2. prikazani su pokazatelji uspješnosti procesa fermentacije u membranskom reaktoru u ustaljenom stanju

kao i usporedba s prethodno provedenim eksperimentima u šaržnom reaktoru i šaržnom reaktoru s dotokom.

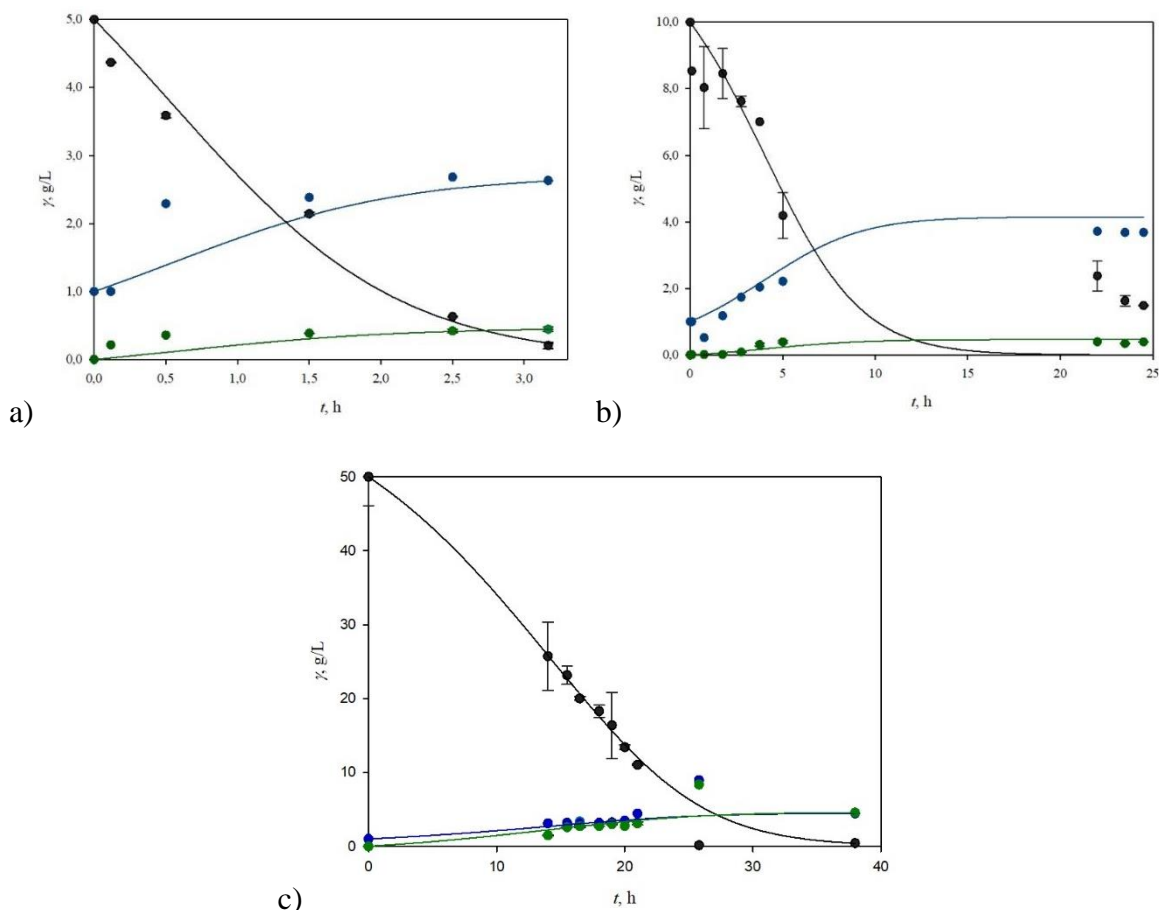
Tablica 2. Usporedba pokazatelja uspješnosti procesa fermentacije $\gamma_G = 5$ g/L glukoze s $\gamma_X = 1$ g/L kvasca *S. cerevisiae* u šaržnom reaktoru, šaržnom reaktoru s dotokom i membranskom reaktoru

	Y_P , g/L	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
Šaržni reaktor [28]	1,946±0,014	0,413±0,003	80,668±0,561	0,085±0,001
Šaržni reaktor s dotokom [28]	8,195±0,195	0,243±0,001	47,580±0,205	0,171±0,004
Membranski reaktor	0,459±0,137	0,092±0,028	18,015±5,370	0,230±0,068

Iz podataka u Tablici 2. vidljivo je da je membranski reaktor s učinkovitošću od $E = 18,015 \pm 5,370$ % znatno manje učinkovit od procesa provedenih u šaržnom reaktoru s $E = 80,668 \pm 0,561$ % i šaržnom reaktoru s dotokom $E = 47,580 \pm 0,205$ %. Također, fermentacije u kontinuiranim reaktorima su podložnije kontaminacijama. Iz tih su razloga daljnja istraživanja provedena u šaržnom reaktoru.

4.3. Utjecaj različite početne količine glukoze i ksiloze na produktivnost procesa i rast kvasca *K. marxianus* u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

Tijekom alkoholne fermentacije glukoze iz početne koncentracije $\gamma_G = 1$ g/L trebalo bi u konačnici nastati približno 0,47 g/L bioetanola. Idenična količina bioetanola trebala bi nastati i prilikom fermentacije 1 g/L ksiloze. Međutim, prevelika koncentracije šećera u podlozi može negativno tj. inhibirajuće djelovati na kvasce tj. cjelokupan proces. Stoga, nužno je pronaći optimalnu koncentraciju šećera. Kako bi se ispitaio utjecaj početne koncentracije glukoze i ksiloze na učinkovitost i produktivnost procesa, provedeni su pokusi s različitim početnim koncentracijama glukoze (5 g/L, 10 g/L i 50 g/L) i ksiloze (5, 10 i 20 g/L). Svi pokusi provedeni su na način da je fermentacija prekinuta kada je koncentracija glukoze i ksiloze pala na nulu.



Slika 11. Promjena koncentracija glukoze (●), bioetanol (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa fermentacije kvascem *K. marxianus* za različite početne vrijednosti koncentracija glukoze: a) 5 g/L, b) 10 g/L, c) 50 g/L

Na Slici 11. vidljivo je da kvasac *K. marxianus* velikom brzinom troši glukožu u podlozi, te da ovisno o potrošenom šećeru, proporcionalno raste količina dobivenog bioetanol. Već na početku procesa dolazi do naglog porasta biomase. Ovo je bilo i očekivano jer, kako je navedeno na početku, *K. marxianus* ima veću brzinu rasta od bilo kojeg drugog eukariota, a osim toga u podlozi je prisutan otopljeni kisik. Padom koncentracije šećera i otopljenog kisika u podlozi, i rast kvasca usporava te on raste manjom brzinom sve do kraja fermentacije. Maksimalna koncentracija bioetanol u pokusu provedenom s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 5 \text{ g/L}$ iznosila je $\gamma_E = 0,446 \pm 0,031 \text{ g/L}$, s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 10 \text{ g/L}$ iznosila je $\gamma_E = 0,395 \pm 0,001 \text{ g/L}$, a s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 50 \text{ g/L}$ iznosila je $\gamma_E = 4,546 \pm 0,324 \text{ g/L}$. Najveći koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S} = 0,093 \pm 0,006 \text{ g/g}$), učinkovitost procesa ($E = 18,194 \pm 1,278 \%$) i produktivnost procesa ($Pr = 0,141 \pm 0,009 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$) postignuti su u procesu u kojem je početna koncentracijom glukoze iznosila 5 g/L. Slični rezultati tj. najbolji

parametri procesa dobiveni su i u prethodnim istraživanjima [28] kada je za dobivanje bioetanola korišten *S. cerevisiae* i početna koncentracija glukoze $\gamma_G = 5$ g/L. Međutim, uspoređujući koncentracije bioetanola postignute u ovom istraživanju i u istraživanju Božinović i sur. [28] pri početnoj koncentraciji glukoze $\gamma_G = 5$ g/L uz *S. cerevisiae* postiže se koncentracija bioetanola od $\gamma_E = 1,946 \pm 0,014$ g/L, dok u pokusu provedenom s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 10$ g/L koncentracija bioetanola je iznosila $\gamma_E = 1,950 \pm 0,035$ g/L što je značajnije više nego u ovom istraživanju.

Također, vidljivo je da koncentracija nastalog bioetanola brzo dosegne maksimalnu vrijednost. Uzrok tome je vjerojatno niska tolerancija kvasca *K. marxianus* na bioetanol što rezultira niskom produktivnosti. Niska produktivnost i niska tolerancija na veće koncentracije bioetanola razlog su što *K. marxianus* još uvijek nije industrijski zanimljivi kvasac [33].

Tablica 3. Pokazatelji uspješnosti šaržne fermentacije glukoze provedene s kvascem *K. marxianus*

γ_G , g/L	Y_P , g/L	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
5	0,446±0,031	0,093±0,006	18,194±1,278	0,141±0,009
10	0,395±0,001	0,046±0,001	9,0704±0,032	0,016±0,001
50	4,546±0,324	0,092±0,007	17,926±1,279	0,120±0,008

Kako bi opisali dinamiku procesa postavljen je matematički model. Iz rezultata prethodno provedenih pokusa procijenjeni su kinetički parametri Monodovog modela: μ_{\max} (maksimalna specifična brzina rasta stanica kvasaca) i K_S (konstanta zasićenja) korištenjem Jednadžbe 10, a procijenjene vrijednosti prikazane su u Tablici 4.

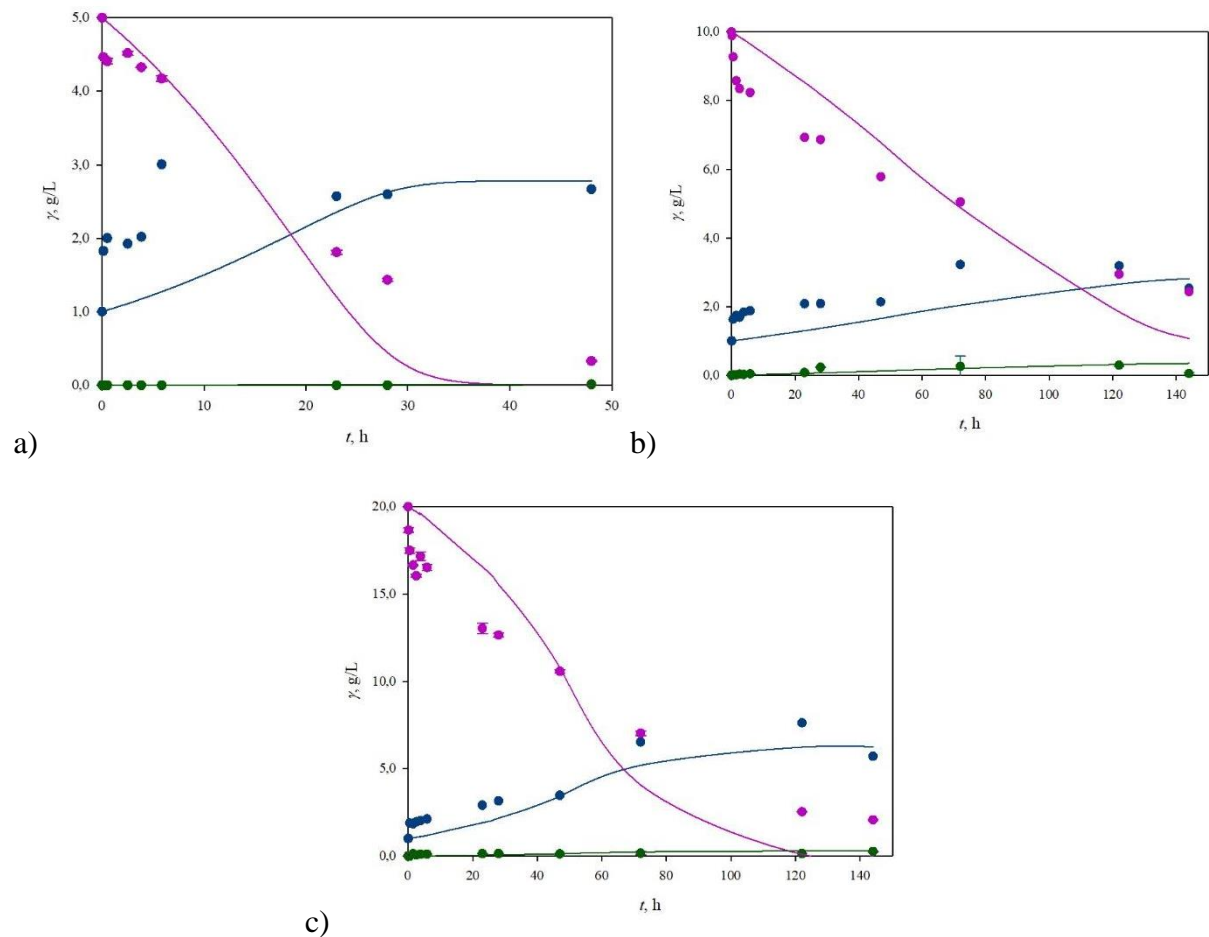
Tablica 4. Procijenjene vrijednosti parametara K_S i μ_{\max} za *K. marxianus* za pokuse provedene pri različitim početnim koncentracijama glukoze

γ_G , g/L	K_S , g/L	μ_{\max} , 1/h
5	12,568	2,412
10	12,568	0,520
50	12,568	0,097

Iz dobivenih rezultata (Tablica 4.) vidljivo je da kvasac raste različitom brzinom ovisno o početnoj koncentraciji glukoze u podlozi tj. da koncentracija glukoze utječe na

kinetiku rasta. Najveća brzina rasta postignuta je prilikom provedbe fermentacije s hranjivom podlogom koja je sadržavala 5 g/L glukoze ($\mu_{\max} = 2,412$ 1/h), dok je najmanja vrijednost ($\mu_{\max} = 0,097$ 1/h) postignuta u procesu s početnom koncentracijom glukoze od 50 g/L. Povećanjem početne koncentracije glukoze u podlozi, maksimalna brzina rasta se smanjuje.

Provedbom procesa fermentacije ksiloze kvascem *K. marxianus* pri različitim početnim koncentracijama (5, 10 i 20 g/L) utvrđeno je da proces nije učinkovit sa stanovišta proizvodnje bioetanola. Naime, bez obzira na koncentraciju šećera u podlozi, dobivena koncentracije bioetanola iznosila je samo $\gamma_E = 0,02$ g/L. S obzirom na vrlo niske koncentracije, posljedično je i učinkovitost procesa bila je vrlo niska tj. u rasponu $E = 0,418 - 6,728\%$. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Promjena koncentracija ksiloze (●), bioetanola (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa fermentacije kvascem *K. marxianus* za različite početne vrijednosti koncentracija ksiloze: a) 5 g/L, b) 10 g/L, c) 20 g/L

Kako bi i ovom procesu opisali dinamiku postavljen je matematički model. Iz rezultata prethodno provedenih pokusa procijenjeni su kinetički parametri Monodovog modela: μ_{\max}

(maksimalna specifična brzina rasta stanica kvasaca) i K_S (konstanta zasićenja) korištenjem Jednadžbe 10, a procijenjene vrijednosti prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara K_S i μ_{\max} za *K. marxianus* za pokuse provedene pri različitim početnim koncentracijama ksiloze

γ_K , g/L	K_S , g/L	μ_{\max} , 1/h
5	13,4	0,178
10	13,4	0,028
20	13,4	0,049

Vrijednost K_S preuzeta je iz literature [34] dok su μ_{\max} vrijednosti procijenjene. Iz vrijednost K_S vidljivo je da *K. marxianus* ima veći afinitet prema glukozi nego ksilozi. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da koncentracija ksiloze kao i glukoze utječe na kinetiku rasta tj. vrijednosti μ_{\max} se smanjuje povećanjem koncentracije šećera pri istoj početnoj koncentraciji biomase.

Uspoređujući oba procesa, može se zaključiti da bez obzira na izvor šećera, dolazi do značajnog i ubrzanog rasta biomase te niske proizvodnje bioetanola.

Kao što je navedeno na početku, *K. marxianus* posjeduje metaboličke puteve za proizvodnju i drugih industrijski bitnih spojeva kao što su 2,3-butandiol i glicerol. Dobiveni rezultati mjerenja koncentracije 2,3-butandiola i glicerola na kraju procesa fermentacije prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracije nastalog glicerola (GL) i 2,3-butandiola (BT) fermentacijom glukoze i ksiloze različitih početnih koncentracija kvascem *K. marxianus*

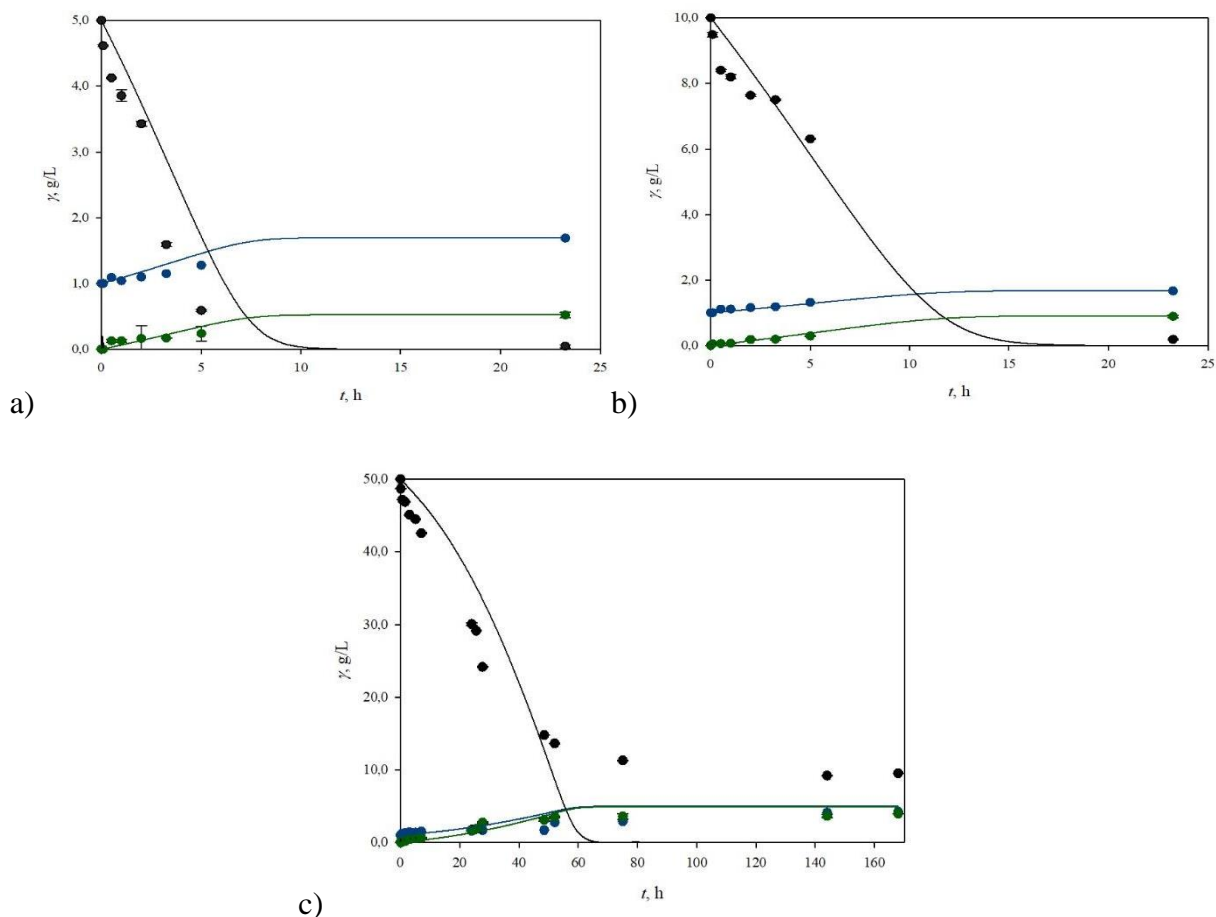
γ_G , g/L	γ_{GL} , g/L	γ_{BT} , g/L
5	0,631±0,001	0,054±0,002
10	1,133±0,321	0,087±0,011
50	5,309±0,481	0,131±0,008
γ_K , g/L		
5	0,025±0,016	0,059±0,043
10	0,037±0,005	0,412±0,018
20	0,348± 0,012	0,380±0,007

Najveća koncentracija glicerola nastala je prilikom fermentacije 50 g/L glukoze, a iznosila je $\gamma_{GL} = 5,309 \pm 0,481$ g/L. Fermentacijom ksiloze, također je najveća koncentracija ($\gamma_{GL} = 0,348 \pm 0,012$ g/L) postignuta pri najvećoj koncentraciji ksiloze od 20 g/L ksiloze.

Fermentacijom oba šećera također je uočen i nastanak 2,3-butandiola. Fermentacijom glukoze, najveća koncentracije 2,3-butandiola ($\gamma_{BT} = 0,131 \pm 0,008$ g/L) postignuta je fermentacijom 50 g/L glukoze, a prilikom fermentacije ksiloze ($\gamma_{BT} = 0,412 \pm 0,018$ g/L) pri koncentraciji od 10 g/L. Iz rezultata je vidljivo da su koncentracije 2,3-butandiola znatno veće prilikom fermentacije ksiloze.

4.4. Utjecaj različite početne količine glukoze i ksiloze na fermentaciju i rast kvasca *C. krusei* u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

Kao što je već rečeno, s obzirom na inhibicijski učinak šećera na kvasce, za uspješnu provedbu procesa nužno je pronaći optimalnu koncentraciju šećera. Kako bi se ispitao utjecaj početne koncentracije glukoze i ksiloze na učinkovitost i produktivnost procesa fermentacije pomoću kvasca *C. krusei*, provedeni su pokusi s različitim početnim koncentracijama glukoze (5 g/L, 10 g/L i 50 g/L) i ksiloze (5, 10 i 20 g/L). Svi pokusi provedeni su na način da je fermentacija prekinuta kada je koncentracija glukoze i ksiloze pala na nulu.



Slika 13. Promjena koncentracija glukoze (●), bioetanola (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa fermentacije kvascem *C. krusei* za različite početne vrijednosti koncentracija glukoze: a) 5 g/L, b) 10 g/L, c) 50 g/L

Na rezultatima sa Slike 13. vidljivo je da kvasac *C. krusei* proizvodi približno istu koncentraciju bioetanola u hranjivim podlogama kao i kvasac *K. marxianus*. Međutim, značajna razlika između dva izolirana kvasca je u brzini rasta i koncentraciji biomase na kraju procesa. Koncentracija biomase kvasca *C. krusei* nakon 5 h iznosila je 1,689 g/L, dok je koncentracija biomase kvasca *K. marxianus* iznosila 2,634 g/L. Dobiveni rezultati bili su očekivani s obzirom da je *K. marxianus* najbrže rastući eukariot na Zemlji [34].

Maksimalna koncentracija bioetanola u pokusu provedenom s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 5$ g/L iznosila je $\gamma_E = 0,520 \pm 0,043$ g/L, s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 10$ g/L iznosila je $\gamma_E = 0,891 \pm 0,039$ g/L, a s početnom koncentracijom glukoze $\gamma_G = 50$ g/L iznosila je $\gamma_E = 3,936 \pm 0,028$ g/L. Najveća učinkovitost procesa ($E = 20,559 \pm 1,702\%$), i koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S} = 0,105 \pm 0,009$ g/g) se postižu fermentacijom hranjive podloge s 5 g/L glukoze dok se najveća

produktivnost ($Pr = 0,022 \pm 0,002 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$) postiže fermentacijom podloge s 10 g/L glukoze. Pokazatelji uspješnosti procesa prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Pokazatelji uspješnosti šaržne fermentacije glukoze provedene s kvascem *C. krusei*

$\gamma_G, \text{g/L}$	$Y_P, \text{g/L}$	$Y_{P/S}, \text{g/g}$	$E, \%$	$Pr, \text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$
5	0,520 \pm 0,043	0,105 \pm 0,009	20,559 \pm 1,702	0,022 \pm 0,002
10	0,891 \pm 0,039	0,091 \pm 0,004	17,801 \pm 0,774	0,038 \pm 0,002
50	3,936 \pm 0,028	0,097 \pm 0,001	19,060 \pm 0,133	0,023 \pm 0,001

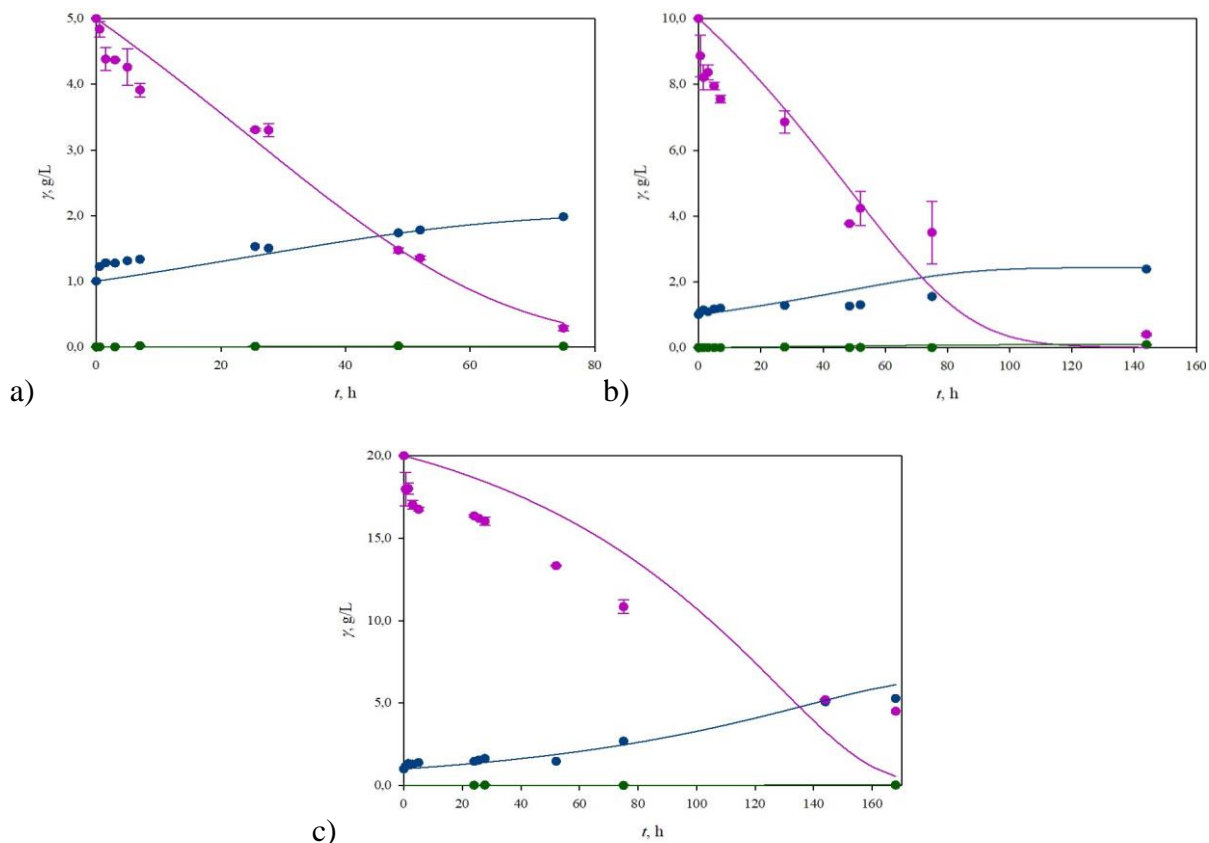
Kako bi opisali dinamiku procesa postavljen je matematički model. Iz rezultata prethodno provedenih pokusa procijenjeni su kinetički parametri Monodovog modela: μ_{\max} (maksimalna specifična brzina rasta stanica kvasaca) i K_S (konstanta zasićenja) korištenjem Jednadžbe 10, a procijenjene vrijednosti prikazane su u Tablici 8.

Tablica 8. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara K_S i μ_{\max} za *C. krusei* za pokuse provedene pri različitim početnim koncentracijama glukoze

$\gamma_G, \text{g/L}$	$K_S, \text{g/L}$	$\mu_{\max}, \text{1/h}$
5	2,095	0,186
10	2,095	0,064
50	2,095	0,033

Iz dobivenih rezultata (Tablica 8.) vidljivo je da kvasac raste različitom brzinom ovisno o početnoj koncentraciji glukoze u podlozi te da se brzina smanjuje porastom koncentracije glukoze u podlozi. Maksimalna brzina rasta postignuta je prilikom provedbe fermentacije sa hranjivom podlogom koja je sadržavala 5 g/L glukoze ($\mu_{\max} = 0,186 \text{ 1/h}$), a najmanja fermentacijom 50 g/L glukoze ($\mu_{\max} = 0,033 \text{ 1/h}$).

Provedbom procesa fermentacije ksiloze kvascem *C. krusei* pri različitim početnim koncentracijama (5, 10 i 20 g/L) prikazan je na Slici 14.



Slika 14. Promjena koncentracija ksiloze (●), bioetanola (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa fermentacije kvascem *C. krusei* za različite početne vrijednosti koncentracija ksiloze: a) 5 g/L, b) 10 g/L, c) 20 g/L

Kao i u provedbi procesa fermentacije s kvascem *K. marxianus*, i u ovom procesu je utvrđeno da proces nije učinkovit sa stanovišta proizvodnje bioetanola. Naime, bez obzira na koncentraciju šećera u podlozi, dobivena koncentracije bioetanola iznosila je samo $\gamma_E = 0,01$ g/L. S obzirom na vrlo niske koncentracije, posljedično je i učinkovitost procesa bila je vrlo niska ($E = 1$ %).

Kako bi opisali dinamiku procesa postavljen je matematički model. Iz rezultata prethodno provedenih pokusa procijenjeni su kinetički parametri Monodovog modela: μ_{\max} (maksimalna specifična brzina rasta stanica kvasaca) i K_S (konstanta zasićenja) korištenjem Jednadžbe 10, a procijenjene vrijednosti prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara K_S i μ_{\max} za *C. krusei* za pokuse provedene pri različitim početnim koncentracijama ksiloze

γ_K , g/L	K_S , g/L	μ_{\max} , 1/h
5	2,993	0,022
10	2,993	0,016
20	2,993	0,013

Kao i za prethodne kvasce, vidljivo je da koncentracija ksiloze utječe na kinetiku rasta. Najveća brzina rasta postignuta je prilikom provedbe fermentacije s hranjivom podlogom koja je sadržavala 5 g/L ksiloze ($\mu_{\max} = 0,022$ 1/h), dok je najmanja vrijednost ($\mu_{\max} = 0,013$ 1/h) postignuta u procesu s početnom koncentracijom ksiloze od 50 g/L.

Usporedbom brzina rasta kvasca *C. krusei* na dva različita šećera (Tablica 8. i 9.) vidljivo je da je brzina rasta kvasca znatno niža na ksilozi nego na glukozi.

S obzirom da u procesu fermentacije šećera s kvascem *C. krusei* nisu nastale značajne količine bioetanola, a rast kvasca je nakon prvih 5 h bio značajno usporen, ispitane su koncentracije 2,3-butandiola i glicerola na kraju procesa fermentacije. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Koncentracije nastalog glicerola i 2,3-butandiola fermentacijom hranjivih podloga različitih početnih koncentracija: a) glukoze i b) ksiloze kvascem *C. krusei*.

γ_G , g/L	γ_{GL} , g/L	γ_{BT} , g/L
5	0,244±0,023	0,002±0,001
10	0,258±0,043	0,003±0,001
50	0,657±0,119	0,380±0,007
γ_K , g/L		
5	0,029±0,002	0,379±0,005
10	0,031±0,001	0,598 0,005
20	0,041±0,002	1,860±0,044

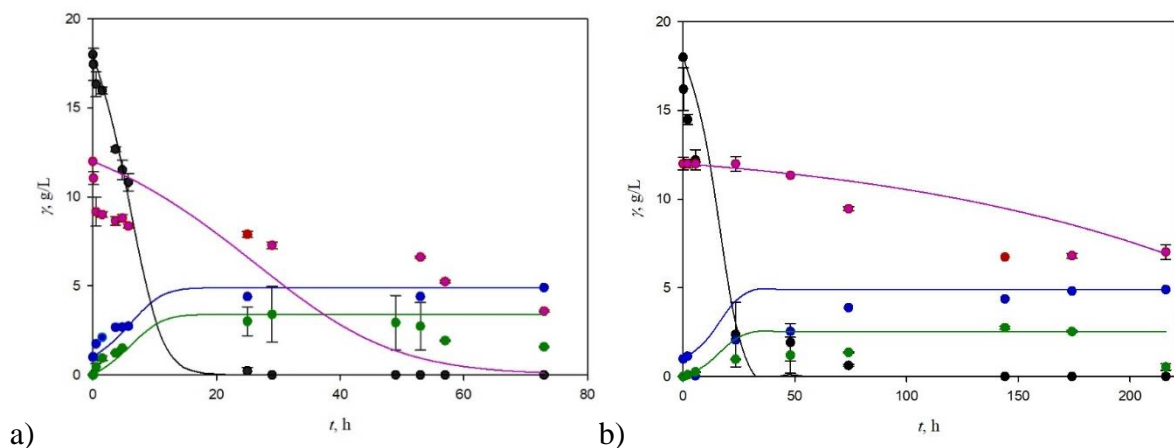
Kao i kod fermentacije šećera pomoću kvasaca *K. marxianus*, maksimalna koncentracija glicerola od 0,657±0,119 g/L dobiva se fermentacijom 50 g/L glukoze, a

maksimalna koncentracija nastalog 2,3-butandiola ($\gamma_{BT} = 1,860 \pm 0,044$ g/L) dobiva se fermentacijom 20 g/L ksiloze.

4.5. Fermentacija hranjive podloge glukoze i ksiloze u šaržnom reaktoru $V = 200$ mL

4.5.1. Jednostupanjska fermentacija

Kao što je već spomenuto, lignocelulozni materijal u svojoj strukturi sadrži više različitih vrsta šećera, što složenih što jednostavnih. Prema prethodnim istraživanjima [28], lignocelulozna sirovina hidrolizata pivskog tropa, sadrži 18 g/L glukoze i 12 g/L pentoza (ksilozu i arabinozu) te je modelna otopina korištena u daljnjem istraživanju bila sličnog sastava tj. 18 g/L glukoze i 12 g/L ksiloze. Dobiveni rezultati fermentacije modelne otopine kvascima *K. marxianus* i *C. krusei* prikazani su na Slici 15.



Slika 15. Promjena koncentracija glukoze (●), ksiloze (●), bioetanola (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa fermentacije 18 g/L glukoze i 12 g/L ksiloze kvascima a) *K. marxianus* i b) *C. krusei*

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da na samom početku ($t = 4$ h), u oba procesa biomasa raste što je posljedica prisutnosti otopljenog kisika u podlozi. U tom periodu, proizvodnja bioetanola je niska. Potrošnjom kisika, započinje alkoholno vrenja te se povećava koncentracija bioetanola. Prilikom fermentacije smjese šećera korištenjem kvasca *K. marxianus* oba šećera, glukoza i ksiloza, troše se paralelno, pri čemu je brzina potrošnje glukoze značajnije veća. S druge strane, prilikom fermentacije smjese šećera korištenjem kvasca *C. krusei* prvo se troši glukoza, a tek onda ksiloza. U oba slučaja, koncentracija bioetanola rasla je ovisno o potrošenoj glukozi, a maksimalna vrijednost postignuta je, fermentacijom šećera kvascem *K. marxianus* nakon 29 h ($\gamma_E = 3,403 \pm 1,561$ g/L), a dok je u

proces s *C. krusei* postignuta nakon 144 h ($\gamma_E = 2,754 \pm 0,084$ g/L). Nakon tog vremena, koncentracija bioetanol polako opada što je vjerojatno povezano s prelaskom iz proizvodne faze u fazu odumiranja stanica kvasca. Da su stanice odumrle prije kraja procesa vidljivo je i iz koncentracije ksiloze na kraju procesa. Naime, u oba slučaja ksiloza nije potrošena do kraja tj. na kraju fermentacije pomoću *K. marxianus* iznosila je $\gamma_K = 3,580 \pm 0,075$ g/L, dok u procesu u kojem je korišten kvasac *C. krusei* $\gamma_K = 7,013 \pm 0,416$ g/L. Pokazatelji uspješnosti procesa prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Pokazatelji uspješnosti jednostupanjske šaržne fermentacije glukoze i ksiloze provedene s kvascem *K. marxianus* i *C. krusei*

Kvasac	Y_P , g/L	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
<i>K. marxianus</i>	3,403±1,561	0,150±0,069	29,365±13,470	0,117±0,054
<i>C. krusei</i>	2,754±0,084	0,118±0,004	23,214±0,708	0,019±0,001

Uspoređujući produktivnost oba procesa, produktivnost procesa znatno je veća kada je u procesu fermentacije korišten kvasac *K. marxianus* ($Pr = 0,117 \pm 0,054$ g/(L·h)) u odnosu na proces fermentacije u kojem je korišten kvasac *C. krusei* ($Pr = 0,019 \pm 0,001$ g/(L·h)), što ga čini boljim izborom u proizvodnji bioetanol. Međutim, u usporedbi s kvascem *S. cerevisiae* [28], obje postignute produktivnosti su niske. Budući da je cilj proizvodnje bioetanol razviti ekonomski isplativ proces, odnosno proizvesti visoku koncentraciju bioetanol u kratkom vremenu, s obzirom na produktivnost, može se zaključiti da niti jedan od izoliranih kvasaca nije zadovoljavajući.

Iako u procesu nisu nastale zadovoljavajuće količine bioetanol, dodatno su ispitane koncentracije glicerola i 2,3-butandiola, kao vrijednih sirovina. U Tablici 12. prikazani su dobiveni rezultati.

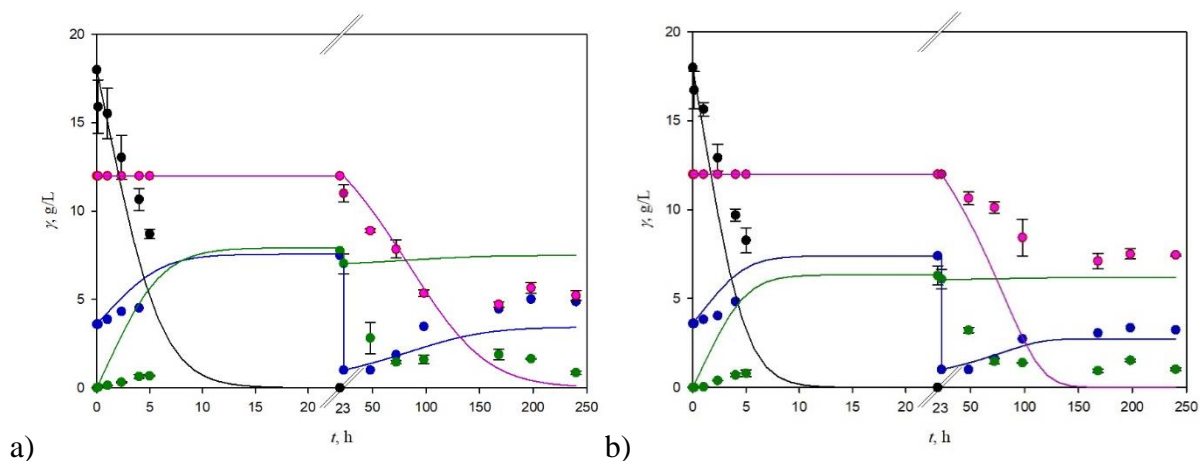
Tablica 12. Koncentracije nastalog glicerola i 2,3-butandiola fermentacijom hranjivih podloga koje sadrže glukozu i ksilozu provedene s kvascem *K. marxianus* i *C. krusei*

Kvasac	γ_{GL} , g/L	γ_{BT} , g/L
<i>K. marxianus</i>	2,948±1,516	0,547±0,367
<i>C. krusei</i>	0,360±0,047	1,330±0,011

Kao što je vidljivo, fermentacijom šećera u hranjivoj podlozi kvascem *K. marxianus* dobivaju se veće količine glicerola, dok se fermentacijom šećera kvascem *C. krusei* dobivaju veće količine 2,3-butandiola kao industrijski zanimljivih spojeva. Daljnjim optimiranjem procesnih uvjeta potencijalno bi se mogle povećati dobivene koncentracije koje će osigurati ekonomski opravdanu proizvodnju obaju spojeva.

4.5.2. Dvostupanjska fermentacija

S obzirom na dobivene rezultate i nisku produktivnost bioetanola, u posljednjem koraku provedena je dvostupanjska fermentacija modelne otopine šećera (18 g/L glukoze i 12 g/L ksiloze). U prvom stupnju je provedena fermentacija glukoze pomoću kvasca *S. cerevisiae*. Nakon što je koncentracija glukoze pala na 0 g/L, kvasac *S. cerevisiae* je uklonjen iz smjese u koju je potom dodan kvasac *K. marxianus* i *C. krusei* čime je započeo drugi stupanj fermentacije tj. fermentacija ksiloze. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 16. i u Tablici 13..



Slika 16. Promjena koncentracija glukoze (●), ksiloze (●), bioetanola (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa dvostupanjske fermentacije 18 g/L glukoze i 12 g/L ksiloze kvascima a) *S. cerevisiae* i *K. marxianus* i b) *S. cerevisiae* i *C. krusei*

Kao što je vidljivo iz rezultata pokusa, kvasac *S. cerevisiae* troši samo glukozu, a većina je potrošena unutar prvih 10 h provedbe procesa. U oba pokusa, koncentracija biomase rasla je prvih 5 h zbog otopljenog kisika u podlozi, a nakon tog vremena, rast je značajno usporen. U periodu rasta biomase, proizvodnja bioetanola bila je niska. Nakon potrošnje kisika, kada je započelo alkoholno vrenje, i koncentracija bioetanola značajno je porasla. Maksimalne koncentracije etanola zabilježen u oba procesa bile su slične i iznosile su $\gamma_E =$

7,751±0,001 g/L odnosno $\gamma_E = 6,293 \pm 0,538$ g/L. U Tablici 13. prikazani su pokazatelji uspješnosti procesa.

Tablica 13. Pokazatelji uspješnosti dvostupanjske šaržne fermentacije glukoze provedene kvascima *S. cerevisiae* i *K. marxianus* te *S. cerevisiae* i *C. krusei*

Kvasci	Y_P , g/L	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
<i>S. cerevisiae</i> i <i>K. marxianus</i>	7,751±0,001	0,431±0,001	84,431±0,001	0,337±0,001
<i>S. cerevisiae</i> i <i>C. krusei</i>	6,293±0,538	0,350±0,030	68,555±5,861	0,274±0,023

Nakon potrošnje glukoze, pokusi su prekinuti na način da je iz podloge centrifugiranjem uklonjen kvasac *S. cerevisiae*. U jednu podlogu je tada dodan kvasac *K. marxianus*, dok je u drugu dodan kvasac *C. krusei*. Na taj način je započet drugi stupanj fermentacije odnosno fermentacija ksiloze. Kao što je vidljivo iz rezultata, oba kvasca troše ksilozu, a u početku svakog procesa, potrošnja ksiloze prati rast biomase. Uspoređujući koncentraciju biomase oba kvasca, kao što su pokazala prethodna istraživanja, više biomase je nastalo u procesu u kojem je korišten kvasac *K. marxianus*. Koncentracija bioetanola u oba procesa smanjivala se u vremenu u oba procesa. Razlog tome je vjerojatno potrošnja bioetanola kao supstrata za nastanak novih spojeva. Iako su oba procesa nepovoljna za proizvodnju bioetanola, u drugom stupnju fermentacije zabilježen je nastanak 2,3-butandiola i glicerola. Dobivene koncentracije prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Koncentracije nastalog glicerola i 2,3-butandiola u drugom stupnju fermentacije hranjivih podloga koje sadrže glukozu i ksilozu

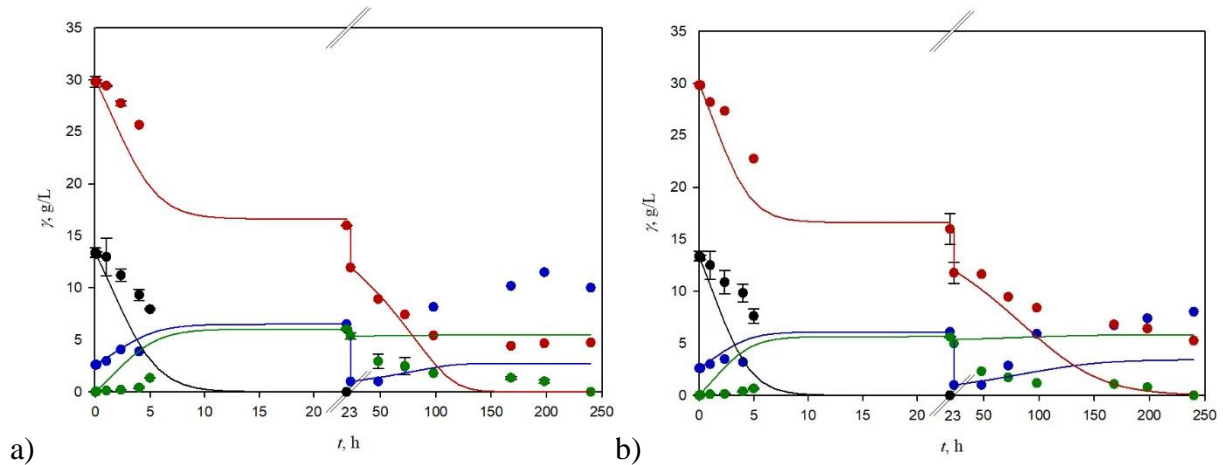
Kvasac	γ_{GL} , g/L	γ_{BT} , g/L
<i>K. marxianus</i>	2,446±0,504	0,608±0,062
<i>C. krusei</i>	1,739±0,074	0,909±0,308

Dobiveni rezultati pokazuju potencijal proizvodnje bioetanola i ostalih industrijski zanimljivih spojeva fermentacijom glukoze i ksiloze dvostupanjskom procesu. Naime, ako se

u prvom stupnju, uz uklanjanje kvasca ukloni i dobiveni bioetanol, a proizvodnja drugih vrijednih sirovina nastavi u drugom stupnju moguće je razviti održiv proces.

4.6. Dvostupanjska fermentacija hidrolizata pivskog tropa

Nakon provedene dvostupanjske fermentacije modelne otopine, provedena je dvostupanjska fermentacija hidrolizata pivskog tropa. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 17.



Slika 17. Promjena koncentracija glukoze (●), ukupnih šećera (●), bioetanola (●) i biomase (●) opisane pomoću matematičkog modela (—) tijekom procesa dvostupanjske fermentacije kiselinskog hidrolizata pivskog tropa kvascima a) *S. cerevisiae* i *K. marxianus* b) *S. cerevisiae* i *C. krusei*

Kao što je vidljivo iz rezultata pokusa, potrošnja ukupnih šećera se u oba slučaja podudara s ukupnom potrošnjom glukoze s obzirom na to da *S. cerevisiae* ne fermentira ostale šećere prisutne u hidrolizatu (pentoze, arabinozu i ksilozu). U oba pokusa, koncentracija biomase rasla je prvih 5 h zbog otopljenog kisika u podlozi, a nakon tog vremena, rast je značajno usporen. U periodu rasta biomase, proizvodnja bioetanola bila je niska. Nakon potrošnje kisika, kada je započelo alkoholno vrenje, i koncentracija bioetanola značajno je porasla. Maksimalne koncentracije etanola zabilježene u oba procesa bile su slične i iznosile su $\gamma_E = 6,024 \pm 0,326$ g/L u procesu u kojem su korišteni kvasci *S. cerevisiae* i *K. marxianus* odnosno $\gamma_E = 5,632 \pm 0,193$ g/L u procesu u kojem su korišteni kvasci *S. cerevisiae* i *C. krusei*. Uspoređujući koncentracije nastalog bioetanola s dobivenim koncentracijama u pokusima s modelnom otopinom, može se uočiti da je nastala koncentracija bioetanola manja, ali učinkovitost i stupanj konverzije supstrata u produkt veće kada je hidrolizat pivskog tropa bio supstrat. Razlog višim nastalim koncentracija bioetanola prilikom fermentacije modelnih

otopina leži u činjenici da su modelne otopine sadržavale više glukoze nego hidrolizat pivskog tropa, te je kvasac posljedično tome mogao i proizvesti više bioetanola. Naime, modelne otopine su napravljene prema prethodno dobivenim rezultatima [28] sastava hidrolizata pivskog tropa ($\gamma_G = 18$ g/L), dok je naknadno testiranje pokazalo da hidrolizat sadrži znatno manje glukoze ($\gamma_G = 13,50$ g/L). Pretpostavka je da je s vremenom došlo do potrošnje glukoze u skladištenom uzorku. U Tablici 15. prikazani su pokazatelji uspješnosti procesa.

Tablica 15. Pokazatelji uspješnosti šaržne fermentacije pivskog tropa provedene kvascem *S. cerevisiae*

Kvasci	Y_P , g/L	$Y_{P/S}$, g/g	E , %	Pr , g/(L·h)
<i>S. cerevisiae</i> i <i>K. marxianus</i>	6,024±0,326	0,451±0,024	88,350±4,776	0,262±0,014
<i>S. cerevisiae</i> i <i>C. krusei</i>	5,632±0,193	0,421±0,014	82,589±2,830	0,245±0,008

Fermentacijom hidrolizata pivskog tropa također je zabilježen nastanak glicerola i 2,3-butandiola, a njihove koncentracije prikazane su u Tablici 16..

Tablica 16. Koncentracije nastalog glicerola i 2,3-butandiola u drugom stupnju fermentacije pivskog tropa

Kvasac	γ_{GL} , g/L	γ_{BT} , g/L
<i>K. marxianus</i>	1,674±0,283	1,710±0,043
<i>C. krusei</i>	0,999±0,262	1,019±0,022

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Fermentacija u kontinuiranom membranskom reaktoru nije rezultirala povećanjem učinkovitosti i produktivnosti procesa u usporedbi sa šaržnom fermentacijom i šaržnom fermentacijom s dotokom supstrata
- Najveći stupanj konverzije supstrata u produkt, učinkovitost i produktivnost ($Y_{P/S} = 0,093 \pm 0,006$ g/g, $E = 18,194 \pm 1,278$ %, $Pr = 0,141 \pm 0,009$ g/(L·h)) dobiveni su za fermentaciju provedenu sa kvascem *K. marxianus* za početnu koncentraciju glukoze 5 g/L glukoze.
- Šaržnom fermentacijom ksiloze s kvascem *K. marxianus* produktivnost procesa je bila vrlo niska, ali su proizvedene značajne koncentracije 2,3-butandiola ($\gamma_{BT} = 0,412 \pm 0,018$ g/L) u pokusu u kojem je početna koncentracija ksiloze bila 10 g/L .
- Šaržnom fermentacijom glukoze s kvascem *C. krusei* produktivnost procesa je također bila vrlo niska, a najveća učinkovitost procesa postignuta je fermentacijom hranjive podloge s 5 g/L glukoze
- Šaržnom fermentacijom ksiloze s kvascem *C. krusei* nije proizveden bioetanol, ali su u procesu zabilježene značajne koncentracije 2,3-butandiola, $\gamma_{BT} = 1,860 \pm 0,044$ g/L i to prilikom fermentacije 20 g/L ksiloze.
- U jednostupanjskom procesu fermentacije modelne otopine glukoze i ksiloze koncentracija bioetanol rasla je ovisno o potrošenoj glukozi, a maksimalna vrijednost postignuta je, fermentacijom šećera kvascem *K. marxianus* nakon 29 h ($\gamma_E = 3,403 \pm 1,561$ g/L), a dok je u proces s *C. krusei* postignuta nakon 144 h ($\gamma_E = 2,754 \pm 0,084$ g/L).
- Uspoređujući produktivnost jednostupanjskih procesa, produktivnost procesa znatno je veća kada je u procesu fermentacije korišten kvasac *K. marxianus* ($Pr = 0,117 \pm 0,054$ g/(L·h)) u odnosu na proces fermentacije u kojem je korišten kvasac *C. krusei* ($Pr = 0,019 \pm 0,001$ g/(L·h)), što ga čini boljim izborom u proizvodnji bioetanol.
- U dvostupanjskoj fermentaciji modelne otopine šećera (18 g/L glukoze i 12 g/L ksiloze), pri čemu je u prvom stupnju provedena fermentacija glukoze pomoću kvasca *S. cerevisiae*, a u drugom fermentacije ksiloze pomoću *K. marxianus* i *C. krusei*, maksimalne koncentracije etanola iznosile su $\gamma_E = 7,751 \pm 0,001$ g/L odnosno $\gamma_E = 6,293 \pm 0,538$ g/L.

- U dvostupanjskoj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa zabilježena je viša učinkovitost procesa i koeficijent konverzije supstrata u produkt, ali niža koncentracija bioetanolu u usporedbi s rezultatima fermentacije modelne otopine. Razlog tome je manja koncentracija glukoze u hidrolizatu pivskog tropa.

6. LITERATURA

[1] Dahman, Y., Syed, K., Begum, S., Roy, P., Mohtasebi, B., Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy, Woodhead Publishing, Cambridge, 2019., str. 277-325.

[2] Kumar, S., Kumar, R., Pandey, A., Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Waste Treatment Processes for Energy Generation, Elsevier, Amsterdam, 2019., str. 79-92.

[3] Tse, T.J., Wiens, D.J., Reaney, M.J.T., Production of Bioethanol-A Review of Factors Affecting Ethanol Yield, *Fermentation*, **7** (2021) 268.

<https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>

[4] Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S. Šantek, B., Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review, *Food Technol. Biotechnol.*, **56** (2018) 289-311.

<https://doi.org/10.17113%2Fftb.56.03.18.5546>

[5] Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B., Novi trendovi u proizvodnji bioetanolu kao goriva, *Kem. Ind.*, **65** (2015) 25-38.

<http://dx.doi.org/10.15255/KUI.2014.032>

[6] Ylittervo, P., Franzen, C.J., Taherzadeh, M.J., Continuous Ethanol Production with a Membrane Bioreactor at High Acetic Acid Concentrations, *Membranes*, **4** (2014) 372-387.

<https://doi.org/10.3390/membranes4030372>

[7] Tuong An Tran, T., Kim Phung Le, T., Phong Mai, T., Quan Nguyen, D., Alcohol Fuels - Current Technologies and Future Prospect, IntechOpen, London, 2020., str. 33-57.

[8] Amornraksa, S., Subsaipin, I., Simasatitkul, L., Assabumrungrat, S., Systematic design of separation process for bioethanol production from corn stover, *BMC Chem. Eng.* **2**, 10 (2020)

<https://doi.org/10.1186/s42480-020-00033-1>

[9] Ferreira, J.A., Agnihotri, S., Taherzadeh, M.J., Waste Biorefinery u: Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches, Cambridge, 2019., str. 25-52.

- [10] Galbe, M., Wahlberg, O., Zacchi, G., Environmental Biotechnology and Safety, Elsevier, Cambridge, 2011., str. 615-628.
- [11] Grba, S., Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji, Plejada, Zagreb, 2010., str. 141-145
- [12] Karim, A., Gerliani, N., Aider, M., *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology, *Int. J. Food Microbiol.*, **33** (2020) 108818.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
- [13] Petravić Tominac, V., Mrvčić, J., Šantek, B., Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina, *Glas. zašt. bilja*, **40** (2017) 24-33.
<https://doi.org/10.31727/gzb.40.5.3>
- [14] Ha-Tran, D.M., Nguyen, T.T.M., Huang, C.C., *Kluyveromyces marxianus*: Current State of Omics Studies, Strain Improvement Strategy and Potential Industrial Implementation, *Fermentation*, **6** (2020) 124.
<https://doi.org/10.3390/fermentation6040124>
- [15] Lane, M.M, Morrissey, J.P., *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow, *Fungal Biol. Rev.*, **24** (2010) 17-26.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>
- [16] Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, *Appl Microbiol Biotechnol*, **79** (2008) 339-354.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>
- [17] YMBD, Glycerol, <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00283> (pristup 16. veljače 2023.)
- [18] Suhaimi, S.N., Phang, L.Y., Maeda, T., Abd-Aziz, S., Wakisaka, M., Shirai, Y., Ali Hassan, M., Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* ss1, *Braz. J. Microbiol.*, **43** (2012) 506-516.
<https://doi.org/10.1590%2FS1517-83822012000200011>
- [19] YMBD, 2,3-butandiol, <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00283> (pristup 17. veljače 2023.)

[20] Kim, JW., Kim, J., Seo SO., Kim, K.H., Jin, YS., Seo, JH., , Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* through fine-tuning of pyruvate decarboxylase and NADH oxidase activities, *Biotechnol Biofuels*, **9** (2016) 265.

<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0677-9>

[21] Harvianto, G.R., Haider, J., Hong, J., Long, N.V.D., Shim,, JJ., Cho, M.H., Kim, W.K., Lee, M., . Purification of 2,3-butanediol from fermentation broth: process development and techno-economic analysis. *Biotechnol. Biofuels*.**11**, (2018) 18.

<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1013-3>

[22] Zwirzitz, A., Alteio, L., Sulzenbacher, D., Atanasoff, M., Selg, M., Ethanol Production from Wheat Straw Hydrolysate by *Issatchenkia Orientalis* Isolated from Waste Cooking Oil, *J. Fungi.*, 7 (2021) 121.

<https://doi.org/10.3390%2Fjof7020121>

[23] Yadav, J.S.S., Bezawada, J., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., *Candida krusei*:biotechnological potentials and concerns about its safety, *Can. J. Microbiol.* **58** (2012) 937-952.

<https://doi.org/10.1139/w2012-077>

[24] MSG ERC, *Candida krusei*, <https://drfungus.org/knowledge-base/candida-krusei/> (pristup 12. ožujka 2023.)

[25] Rascón-Careaga, A., Corella-Madueño, M.A.G., Pérez-Martínez, C.J., García-Rojas, A.M., Souflé-Vaasquez, S.Z., García-Moroyoqui, M.T., Córdoba-Beltrán, L.J., Cádiz-Carrasco, M.G., García-Alegria, A.M., Validation and Estimation of Uncertainty for a Glucose Determination Method GOD-PAP Using a Multi-calibrator as Reference, *MAPAN*, 36 (2021) 269-278.

<https://doi.org/10.1007/s12647-021-00441-5>

[26] Warwick L. Marsden, Peter P. Gray, Greg J. Nippard and Mark R. Quinlan, Evaluation of the DNS Method for Analysing Lignocellulosic Hydrolysates, *J. Chem. Tech. Biolechnol.* **32** (1982) 1016-1022.

<https://doi.org/10.1002/jctb.5030320744>

[27] Findrik, Z., Studij reakcija kataliziranih oksidazama aminokiselina, Doktorska disertacija, Zagreb, 2006

[28] Božinović, M., Vičević, R., Zekić, N., Proizvodnja bioetanola iz enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog tropa, Istraživački rad nagrađen Rektorovom nagradom, Zagreb, 2022.

[29] Novak, M., Trontel, A., Pavelčić, M., Mušak, L., Govedarica, D., Lauder, A., Ivančić, F., Šantek, B., Anaerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 12 (2017) 60-70.

[30] Foutch, G.L.; Johannes, A.H., Reactors in Process Engineering, u: Meyers, R.A., Encyclopedia of Physical Science and Technology, Academic Press, Cambridge, 2003., str. 23-34.

<https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00654-2>

[31] Ghose, T.K., Tyagi, R. D., Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 1401–1420.

[32] Galluci, F., Basile, A., Hai, F.I., Introduction – A review of membrane reactors, u: Membranes for membrane reactors: preparation, optimization and selection, Wiley, Hoboken, 2011., str. 1-61.

[33] Mo, W., Wang, M., Zhan, R., Yu, Y., He, Y., Lu, H., *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways, *Biotechnol. Biofuels.* **12**, 63 (2019).

<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1393-z>

[34] Dasgupta, D., Kurmi, A.K., Adhikari, D.K., Ghosh, D., Xylitol production from lignocellulosic pentosas using *Kluyveromyces marxianus*: kinetic modelling of yeast growth and fermentation, *Biofuels*, **11** (2020) 309-319.

7. POPIS SIMBOLA

Simboli

c	množinska koncentracija (mol/L)
E	učinkovitost (%)
K_s	konstanta zasićenja supstratom (g/L)
m	masa (g)
Pr	produktivnost (g/(L·h))
t	vrijeme provedbe reakcije (h)
Y_P	prinos produkta (g/L)
$Y_{P/S}$	koeficijent iskorištenja produkta na supstratu (g/g)

Grčka slova

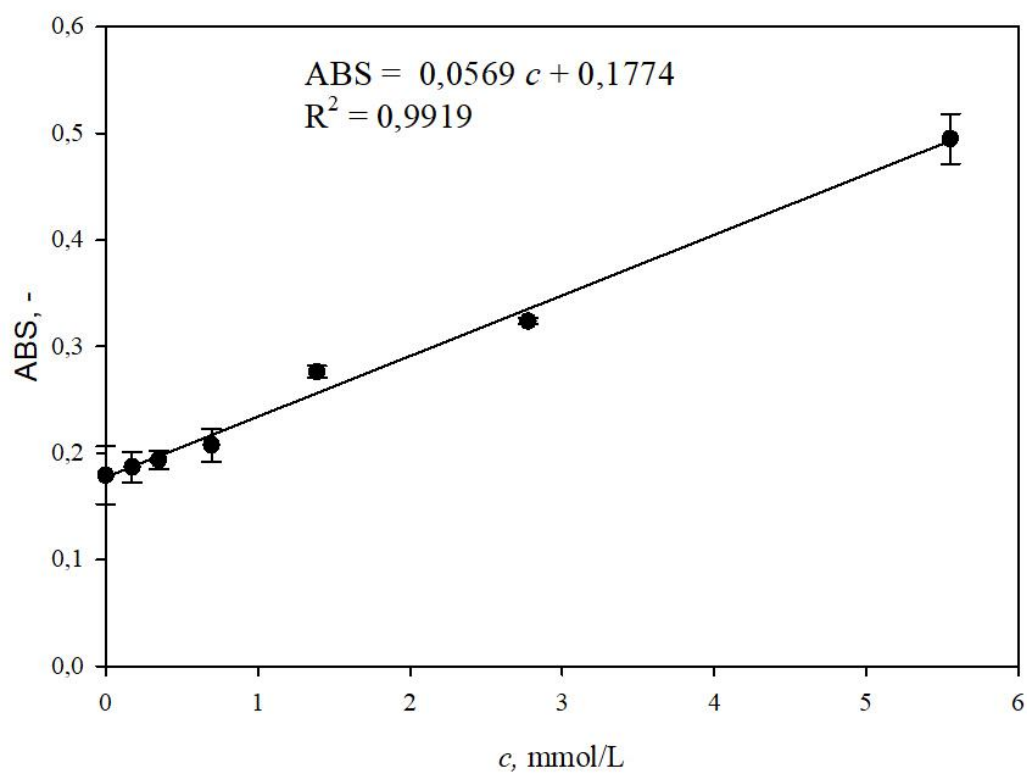
q	volumni protok (L/h)
γ	masena koncentracija (g/L)
λ	valna duljina (nm)
μ	specifična brzina rasta biomase (1/h)
μ_{\max}	maksimalna specifična brzina rasta biomase (1/h)
τ	vrijeme zadržavanja (h)

Skraćenice

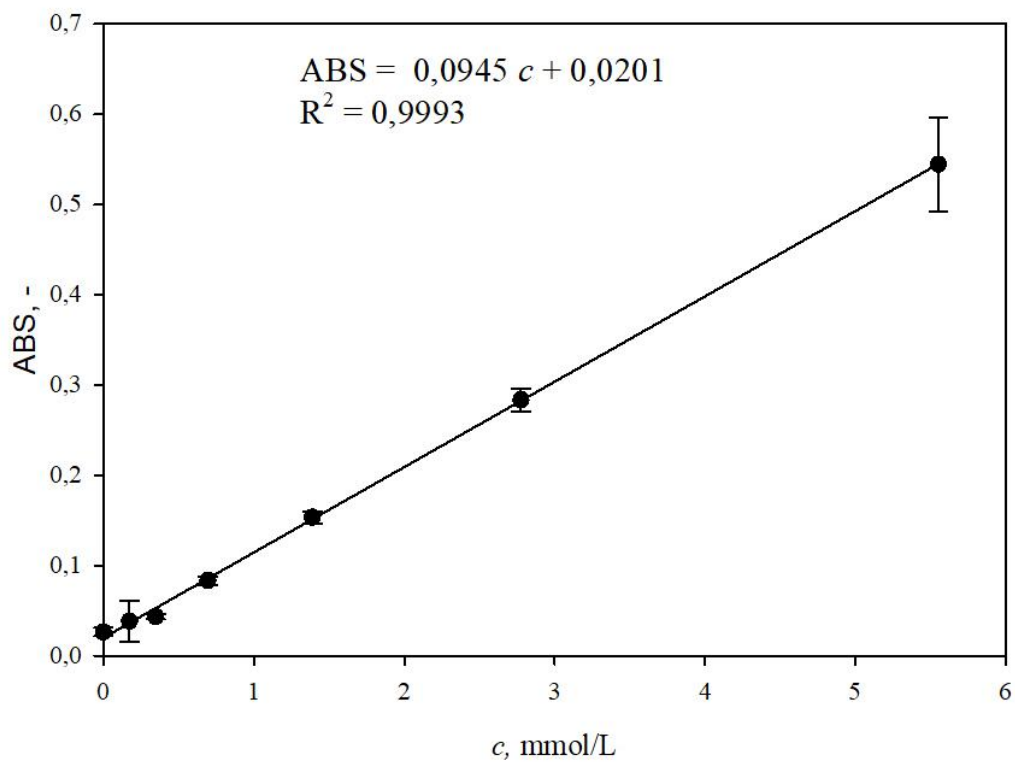
BT	2,3-butandiol
E	etanol
G	glukoza
GC	plinski kromatograf
GL	glicerol
K	ksiloza
P	produkt
PAP	4-amino-fenazonom
S	supstrat
X	biomasa

8. PRILOZI

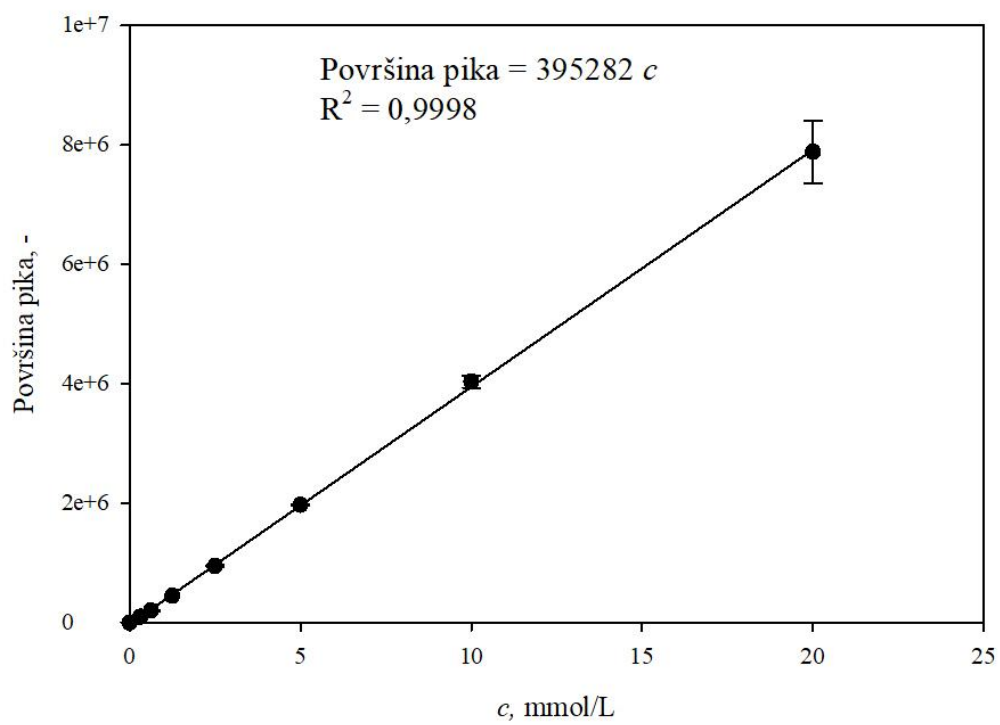
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze



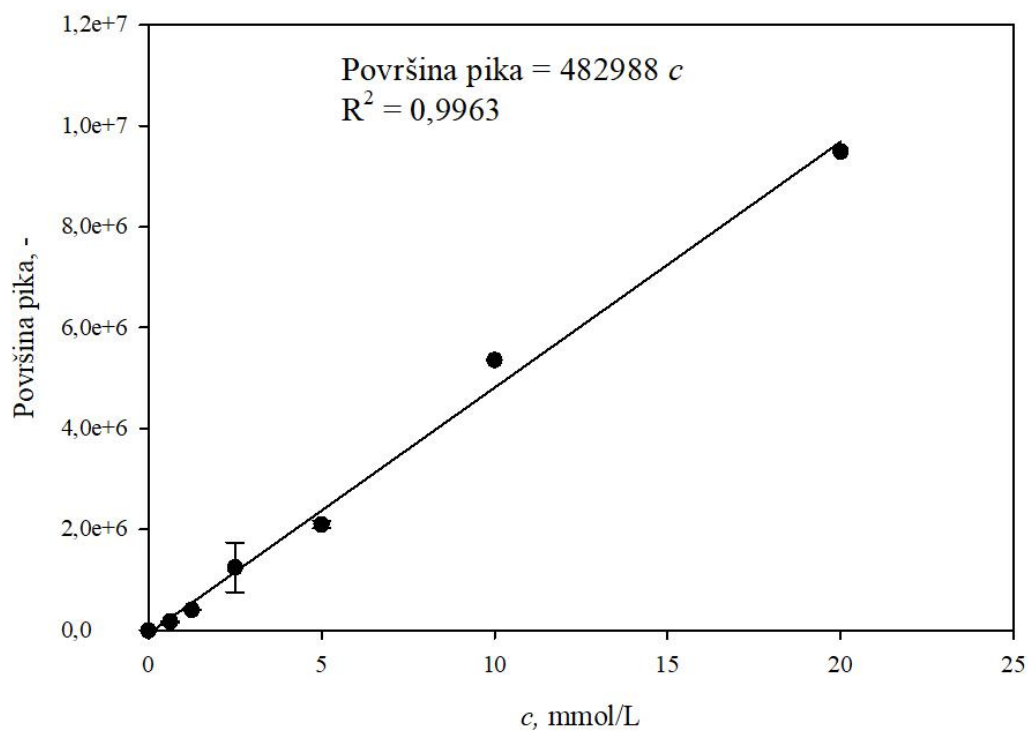
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih šećera



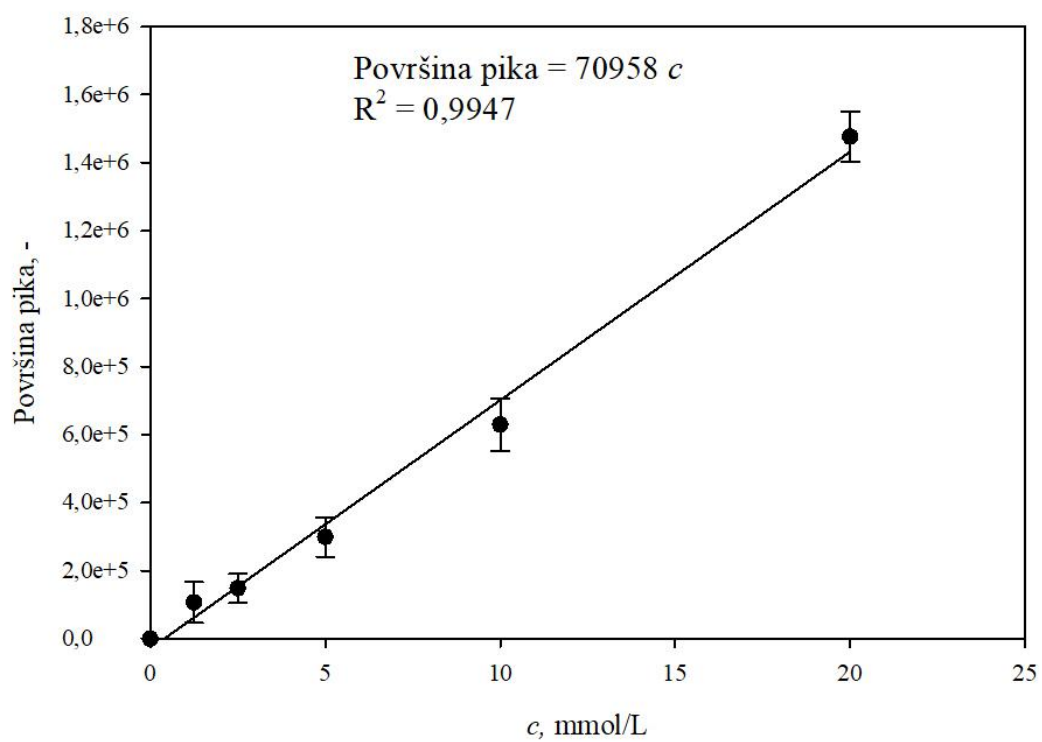
Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola



Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije 2,3-butandiola



Prilog 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola



Prilog 6. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje parametara modificirane Monodove kinetike

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: X, G, E
```

```
Params: Ks, mimax
```

```
mi=mimax*G/(Ks+G)*(1-E/E1)
```

```
X'=mi*X
```

```
G'=-mi*X/yxg
```

```
E'=mi*X/yxe
```

```
t=0
```

```
x=1
```

```
G= 20
```

```
E=0
```

```
mimax=0.064
```

```
Ks=2.095
```

```
yxg= 0.068
```

```
yxe= 0.786
```

```
E1=18.002
```

```
***
```

Prilog 7. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje parametara modificirane Monodove kinetike

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: X, K, E
```

```
Params: Ks, mimax
```

```
mi=mimax*K/(Ks+K)*(1-E/E1)
```

```
X'=mi*X
```

```
K'=-mi*X/yxk
```

```
E'=mi*X/yxe
```

```
t=0
```

```
x=1
```

```
K= 5
```

```
E=0
```

```
mimax=0.022
```

```
Ks=2.993
```

```
yxk= 0.208
```

```
yxe= 16.001
```

```
E1=18.002
```

```
***
```

Prilog 8. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje parametara modificirane Monodove kinetike pivskog tropa

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: X, G, E, U
```

```
Params: mimax
```

```
mi=mimax*G/(Ks+G)*(1-E/E1)
```

```
X'=mi*X
```

```
G'=-mi*X/yxg
```

```
E'=mi*X/yxe
```

```
U'=-mi*X/yxg
```

```
t=0
```

```
X=2.4
```

```
G=12
```

```
E=0
```

```
U=30
```

```
mimax=0.500
```

```
Ks=12.606
```

```
yxg= 0.292
```

```
yxe=0.647
```

```
E1=18.002
```

```
***
```

Prilog 9. Ispis koda iz programskog paketa SCIENTIST korišten za određivanje parametara modificirane Monodove kinetike u membranskom reaktoru

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: X, G, E
```

```
Params: Ks, mimax
```

```
mi=mimax*G/(Ks+G)*(1-E/E1)
```

```
X'=mi*X-kd*X
```

```
G'=(G0-G)/τ -mi*X/yxg
```

```
E'=-E/τ+*mi*X/yxe
```

```
t=0
```

```
x=1
```

```
G= 5
```

```
E=0
```

```
mimax=0.5
```

```
Ks=12.606
```

```
yxg= 0.206
```

```
yxe=0.809
```

```
E1=18.002
```

```
***
```

ŽIVOTOPIS

Renata Vičević [REDACTED] Preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisala je 2017. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a završava ga 2021. godine. Iste godine upisuje diplomski studij Kemijskog inženjerstva na istom Fakultetu, modul Kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša. Stručnu praksu odradila je na NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“. Od 2020. godine aktivna je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera te obavlja ulogu demonstratora na kolegiju Stručna praksa. S posterskim priopćenjima „Dinamičko raspršenje svjetlosti: raspodjela veličine i zeta potencijal nanočestica TiO₂ u različitim matricama” i „Ekstrakcija enzima *endo*-1,4-ksilanaza” sudjelovala je na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera te s posterskim priopćenjem „Liquid-liquid extraction of *endo*-1,4- xylanase in a microextractor“ na 2. međunarodnoj studentskoj GREEN konferenciji. Dobitnica je Rektorove nagrade za timski znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2021./2022. za rad: „Proizvodnja bioetanol iz enzimskog i kiselinskog hidrolizata pivskog tropa“. Koautorica je članka Intensification of *endo*-1,4-Xylanase Extraction by Coupling Microextractors and Aqueous Two-Phase System u časopisu *Processes*. Od ožujka do rujna 2023. radila je kao student istraživač na nizozemskom institutu Wetsus - European centre of excellence for sustainable water technology na projektu „Development of new biological desulfurization processing schemes“. Tijekom studija položila je C1.1 certifikat iz engleskog jezika i B2 iz talijanskog jezika.