

Utjecaj dodatka melase na kinetiku alkoholne fermentacije sirutke s pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus*

Damir Stanzer, Slobodan Grba, Vesna Stehlik-Tomas, Jasna Mrvčić

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.344.8

Sažetak

*U ovom radu praćena je kinetika alkoholne fermentacije pomoću kvasca **Kluyveromyces marxianus** ZIM 75 na podlogama sastavljenim od sirutke i melase. Fermentacije su provedene u statičkim i semiaerobnim uvjetima na temperaturi 34 °C, a za pripravu podloga korištene su deproteinizirana sirutka i melasa miješane u različitim omjerima tako da je ukupna koncentracija šećera u podlogama bila 5%, 10% i 15%.*

Provedeni pokusi pokazali su da je podloga koja je sadržavala 10% šećera (saharoza : laktoza = 1:1) optimalna za provođenje fermentacija u statičkim i u semiaerobnim uvjetima. Najbolji prinos etanola u statičkim uvjetima nakon 24 sata fermentacije iznosio je 4,05 % (V/V) dok je u semiaerobnim uvjetima iznosio 4,9 % (V/V). Prirast biomase također je bio bolji u semiaerobnim uvjetima i iznosio je 7,78 g s.tv./L, dok je u statičkim uvjetima prirast biomase iznosio je 3,19 g s.tv./L.

*Ključne riječi: **Kluyveromyces marxianus**, sirutka, melasa, alkoholna fermentacija*

Uvod

Etanol proizveden mikrobnim postupkom danas se koristi u velikim količinama za proizvodnju alkoholnih napitaka, goriva te za upotrebu u farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Osim etanola, kao sekundarni produkt proizvodi se i kvašćeva biomasa koja također predstavlja vrijedan proizvod a upotrebljava se kao prehrambeni ili krmni kvasac.

Do nedavno, glavni supstrat u podlogama za proizvodnju alkohola i kvašćeve biomase bila je melasa, ali zbog smanjenja njene ponude na tržištu i zbog sve veće cijene, u posljednje vrijeme znanstvenici sve više razmatraju mogućnost uvođenja novih sirovina u industrijske pogone za proizvodnju kvašćeve biomase i etanola s odabranim biotehnološkim procesima (Parrondo i sur. 2000., Kourkoutas i sur., 2000.). Sirutka je jedna od

alternativnih sirovina čija se mogućnost primjene za proizvodnju alkohola i kvaščeve biomase sve više istražuje (Zalashko i sur. 1998, Stanzer i sur., 2002.).

Sirutka je glavni nusprodukt industrije mlijeka, a dobiva se u tehnološkom procesu proizvodnje sira ili kazeina pri čemu samo 10-20 % mlijeka ostaje u proizvodu, a 80-90 % odlazi u sirutku (Popović-Vranješ i Vujičić 1997.). Zbog toga je sirutka vrlo bogat supstrat za uzgoj mikroorganizama (laktoza, mineralne tvari, vitamini) bilo za dobivanje mikrobne biomase ili za proizvodnju mikrobnih metabolita kao što je etanol.

Posebno je važno istaknuti da velike količine industrijski proizvedene neobrađene sirutke, zbog svoje visoke potrebe za kisikom BOD (biological oxygen demand: $35 \cdot 10^9 - 40 \cdot 10^9 \text{ kg/m}^3$), uzrokuju velike probleme zagađenja okoliša ako se ispuštaju izravno u vodotokove ili u postrojenja za obradu otpadnih voda (Christian-Urbina i sur. 2000.). Stoga je proizvodnja alkohola i kvaščeve biomase na sirutki jedan od vrlo značajnih načina prerade sirutke.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koji se tradicionalno koristi u proizvodnji etanola i kvaščeve biomase na melasi, zbog nedostatka gena za proizvodnju enzima β -D-galaktozidaze, koji hidrolizira laktozu na glukozu i galaktozu, za svoj rast na sirutki zahtjeva prethodnu obradu laktoze enzimnim preparatima (Szczo drak i sur., 2000.). Druga mogućnost je korištenje genetički izmijenjenih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji su transformirani tako da posjeduju gen za proizvodnju β -D-galaktozidaze (Tahoun i sur., 1999). Međutim, iako nema puno mikroorganizama koji mogu koristiti laktozu kao supstrat za proizvodnju mikrobne biomase s visokim prinosima i bez proizvodnje bilo kakvih toksina, u literaturi se sve više susreću radovi o proizvodnji etanola i biomase s pomoću drugih mikroorganizama kojima metabolički sustav omogućuje direktno korištenje sirutke bez prethodne hidrolize laktoze (Grba i sur., 2002., Parrondo i sur., 2000., Cristiani-Urbina i sur., 2000.).

Mikroorganizam koji se najčešće koristi u procesima fermentacije sirutke je kvasac *Kluyveromyces marxianus*. Iako je biomasa kvasca *Kluyveromyces marxianus* proizvedena na sirutki manje cijenjena od biomase kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, sredinom prošlog stoljeća proradila su prva postrojenja za proizvodnju kvaščeve biomase na sirutki s tim kvascem. Osnovni nedostatak procesa je velika potreba za energijom koja je nužna za koncentriranje i pročišćavanje proizvoda budući da su zbog niske

koncentracije laktoze u sirutki (4-5%) prinosi biomase i etanola te produktivnost procesa niski. Stoga znanstvenici pokušavaju selekcijom sojeva, razvojem bioreaktora te optimiranjem procesa razviti nove tehnologije pogodne za industrijsku primjenu. Grba i sur. (2002.) proveli su alkoholnu fermentaciju s kvascima *Kluyveromyces marxianus* VST 44 i *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 i utvrdili da ti sojevi pokazuju zadovoljavajuću kinetiku rasta mikrobne biomase i proizvodnje etanola, a produktivnost procesa je zadovoljavajuća u industrijskoj primjeni. Christiani-Urbina i sur., (2000.) navode mogućnost proizvodnje kvašćeve biomase pomoću mješovite kulture kvasaca *Torulopsis cremoris* i *Candida utilis* na sirutki kao supstratu dok Brady i sur. (1994.) navode mogućnost unapređenja procesa i povećanja koncentracije etanola korištenjem koncentrata sirutke. U svakom slučaju, ispuštanje sirutke u sustave za biološku obradu otpadnih voda predstavlja značajan gubitak sirovine, a upravo razvoj novih tehnologija za korištenje agroindustrijskog otpada predstavlja poseban izazov u biotehnologiji.

Međutim, iako sirutka predstavlja bogat supstrat za uzgoj mikroorganizama melasa je još uvijek primarna sirovina za industrijsku proizvodnju alkohola i prehrambenog kvasca. Melasa sadrži organske spojeve te bitne tvari rasta koje mikroorganizmi mogu asimilirati. Bogata je spojevima s dušikom te mineralima, osobito kalijem, kojih u sirutki nema dovoljno. Furlan i sur., (2001.) uočili su pozitivan utjecaj sastojaka melase na brzinu sinteze enzima β -D-galaktozidaze pomoću *Kluyveromyces marxianus*. Brzina sinteze bila je znatno viša nego na podlozi sa sirutkom. Imajući u vidu bogat kemijski sastav melase te prednosti sirutke kao supstrata s ekonomskog gledišta, svrha ovog rada bila je istražiti mogućnost fermentacije kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 na podlozi sastavljenoj miješanjem sirutke i melase te odabrati uvjete pri kojima se postižu najbolji prirasti biomase i prinosi etanola.

Materijali i metode

Za obavljanje šaržnog procesa proizvodnje etanola i biomase na miješanoj podlozi sastavljenoj od sirutke i melase korišten je soj kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM75 uzet iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Radni mikroorganizam čuvan je u hladnjaku na +4°C na kosoj podlozi (YM) sastava (u g/L): laktoza – 20, bakti pepton – 10, kvašćev ekstrakt – 5, agar – 20. Radi umnažanja, mikrobna kultura je s kose podloge precijepljena u

epruvete s 10 mL tekuće podloge YM te inkubirana u termostatu na 34 °C tijekom 24 sata .

Za pripremu podloga u svim pokusima korištena je suha deproteinizirana sirutka iz mljekare "Lura" d.d iz Bjelovara koja je sadržavala 84% (w/w) laktoze, te melasa šećerne repe iz tvornice alkohola i kvasca "Badel" d.d. iz Seseveta. Melasa je sadržavala 50% saharoze, a prije upotrebe je prokuhana i centrifugirana. Sastav podloga u kojima je praćena kinetika alkoholne fermentacije, prikazan je u tablici 1.

Tablica 1: Sastav podloga za fermentaciju s kvascem *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75

Table 1: The contents of media for the fermentation by *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75

Podloga Medium	Sastojci Compounds	Masena koncentracija (g/L) Concentration (g/L)		
Podloga E1 Medium E1	Laktoza/Lactose	50	100	150
	Saharoza/Sucrose	0	0	0
	Kvašćev ekstrakt/ Yeast extract	5	5	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	2	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	1	1
Podloga E2 Medium E2	Laktoza/Lactose	25	50	75
	Saharoza /Sucrose	25	50	75
	Kvašćev ekstrakt/ Yeast extract	5	5	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	2	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	1	1
Podloga E3 Medium E3	Laktoza/Lactose	0	0	0
	Saharoza/ Sucrose	50	100	150
	Kvašćev ekstrakt/ Yeast extract	5	5	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	2	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	1	1

Fermentacije u statičkim uvjetima provedene su u termostatu u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL (korisni volumen 200 mL) na 34°C tijekom 24 sata, a fermentacije u semiaerobnim uvjetima također u tikvicama od 500 mL (korisni volumen 200 mL) na rotacijskoj tresilici (150°/min) u termostatiranoj prostoriji na 34 °C tijekom 24 sata. Početna koncentracija biomase bila je oko 2 g/L.

Biomasa kvasca određivana je centrifugiranjem alikvota od 10 mL (10 min, 4000 o/min) i vaganjem nakon sušenja pri temperaturi 105°C do konstantne mase, a količina alkohola metodom po Martin-Dietrich-u (Kretschmar, 1995.).

Maksimalna specifična brzina rasta izračunata je prema izrazu:

$$\mu_{\max} [\text{h}^{-1}] = (\ln X_2 - \ln X_1) / t_2 - t_1$$

X_1 i X_2 – koncentracija biomase na početku, odnosno na kraju eksponencijalne faze rasta

t_1 i t_2 – vrijeme na početku, odnosno na kraju eksponencijalne faze rasta

Stupanj konverzije supstrata u produkt izračunat je prema izrazu:

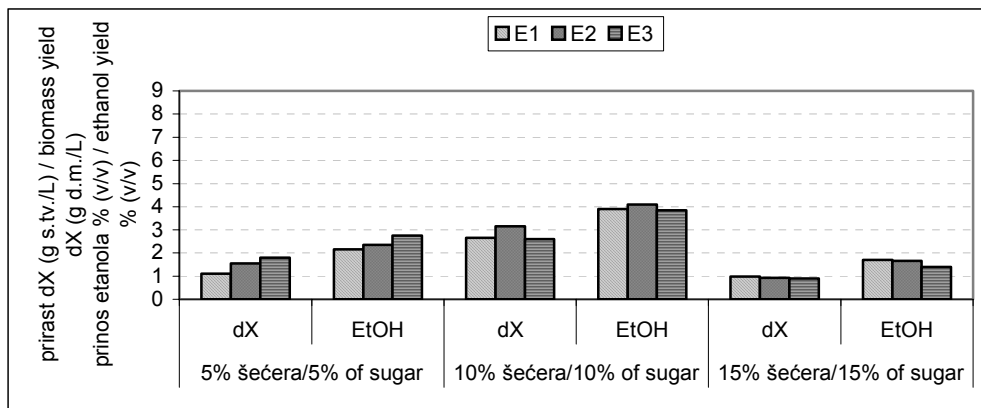
$Y_{P/S} [\text{g/g}] = \text{koncentracija etanola na kraju procesa} / \text{koncentracija šećera u podlozi}$

Rezultati i rasprava

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* kao i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* pripada grupi fakultativno anaerobnih mikroorganizama, međutim za razliku od kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kojeg se u aerobnim uvjetima samo 10 % energije pribavlja respiracijom, kod kvasca *Kluyveromyces marxianus* respiracija prevladava nad fermentacijom, pa suprotno kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, pripada skupini Crabtree-negativnih kvasaca tj. ne pokazuje svojstvo represije respiracije glukozom pa se proizvodnja alkohola odvija u ovisnosti o aerobnosti procesa (Gonzalez i sur., 1996.).

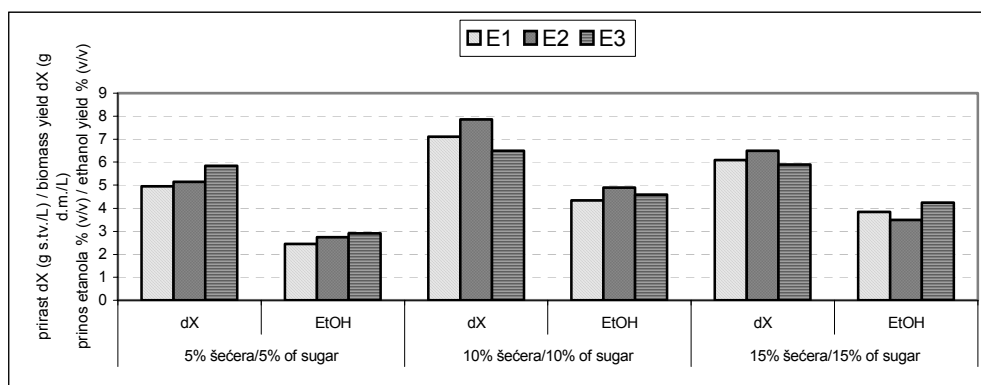
Prirast biomase te koncentracije etanola dobivene u šaržnom uzgoju kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 u statičkim i semiaerobnim uvjetima na miješanim podlogama sastavljenim od sirutke i melase s ukupnim koncentracijama šećera 5%, 10% i 15% pokazuju slike 1 i 2.

Prirast biomase, za sve podloge, očekivano je znatno bolji u semiaerobnim uvjetima, dok je u statičkim uvjetima uzgoja prirasti biomase znatno niži. Najbolji prirast biomase u statičkim uvjetima uzgoja nakon 24 sata iznosio je 3,19 g/L s.tv. dok je maksimalni prirast u semiaerobnim uvjetima iznosio 7,78 g/L s.tv. Otopljeni kisik te miješanje tijekom fermentacije pospješuju aktivnost kvaščeve biomase pa su tako i prinosi etanola bolji u semiaerobnim uvjetima rasta. Maksimalna koncentracija etanola bila je 4,9% (V/V) pri semiaerobnim te 4,05 (V/V) pri statičkim uvjetima rasta. I drugi autori navode važnost miješanja i protoka zraka na prinose biomase i etanola na podlogama koje sadrže laktozu kao supstrat. Tako su Stanzer i sur., (2002.) postigli maksimalni prinos biomase od 5,18 g/L s.tv u šaržnom uzgoju *Kluyveromyces marxianus* na podlozi s 10% laktoze



Slika 1: Utjecaj sastava podloge na prirast biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 i proizvodnju etanola u statičkim uvjetima (E_1 -saharoza, E_2 -saharoza + laktoza i E_3 -laktoza)

Figure 1: The influence of the media composition on the yield of biomass of *Kluyveromyces marxianus* ZIM75 and ethanol production in static conditions (E_1 -sucrose, E_2 -sucrose + lactose and E_3 -lactose)



Slika 2: Utjecaj sastava podloge na prirast biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 i proizvodnju etanola u semiaerobnim uvjetima (E_1 -saharoza, E_2 -saharoza + laktoza i E_3 -laktoza)

Figure 2: The influence of the media composition on the yield of biomass of *Kluyveromyces marxianus* ZIM75 and ethanol production in semiaerobic conditions (E_1 -sucrose, E_2 -sucrose + lactose and E_3 -lactose)

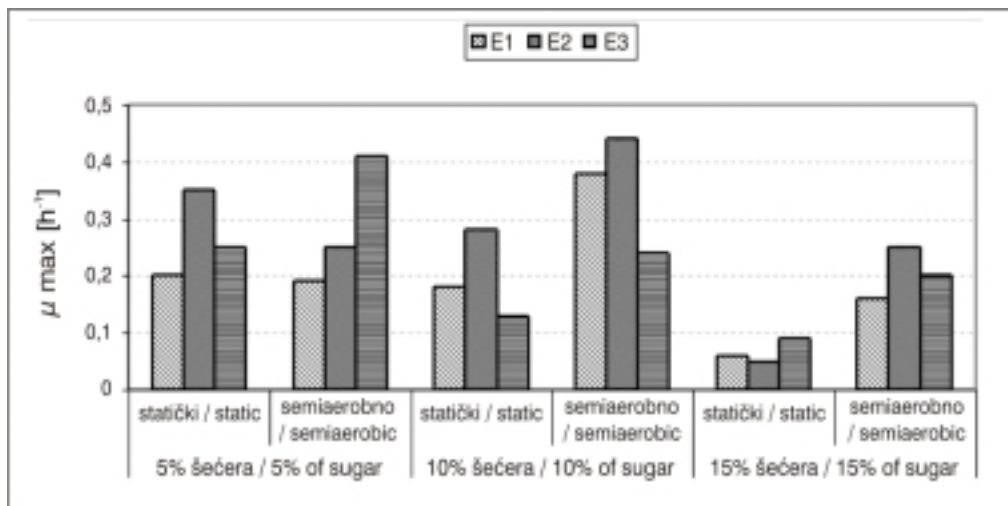
kod protoka zraka od 1,5 L/min dok je pri nižem protoku zraka koncentracija biomase bila znatno niža. Parrondo i sur., (2000.) isto tako navode povećanje koncentracije biomase i etanola, te specifične brzine rasta uzgojem *Kluyveromyces marxianus* na tresilici pri većem broju okretaja. Pozitivan učinak kisika na rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* i proizvodnju etanola najbolje je uočen je na podlogama s 15 % šećera gdje je u semiaerobnim uvjetima postignuta znatno viša koncentracija etanola i biomase nego u statičkim uvjetima. Neznatan utjecaj kisika na proizvodnju etanola uočen je jedino na podlogama s 5% šećera gdje su postignute približno iste koncentracije etanola i u statičkim i u semiaerobnim uvjetima uzgoja.

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je najbolji prirast biomase i prinos etanola postignuti na podlogama s ukupno 10% šećera u podlozi. Stanzer i sur., (2002.) također navode podlogu s 10% laktoze optimalnu za rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Grba i sur., (2002.) nisu uočili značajan utjecaj koncentracije laktoze (5%, 10% i 15%) na proizvodnju biomase različitih sojeva kvasca *Kluyveromyces marxianus* u aerobnim uvjetima, međutim koncentracija laktoze u podlozi značajno je utjecala na prinos etanola. Tako je najveći prinos etanola 8% (V/V) dobiven na podlozi s 15% laktoze u podlozi u aerobnim uvjetima, što je suprotno literaturnim navodima koji svrstavaju kvasac *Kluyveromyces marxianus* u grupu Crabtree-negativnih kvasaca. Zalashko i sur., (1998.) također navode da soj kvasca *Kluyveromyces marxianus* selekcioniran u njihovom laboratoriju fermentira koncentriranu sirutku s preko 15% laktoze pri čemu se u semiaerobnim uvjetima, u poluindustrijskom postrojenju, postigne 7,36% (V/V) etanola.

Ako se promatra utjecaj sastava podloga na rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* i proizvodnju etanola, uočljivi su maksimalni prinosi na podlozi s 10% šećera i u semiaerobnim i u statičkim uvjetima postignuti na podlozi E2 koja sadrži laktozu i saharozu u omjeru 1:1. Iz toga se može zaključiti da hranjive tvari prisutne u melasi i sirutki imaju stimulirajući efekt na rast stanica kvasca i proizvodnju etanola. Najviši prinosi biomase i etanola postignuti su na podlozi E3 s 5% šećera koja sadrži samo melasu kao supstrat. Međutim, na podlogama s 10% i 15% šećera rezultati postignuti na podlozi E3 bili su lošiji od rezultata postignutih na podlogama E1 i E2. Zakrzewski i Zmarlicki, (1990.) su istražujući fermentaciju šećera u različitim miješanim podlogama sastavljenim od sirutke i melase ustanovili da je osmotski tlak u melasnim podlogama 1,7 puta veći nego onaj u podlogama

koje su sadržavale samo sirutku kao izvor ugljikohidrata, a imale su istu koncentraciju šećera. Činjenica da je kvasac *Kluyveromyces marxianus* osjetljiv na visoki osmotski tlak mogla bi objasniti manje prinose biomase postignute pri većim koncentracijama šećera u podlogama s većim udjelom melase. Ferrari i sur. (2001.) istraživali su mogućnost proizvodnje pekarskog kvasca uz djelomičnu zamjenu melase sirutkom uz korištenje β -D-galaktozidaze. Postignuti prirasti biomase na takvoj mješanoj podlozi bili su 6% niži. Međutim, nije bilo nikakvih značajnih razlika u proizvodnji pekarskih proizvoda, dizanju tijesta i kvaliteti pečenja.

Utjecaj uvjeta fermentacije na maksimalne specifične brzine rasta te iskorištenje procesa pokazuju slike 3 i 4.

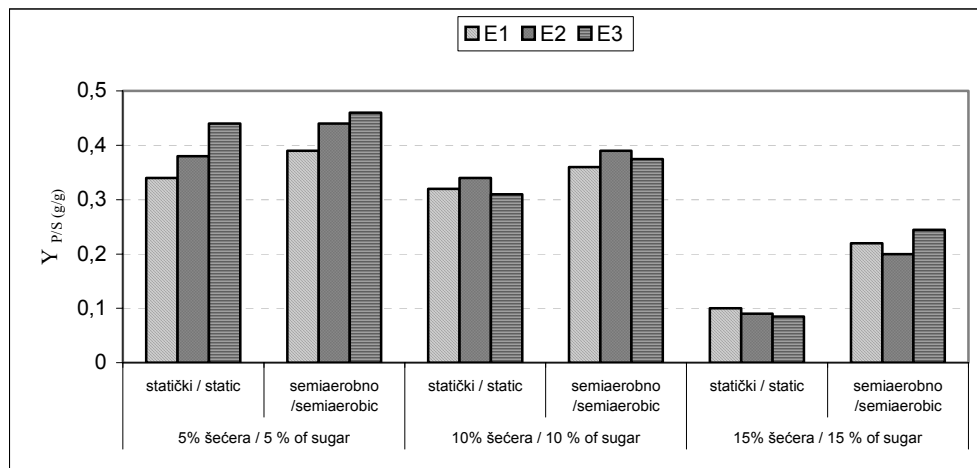


Slika 3: Utjecaj uvjeta fermentacije (aerobnost procesa, sastav podloge i postotak šećera) na maksimalne specifične brzine rasta (E_1 -saharoza, E_2 -saharoza + laktoza i E_3 -laktoza)

Figure 3: The influence of the fermentation conditions (aeration, composition of the medium and percentage of sugar) on the maximum specific growth velocity (E_1 -sucrose, E_2 -sucrose + lactose and E_3 -lactose)

Najveća maksimalna specifična brzina rasta od $0,44 \text{ h}^{-1}$ postignuta je na podlozi s 10% šećera sastavljenoj miješanjem sirutke i melase u semiaerobnim uvjetima. Zaključak dobiven razmatranjem prethodnih rezultata potvrđuje da je ova podloga optimalna za rast kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 i

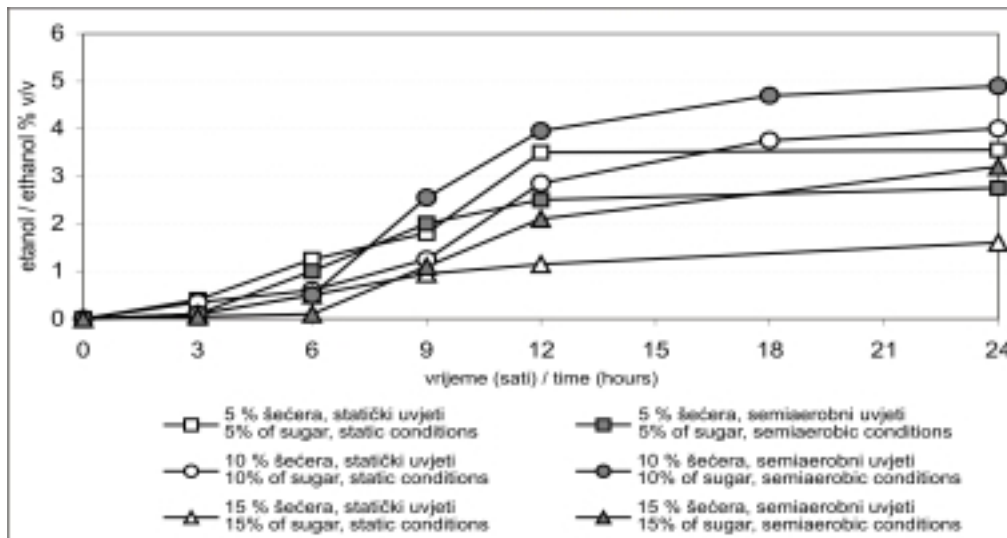
produkciju etanola. Međutim, najbolja iskorištenja supstrata ipak su postignuta na podlogama s 5% šećera. U semiaerobnim uvjetima na melasnoj



Slika 4: Utjecaj uvjeta fermentacije (aerobnost procesa, sastav podloge i postotak šećera) na stupanj konverzije supstrata u etanol (E_1 -saharoza, E_2 -saharoza + laktoza i E_3 -laktoza)

Figure 4: The influence of the fermentation conditions (aeration, contents of the medium and percentage of sugar) on the degree of the conversion of substrate into ethanol. (E_1 -sucrose, E_2 -sucrose + lactose and E_3 -lactose)

podlozi postignuto je maksimalno iskorištenje od 0,458 g/g, dok je maksimalno postignuto iskorištenje u statičkim uvjetima iznosilo 0,440 g/g. Maksimalne specifične brzine rasta na tim podlogama također su bile visoke i iznosile su $0,425 \text{ h}^{-1}$ u semiaerobnim i $0,2 \text{ h}^{-1}$ u statičkim uvjetima. Na laktoznim podlogama s 5 % šećera postignuto je nešto niže iskorištenje procesa ($Y_{P/S} = 0,35 - 0,4 \text{ gg}^{-1}$) tj. oko 75 %. Parrondo i sur. (2000.) navode 88 %-tno iskorištenje u šaržnom te 96 %-tno u kontinuiranom procesu proizvodnje etanola pomoću *Kluyveromyces marxianus* na laktoznoj podlozi s 4,5 % šećera, dok Brady i sur. (1994.) navode samo 29 % iskorištenja procesa s termotolerantnim kvascem *Kluyveromyces marxianus* IMB3 na 45°C . Dodatkom dodatnih količina β -D-galaktozidaze dokazali su da je raspoloživost enzima prema supstratu limitirajući faktor u proizvodnji etanola, pa je na taj način iskorištenje procesa povećano na 53 %.



Slika 5: Kinetike alkoholnih fermentacija kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 u statičkim i semiaerobnim uvjetima na podlozi E2 (saharoza:laktoza = 1:1) pri različitim postocima šećera

Figure 5: Kinetics of the ethanol fermentations by yeast strain *Kluyveromyces marxianus* ZIM75 in static and semiaerobic conditions on substrate E2 (sucrose:lactose=1:1) at different percentage of sugar

Na slici 5 prikazane su kinetike alkoholnih fermentacija kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM 75 na optimalnoj podlozi E2 sastavljenoj miješanjem sirutke i melase u jednakim omjerima pri različitim koncentracijama šećera u podlozi u statičkim i semiaerobnim uvjetima. Može se zaključiti da su na podlozi s 15% šećera kinetike usporene, pogotovo u statičkim uvjetima, što se može pripisati inhibiciji kvasca visokom koncentracijom šećera u podlozi. To objašnjava i niska iskorištenja procesa dobivena na toj podlozi tijekom 24 sata. U semiaerobnim uvjetima inhibicija je nešto manja zbog pozitivnog utjecaja kisika na stanice kvasca.

Zaključak

Ostvareni rezultati pokazuju da je u proizvodnji alkohola i prehrambenog kvasca moguć razvoj novih biotehnoških procesa koji će kao supstrate koristiti alternativne sirovine kao što je sirutka. Primjena kvasca *Kluyveromyces marxianus* je jedna od mogućnosti budući da mu raznolikost metaboličkog sustava omogućuje korištenje različitih izvora ugljika, postiže dobru fermentativnu aktivnost i visok prinos biomase. Kvasac *Kluyveromyces*

marxianus ZIM75 postigao je više prinose biomase i alkohola u semiarobnim nego u statičkim uvjetima uzgoja, a optimalna podloga na kojoj su postignuti maksimalni prinosi biomase i etanola je podloga E2 koja sadrži sirutku i melasu s ukupnom koncentracijom šećera 10 %.

THE INFLUENCE OF MOLASSES ADDITION ON THE KINETICS OF ALCOHOLIC FERMENTATION OF WHEY USING *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* YEAST

Summary

*Kinetics of alcoholic fermentation by yeast **Kluyveromyces marxianus** ZIM 75 in various media based on whey and molasses were monitored. The fermentations were performed under static and semiaerobic conditions at 34°C. Deproteinized whey and molasses were mixed in various proportions to give final sugar mass concentrations of 5%, 10% and 15% in medium. The experiments conducted showed that medium with 10 % of sugar (sucrose:lactose=1:1) is optimal for alcoholic fermentations in static and semiaerobic conditions. The best ethanol yield after 24 hours of fermentation was 4.05 % (V/V) in static conditions and 4.9 % (V/V) in semiaerobic conditions. The biomass yield was 7.78 g d.m./L in semiaerobic conditions and 3.19 g d.m./L in static conditions.*

*Key words: **Kluyveromyces marxianus**, whey, molasses, alcoholic fermentation*

Literatura

- BRADY, D., MARCHANT, R., McHALE, L., McHALE, A.P. (1994.): Production of ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. *Biotechnology Letters* **16** (7) 737-740
- CRISTIANI-URBINA, E., NETZAHUATL-MUNOZ, A.R., MANRIQUEZ-ROJAS, F.J., JUAREZ-RAMIREZ, C., RUIZ-ORDAZ, N., GALINDEZ-MAYER, J.: (2000.) Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed cultures. *Process Biochemistry* **35** (7) 649-657
- FERRARI, M.D., BIANCO, R., FROCHE, C., LOPERENA, M.L. (2001.) Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures. *Biotechnology Letters* **23** (1) 1-4
- FURLAN, SA., SCHNEIDER, A., MERKLE, R., CARVALHO-JONAS, M.F., JONAS, R., (2001.) Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of beta-D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free medium. *Acta Biotechnologica*. **21** (1) 57-64

- GONZALEZ-SISO, M.I., RAMIL, E., CERDAN, M.E., FREIRE-PICOS, M.A. (1996.) Respirofermentative metabolism in *K. lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme and Microbial Technology*. **18** 585-591
- GRBA, S., STEHLIK-TOMAS, V., STANZER, D., VAHČIĆ, N., ŠKRLIN, A. (2002.) Selection of Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass Production on Whey. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **16** (1) 13-16
- KOURKOUTAS, Y., DIMITROPOULOU, S., KANELLAKI, M., MARCHANT, R., NIGAM, P., BANAT, I.M., KOUTINAS, A.A. (2002.) High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresource Technology*. **82** (2) 177-181
- KRETSCHMAR, H. (1995.) Hefe und Alcohol, Springer-Werlag, Berlin Heidelberg, 557-600
- NOVAK, S., MARIĆ, V. (1995.) Metabolizam ugljikohidrata kod *Saccharomyces cerevisiae*. *Kemija u industriji* **44** (8) 341-353
- PARRONDO, J., GARCIA, L.A., DIAZ, M. (2000.) Production of Alcoholic Beverage by Fermentation of Whey Permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: Primary Metabolism. *Journal of The Institute of Brewing* **106** (6), 367-375
- POPOVIĆ-VRANJEŠ, A., VUJIČIĆ, I.F. (1997.) Tehnologija sirutke, Univerzitet, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
- STANZER, D., STEHLIK-TOMAS, V., GULAN-ZETIĆ, V., MANENICA, J. (2002.) Sirutka-alternativna sirovina za proizvodnju prehrambenog kvasca. *Mljekarstvo* **52** (2) 113-124
- SZCZODRAK J. (2000.) Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -D-galaktozidaze from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **10** (6), 631-637
- TAHOUN, M.K., EL-NEMR, T.M., SHATA, O.H. (1999.) Ethanol from lactose in salted cheese whey by recombinant *S. cerevisiae* Z Lebensm Unters Forsch A (1999.) **208**, 60-64
- ZAKRZEWSKI, E., ZMARLICKI, S. (1988.) Ethanol fermentation in whey and whey-molasses mixtures. 2. Two stage fermentation process of ethanol production from whey and beet molasses. *Milchwissenschaft* **43** (8) 492-496
- ZALASHKO, M., KAPICH, A., KARTEL, A., GRUSHENKO, M. (1998.) Scale-up of ethanol production from whey. *Appl. Biochem. Microbiol.* **34** (2) 149-151

Adrese autora – Author's addresses:

Damir Stanzer, dipl. ing.
Dr. sc. Slobodan Grba, red. prof.
Dr. sc. Vesna Stehlik-Tomas, izv. prof.
Jasna Mrvčić, dipl. ing.
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

Prispjelo-Received: 18. 01. 2004..**Prihvaćeno-Accepted:** 12. 02. 2004