

Proizvodnja i izolacija mliječne kiseline pomoću termofilne bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

Sarić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:504730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2021.

Marko Sarić

1485/BPI

**PROIZVODNJA I IZOLACIJA
MLIJEČNE KISELINE
POMOĆU TERMOFILNE
BAKTERIJE *Bacillus smithii*
DSM 460**

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

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

Ovom prilikom zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovoga rada, kao i doc. dr. sc. Antoniji Trontel, dr. sc. Blanki Ljubas i Nenadu Marđetku. mag. ing. bioproc. na strpljenju, brojnim savjetima, trudu i uloženom vremenu tijekom izrade ovoga rada. Također se zahvaljujem svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva koji su pomagali u izradi eksperimenata. Posebno se želim zahvaliti Bogu, svojoj obitelji i svim prijateljima na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PROIZVODNJA I IZOLACIJA MLIJEČNE KISELINE POMOĆU TERMOFILNE BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460

Marko Sarić, 1485/BPI

Sažetak: Održiva upotreba lignocelulozne biomase za dobivanje raznih biokemikalija, poput mliječne kiseline uključuje iskorištavanje svih ugljikohidrata prisutnih u njenim hidrolizatima. Zbog toga je važna upotreba mikroorganizama koji mogu koristiti pentoze i heksoze kako bi proces bio ekonomičan. Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne uvjete za proizvodnju mliječne kiseline pomoću bakterije *Bacillus smithii* DSM 460, u svrhu dobivanja što većeg prinosa proizvoda u različitim bioreaktorskim sustavima. Također je istražena i mogućnost izolacije mliječne kiseline iz fermentirane podloge pomoću adsorpcijske smole. Iz provedenog istraživanja najveće koncentracije mliječne kiseline se postižu u bioreaktoru s miješalom (približno 28 g L⁻¹) pri temperaturi od 55 °C uz koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu preko 90 % teoretske vrijednosti. Tijekom uzgoja provedenom pri temperaturi od 45 °C u istim uvjetima postiže se oko 40 % manja koncentracija mliječne kiseline (≈ 17 g L⁻¹). Utjecaj temperature zanemariv je na odvijanje procesa adsorpcije, a najveći kapacitet postignut je pri 40 °C (0,2480 g mliječne kiseline/g vlažne smole).

Ključne riječi: održiv razvoj, mliječna kiselina, adsorpcija, ekstremofili, bioreaktor

Rad sadrži: 62 stranice, 15 slika, 9 tablica, 93 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Antonija Trontel
2. doc. dr. sc. Mario Novak
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 2. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

PRODUCTION AND ISOLATION OF LACTIC ACID USING THERMOPHILIC BACTERIA *Bacillus smithii* DSM 460

Marko Sarić, 1485/BPI

Abstract: Sustainable use of lignocellulosic biomass to produce a variety of biochemicals, such as lactic acid involves the utilization of all carbohydrates present in its hydrolysates. Therefore, it is important to use microorganisms that can use pentoses and hexoses to make the process economical. The aim of this study was to determine the optimal conditions for the production of lactic acid using the bacterium *Bacillus smithii* DSM 460, in order to obtain the highest possible product yield in different bioreactor systems. The possibility of isolating lactic acid from a fermented medium using an adsorption resin was also investigated. From the performed research, the highest concentrations of lactic acid were achieved in a bioreactor with a stirrer (approximately 28 g L⁻¹) at 55 °C with a coefficient of conversion of the substrate into lactic acid over 90 % of the theoretical value. During cultivation at 45 °C in the same conditions, about 40 % lower concentration of lactic acid (≈ 17 g L⁻¹) was achieved. The influence of temperature is negligible on the adsorption process, and the highest capacity was achieved at 40 °C (0,2480 g of lactic acid / g of wet resin).

Keywords: sustainable development, lactic acid, adsorption, extremophiles, bioreactor

Thesis contains: 62 pages, 15 figures, 9 tables, 93 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD, Mario Novak, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.*

Reviewers:

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

Thesis defended: July 2nd, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. EKSTREMOFILNI	2
2.1.1. Ekstremofili u biotehnologiji	3
2.1.2. Rod <i>Bacillus</i>	3
2.1.3. Industrijska primjena i važnost <i>Bacillus</i> vrsta.....	5
2.1.4. <i>Bacillus smithii</i>	7
2.2. MLIJEČNA KISELINA	9
2.2.1. Vođenje procesa i izolacija mliječne kiseline.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Radni mikroorganizam	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Hranjive podloge	19
3.1.4. Aparature i uređaji.....	21
3.2. METODE	24
3.2.1. Priprema podloge	24
3.2.2. Nadzor procesa uzgoja bakterije <i>Bacillus smithii</i> DSM 460.....	25
3.2.3. Određivanje optičke gustoće.....	25
3.2.4. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija	26
3.2.5. Priprema uzoraka za UPLC analizu	26
3.2.6. Uzgoj bakterije <i>Bacillus smithii</i> DSM 460.....	26
3.2.7. Određivanje kinetike adsorpcije mliječne kiseline na ionsku smolu Amberlite IRA-67	27
3.2.8. Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja bakterije <i>Bacillus smithii</i> DSM 460	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C U TIKVICAMA NA PODLOZI S GLUKOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA.....	30
4.2. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C U TIKVICAMA NA PODLOZI SA KSILOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA.....	32
4.3. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C NA PODLOGAMA S GLUKOZOM I KSILOZOM KAO IZVORIMA UGLJIKA	35
4.4. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C NA SIMULIRANOJ PODLOZI U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU	38
4.5. UZGOJ BAKTERIJE <i>Bacillus smithii</i> DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C NA SIMULIRANOJ PODLOZI U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM.....	41
4.6. IZOLACIJA MLIJEČNE KISELINE POMOĆU AMBERLITE IRA-67 SMOLE.....	45
5. ZAKLJUČAK	52
6. POPIS LITERATURE	53
7. PRILOZI	62

1. UVOD

Bacillus smithii je fakultativno anaerobna, termofilna Gram-pozitivna bakterija, izvorno identificirana kao *Bacillus coagulans*. *B. smithii* ima biotehnološki potencijal jer može fermentirati niz izvora ugljika u laktat i ostale kemikalije koje čine zelene gradivne jedinice. Proizvodnja takvih zelenih kemikalija na povišenim temperaturama iz lignocelulozne biomase ima potencijal za smanjenje troškova proizvodnje ovih kemikalija. U usporedbi s trenutno korištenom mezofilnom proizvodnjom, poput bakterija mliječne kiseline ili bakterije *Escherichia coli*, količina enzima potrebnih za hidrolizu lignoceluloze približno je 3 puta niža pri 50–60 °C, što je temperatura umjereno termofilnih temperatura. Nadalje, fermentacija na višim temperaturama smanjuje rizike kontaminacije i troškove hlađenja te povećava topivost proizvoda i supstrata (Bosma i sur., 2016). S obzirom da je jedna najvažnijih značajki procesa njegova održivost, potrebno je koristiti izvore sirovina koji su obnovljivi i imaju nisku cijenu. Iz tog razloga upotreba lignoceluloznih sirovina u biotehnološkim procesima posebno je zanimljiva zbog široke rasprostranjenosti, dostupnosti i obnovljivosti lignoceluloznih materijala, uz određeni stupanj pretretmana kako bi se dobio oblik sirovine tj., izvor ugljika koji istraživani soj mikroorganizma može koristiti. U ovom radu istraživao se rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na definiranim podlogama koje sadrže ugljikohidrate sadržane u pretretiranim lignoceluloznim sirovinama (glukoza i/ili ksiloza), te u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa dobivenog tretmanom slabom kiselinom u visokotlačnom reaktoru. Kako je napomenuto, glavni izvori ugljika u pretretiranim lignoceluloznim sirovinama su glukoza i ksiloza, stoga je i cilj ovog rada bio analizirati kinetiku rasta, potrošnju supstrata i sintezu mliječne kiseline bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlogama koje sadrže te ugljikohidrate. Provedeni su uzgoji bakterija u različitim bioreaktorskim sustavima, konkretno u bioreaktoru s miješalom i horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru. Osim toga, istražena je mogućnost izolacije mliječne kiseline iz fermentirane podloge pomoću slabo bazne adsorpcijske smole Amberilite IRA-67. Određen je utjecaj temperature i početne koncentracije mliječne kiseline na kinetiku adsorpcije te su dobivene kinetičke konstante vezanja mliječne kiseline na smolu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. EKSTREMOFILNI

Tijekom posljednjih desetljeća znanstvenici su zaintrigirali organizmi koji nastanjuju ekstremne okoliše. Takvi organizmi, poznati kao ekstremofili, uspijevaju na staništima koja su za druge kopnene oblike života iznimno neprijateljska ili čak smrtonosna. Uspijevaju na ekstremno vrućim temperaturama, ledu i otopinama soli, kao i u kiselim i alkalnim uvjetima; neka mogu rasti u otrovnom otpadu, organskim otapalima, teškim metalima ili na nekoliko drugih staništa koja su se prije smatrala negostoljubivima za život. Pronađeni su ekstremofili na dubini od 6,7 km unutar Zemljine kore, više od 10 km duboko u oceanu - pod pritiskom do 110 MPa; od ekstremno kiselih uvjeta (pH 0) do ekstremno lužnatih uvjeta (pH 12,8); i od hidrotermalnih otvora na 122 °C do smrznute morske vode, na -20 °C. Za svako istraženi ekstremni okolišni uvjet, razni organizmi pokazali su da ne samo da mogu tolerirati te uvjete, već i da često zahtijevaju te uvjete za preživljavanje (Madigan i Barrs, 1997).

Ekstremofili se mogu podijeliti prema uvjetima u kojima rastu: kao termofili i hipertermofili (organizmi koji rastu na visokim, odnosno vrlo visokim temperaturama), psihrofili (organizmi koji najbolje rastu na niskim temperaturama), acidofili i alkalifili (organizmi optimalno prilagođeni kiselim ili alkalnim pH vrijednostima), barofili (organizmi koji najbolje rastu pod pritiskom) i halofili (organizmi kojima je potreban NaCl za rast). Uz to, ti su organizmi obično poliekstremofili, prilagođeni za život u staništima gdje različiti fizikalno-kemijski parametri dosežu ekstremne vrijednosti. Na primjer, mnogi vrući izvori istodobno su kiseli ili alkalni i obično bogati sadržajem metala; duboki je ocean općenito hladan, oligotrofan (vrlo nizak udio hranjivih sastojaka) i izložen visokom tlaku; a nekoliko hiperslanih jezera vrlo je alkalno. Ekstremofili se također mogu podijeliti u dvije široke kategorije: ekstremofilni organizmi kojima je potreban jedan ili više ekstremnih uvjeta da bi rasli i ekstremotolerantni organizmi koji mogu tolerirati ekstremne vrijednosti jednog ili više fizikalno-kemijskih parametara iako optimalno rastu u "normalnim" uvjetima. Ekstremofili uključuju članove sve tri domene živih bića, tj. bakterije, arheje i eukariote. Većina ekstremofila su mikroorganizmi (velik udio u tome su arheje), ali u ovu skupinu spadaju i eukarioti poput protista (npr. algi, gljivica i protozoa) i višestaničnih organizama (Rampelotto, 2013).

2.1.1. Ekstremofili u biotehnologiji

Iako molekularne strategije koje ekstremofili koriste za preživljavanje u ekstremnom okolišu još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene, poznato je da su ti organizmi prilagodili biomolekule i posebne biokemijske putove koji su od velikog interesa u biotehnoškoj svrhe. Njihova stabilnost i aktivnost u ekstremnim uvjetima čine ih korisnom alternativom mezofilnim mikroorganizmima. To se posebno odnosi na njihove enzime, koji ostaju katalitički aktivni u ekstremnim temperaturama, salinitetu, pH i uvjetima otapala. Zanimljivo je da neki od ovih enzima pokazuju poliekstremofilnost (tj. stabilnost i aktivnost u više od jednog ekstremnog stanja) što omogućava njihovu široku upotrebu u industrijskoj biotehnologiji.

U mnogim biotehnoškim procesima mikrobiološka kontaminacija predstavlja glavni rizik tijekom vođenja fermentacije i time ugrožava ekonomsku izvedivost novih procesa u razvoju. U tom kontekstu, primjena ekstremofilnih proizvodnih sojeva omogućuje uzgoj pod drastično smanjenim ili čak bez ikakvih mjera sterilnosti. U slučaju halofilnih proizvođača polihidroksibutirata *Haloferax mediterannei* (Hermann-Krauss i sur., 2013) ili termofilnog *Chelatococcus sp.* (Ibrahim i Steinbüchel, 2010), proces se odvijao bez sterilizacije opreme za bioreaktor, a monoseptički su radili dulje vremensko razdoblje. Procesi uzgoja termofilnih mikroorganizama smatraju se energetske učinkovitijima zbog manje energije potrebne za hlađenje. Zahvaljujući visokoj toplinskoj energiji koju generira metabolizam stanice, posebice u uzgojima gdje je velika gustoća stanica, takvi termofilni uvjeti omogućuju "samozagrijane" sustave. Toplina unešena sustavom za miješanje bioreaktora također doprinosi zagrijavanju samog procesa fermentacije. To jasno daje do znanja da se mogu smanjiti i troškovi grijanja i hlađenja, a slično gore spomenutoj primjeni halofila, sterilni uvjeti možda neće biti bitni tijekom postupka koji uključuje termofilne mikrobe. Uz to, upotreba proizvodnih sojeva koji dobro uspijevaju pri ekstremnim pH vrijednostima, daleko od pH optimuma potencijalnih onečišćivača, minimalizira rizik od mikrobiološke kontaminacije; točnije, upotrebom alkalofilnih proizvodnih sojeva izbjegava se pojava plijesni (Gomes i Steiner, 2004).

Ekstremofili imaju široku potencijalnu primjenu u proizvodnji biogoriva, karotenoida, proteaza i lipaza, glikozil hidrolaza i šećera, biorudarenju te medicinsku primjenu s obzirom da proizvode antimikrobne, antifugalne, antivirusne i antitumorne spojeve (Coker, 2016).

2.1.2. Rod *Bacillus*

Bacillus je rod Gram-pozitivnih bakterija u obliku štapića, pripada koljenu *Firmicutes*, s 266 imenovanih vrsta. Vrste iz roda *Bacillus* mogu biti obvezni aerobi ovisni o kisiku ili

fakultativni anaerobi koji mogu živjeti u odsutnosti kisika. Kultivirane vrste *Bacillus* pozitivne su na enzim katalazu ukoliko je prisutan kisik. Neke kulture s godinama mogu postati Gram-negativne (Turnbull, 1996).

Imaju sposobnost stvaranja endospora i mogu ostati u ovom stanju mirovanja godinama. Poznato je da je endospora jedne vrste iz Maroka preživjela temperaturu od 420 °C. Stvaranje endospore obično je potaknuto nedostatkom hranjivih sastojaka. Mogućnost sporulacije izvorno je definiralo rod, ali nisu sve vrste usko povezane, a mnoge su vrste premještene u druge rodove iz koljena *Firmicutes* (Madigan i Martinko, 2005). S obzirom da su spore mnogih *Bacillus* vrsta otporne na toplinu, zračenje, dezinficijense i isušivanje, teško ih je ukloniti iz medicinskih i farmaceutskih materijala te su čest uzrok onečišćenja. Mnoge vrste su otporne i na kemikalije poput antibiotika. Ovaj otpor omogućuje im preživljavanje dugi niz godina, posebno u kontroliranom okruženju (Christie i Setlow, 2020). Vrste iz ovog roda dobro su poznate u prehrambenoj industriji kao problematični organizmi koji uzrokuju kvarenje hrane (Turnbull, 1996).

Stanični zid tvori barijeru između bakterije i okoliša, a istodobno održava oblik štapa i podnosi pritisak stvoren turgorom stanice. Stanična stijenka izrađena je od teihonske i teihuronske kiseline. *B. subtilis* prva je bakterija u kojoj je identificiran aktinu sličan citoskelet koji ima važnu ulogu u određivanju oblika stanica i sintezi peptidoglikana. Također je lokaliziran cijeli set enzima koji sintetiziraju peptidoglikan. Rod *Bacillus* uključuje slobodno živuće (neparazitske) vrste, i dvije parazitske patogene vrste. Ove dvije vrste *Bacillus* su medicinski značajne: *B. anthracis*, koja uzrokuje antraks; i *B. cereus*, koja uzrokuje trovanje hranom, sa simptomima sličnim onima uzrokovanim stafilokokom (Ryan i Ray, 2004). *B. cereus* stvara toksine koji uzrokuju 2 različita skupa simptoma: emetički toksin koji može uzrokovati povraćanje i mučninu te proljev. *B. subtilis* važan je kao modelni organizam. Također je značajan prehrambeni kontaminant koji uzrokuje nitavost kruha. Može proizvoditi i lučiti antibiotike. Neki komercijalni sojevi *B. coagulans* mogu igrati ulogu u kvarenju visoko kiselih proizvoda na bazi rajčice.

Sveprisutni su u prirodi. Mogu se pojaviti u ekstremnim okruženjima poput visokog pH (*B. alcalophilus*), visoke temperature (*B. thermophilus*) i visoke koncentracije soli (*B. halodurans*). *B. thuringiensis* stvara toksin koji može ubiti insekte, pa je stoga korišten kao insekticid (Slonczewski i Foster, 2011). *B. siamensis* ima antimikrobne spojeve koji inhibiraju biljne patogene, poput gljivica *Rhizoctonia solani* i *Botrytis cinerea* (Jeong i sur., 2012). Neke vrste *Bacillus* prirodno su sposobne za uzimanje DNA transformacijom (Keen i sur., 2017).

2.1.3. Industrijska primjena i važnost *Bacillus* vrsta

Bakterije su najdominantnija skupina proizvođača proteaza, a rod *Bacillus* je najistaknutiji izvor (Mienda i sur., 2014). To je uglavnom zbog visokog kapaciteta za izlučivanje proteina koji posjeduje nekoliko vrsta *Bacillus* (Harwood i Cranenburgh, 2008). Uz to, različite vrste roda *Bacillus* proizvode neutralne i alkalne proteaze (Anandharaj i sur., 2016), što je zanimljivo za upotrebu enzima u industriji. Moguć je i genetski inženjering proteaza iz sojeva *Bacillus* sp., što rezultira proteazama s diferenciranim svojstvima. Uz to, vrste *Bacillus* proučavane su radi heterologne proizvodnje proteaza iz drugih mikroorganizama (Cui i sur., 2018). *Bacillus* proteaze imaju nekoliko izvanrednih karakteristika za mnoge industrijske primjene, poput širokog pH i temperaturnog djelovanja, raspona stabilnosti, tolerancije na alkalne i toksične spojeve, uključujući oksidanse i površinski aktivne tvari (Contesini i sur., 2018). Zbog ovih svojstava, proteaze iz roda *Bacillus* koriste se u proizvodnji deterdženata, prehrambenih proizvoda, kože, svile i agrokemijskih proizvoda (Dos Santos Aguilar i Sato, 2018). Alkalna serinska proteaza (DHAP) iz *Bacillus pumilus* BA06 tipični je mezofilni enzim koji je pokazao velik potencijal u raznim industrijskim primjenama (Zhao i Feng, 2018). *Bacillus amyloliquefaciens* izvor je prirodnog antibiotskog proteina barnaze (ribonukleaze), alfa amilaze koja se koristi u hidrolizi škroba, proteaze subtilizina koja se koristi s deterdžentima i restriktivnog enzima BamH1 koji se koristi u istraživanju DNA. Dio genoma *Bacillus thuringiensis* ugrađen je u usjeve kukuruza i pamuka. Nastali GMO (Genetically modified Organism) otporni su na neke štetne insekte. Neke *Bacillus* vrste imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) oznaku Uprave za hranu i lijekove. Sposobnost odabranih sojeva da proizvode i izlučuju velike količine (20-25 g L⁻¹) izvanstaničnih enzima smjestila ih je među najvažnije industrijske proizvođače enzima. Klasične tehnike mutacije i/ili selekcije, zajedno s naprednim strategijama kloniranja i proteinskog inženjerstva, iskorištene su za razvoj ovih proizvoda. Nastojanja da se proizvedu i izluče visoki prinosi stranih rekombinantnih proteina u domaćinima *Bacillus* u početku su bila ometena razgradnjom proizvoda proteazama domaćina. Nedavna istraživanja otkrila su da sporo smatanje heterolognih proteina na granici membransko-staničnog zida Gram-pozitivnih bakterija čini ranjivim na napad proteazama povezanim sa stijenkama. Uz to, prisutnost tiol-disulfidnih oksidoreduktaza u *B. subtilis* može biti korisna u lučenju proteina koji sadrže disulfidnu vezu. Razumijevanje složenog mehanizma za translokaciju proteina Gram-pozitivnih bakterija trebao bi omogućiti rješavanje trenutnih izazova izlučivanja i učiniti *Bacillus* vrste glavnim domaćinima za heterolognu proizvodnju

proteina. Sojevi bacila također su razvijeni i projektirani kao industrijski proizvođači nukleotida, vitamina riboflavina, arome riboze i dodatka poli-gama-glutaminske kiseline. Bakteriocini koje proizvodi rod *Bacillus* mogu se smatrati drugim najvažnijim nakon bakteriocina koje proizvode bakterije mliječne kiseline. Sojevi iz roda *Bacillus* proizvode raznolik niz antimikrobnih peptida, s nekoliko različitih osnovnih kemijskih struktura (Gebhardt i sur., 2002). Korištenje bakterija *Bacillus* u konzerviranju hrane tek se istražuje. Ovo je obećavajuće područje istraživanja, jer mnogi *Bacillus* bakteriocini mogu riješiti ograničenja bakteriocina bakterija mliječne kiseline zbog svojih ponekad širih inhibicijskih spektra protiv Gram-negativnih bakterija, pa čak i protiv gljivica. Već su zabilježeni obećavajući rezultati na poljima ljudskog zdravlja, uključujući kontrolu patogenih bakterija kao što su MRSA (meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus*), *G. vaginalis* i druge te inhibiciju *C. difficile* u crijevima. Mogli bi se primijeniti i za poboljšanje zdravlja životinja i sigurnost životinjskih proizvoda, primjerice u suzbijanju mastitisa životinja, za inhibiciju enteričnih patogena (kao što je *Campylobacter*) u peradi, ali i za poboljšanje fermentacije buraga kroz selektivnu inhibiciju neželjene mikrobiote i selektivne proliferacije sojeva s poboljšanim hidrolitičkim aktivnostima na biljnom materijalu (Abriouel i sur., 2011). Odavno je poznato da različite vrste iz ovog roda proizvode mliječnu kiselinu aerobno i anaerobno, primjerice *Bacillus* sp. SHO-1, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus thuringiensis*. Prinosi biomase bili su veći u aerobnoj kulturi, ali više je mliječne kiseline proizvedeno u anaerobnoj kulturi. Maksimalne koncentracije mliječne kiseline koju proizvode *Bacillus* sp. SHO-1, *B. cereus* i *B. thuringiensis* u jednostavnim podlogama s peptonom i glukozom iznosile su 16,4, 13,3 te 12,0 g L⁻¹ (Ohara i Yahata, 1996). S karakterizacijom genoma *B. subtilis* 168 i nekih srodnih sojeva, *Bacillus* vrste postat će poželjni domaćini za proizvodnju mnogih novih i poboljšanih proizvoda dok se krećemo kroz genomsku i proteomsku eru (Schallmey i sur., 2004).

Prisutnost vrsta *Bacillus* u hrani ne podrazumijeva uvijek kvarenje ili trovanje hranom, a neke vrste ili sojevi se čak koriste u proizvodnji hrane za ljude i životinje kao što su, na primjer, sojevi *Bacillus subtilis* koji se koriste u proizvodnji Natto, istočnoazijske fermentirane hrane (Hosoi i Kiuchi, 2003). Nadalje, specifični sojevi *B. subtilis* također se koriste kao početna kultura za fermentaciju soje u tradicionalnom zapadnoafričkom začinu dawadawa ili za fermentaciju sjemena afričkog meskita u proizvodnji nigerijskog prehrambenog začina okpehe (Oguntoyinbo i sur., 2007). Netoksinogeni *Bacillus cereus* ssp. *toyoi* s probiotičkim svojstvima koristi se i kao dodatak hrani za životinje (Lodemann i sur., 2008).

2.1.4. *Bacillus smithii*

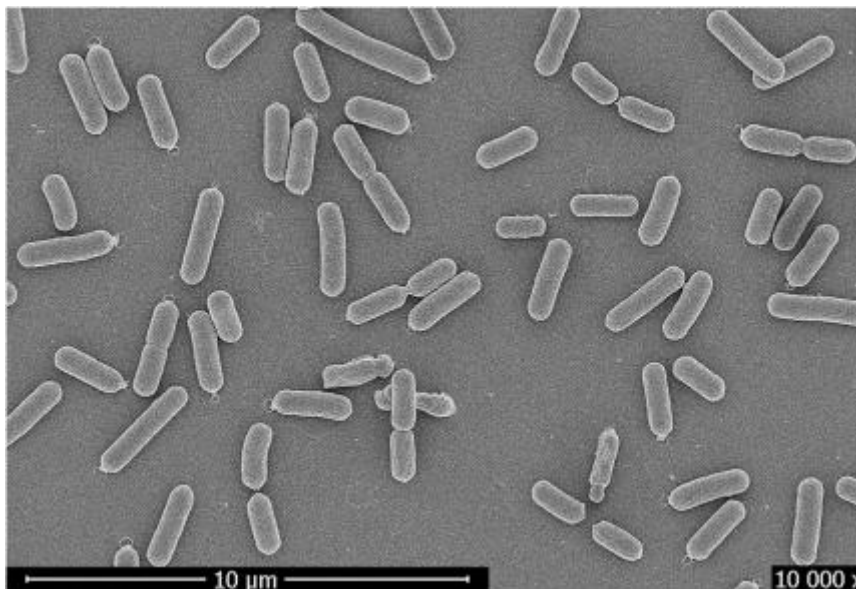
Bacillus smithii DSM 460 je pokretna bakterija (slika 1) u obliku štapića (0,8–1,0 sa 5,0–6,0 μm), fakultativno anaerobna, fakultativno termofilna sa širokim rasponom temperatura (25–65 °C) i pH (5,5–7,0) (Blumenstock i sur., 1988). Nije citotoksičan (Atamer i sur., 2013). Pomoću HPLC analiza i API-testova utvrđeno je da je vrsta sposobna fermentirati niz izvora ugljika uglavnom u laktat, s acetatom kao glavnim nusproizvodom i manjom količinom sukcinata i malata (Bosma i sur., 2015a). Na osnovu 16S rRNA gena i analiza proteinskih domena, utvrđeno je da je *Bacillus smithii* najuže povezan s *Bacillus coagulans*, koji je također fakultativno termofilna vrsta (Bosma i sur., 2015a).

Soj *Bacillus smithii* DSM 460 izoliran je iz tvornice šećerne repe, no mogu se naći u siru (Bosma i sur., 2015b), kompostu (Blumenstock i sur., 1988) i vrućim izvorima (Li i sur., 2011). Genetska dostupnost, široki raspon temperatura i pH te sposobnost korištenja različitih izvora ugljika u relativno minimalnom mediju čini ovu bakteriju zanimljivim kandidatom za biotehnoške procese (Bosma i sur., 2015b). Genom ove bakterije sastoji se od kružnog kromosoma s 3 368 778 baznih parova od čega je udio GC (gvanin + citozin) 40,8 % te plazmida s 12 514 baznih parova i udjelom GC od 35,9 %. Na kromosomu je identificirano ukupno 3 880 gena, od kojih je 3 627 označeno kao geni koji kodiraju proteine. Od tih 3 627 gena, 81 genu su dodijeljene 'vjerojatne' funkcije, 1 472 su hipotetski ili geni s nepoznatom funkcijom, a preostali su imali definiranu funkciju. Izvan kromosomskih gena, 126 gena su pseudogeni, 94 gena kodiraju za tRNA, 33 za rRNA, 122 gena je sa signalnim sekvencama za lučenje i 795 je gena s transmembranskom domenom. Predviđa se da plazmidna DNA sadrži 18 gena od kojih 5 imaju dodijeljenu funkciju, 11 su hipotetski te 2 gena koji kodiraju za proteine povezane s mobilnim elementima.

U genomu se geni koji sudjeluju u glikolizi, glukoneogenezi, putu pentoza fosfata, ciklusu limunske kiseline i glioksilatnom putu mogu identificirati, ali ne i kompletni skupovi gena za fosfoketolazni put i Entner-Doudoroffov put. Najznačajnija razlika u odnosu na srodni *Bacillus coagulans* je odsutnost gena koji kodiraju za fosfotransacetilazu i acetat kinazu, koji čine standardni put proizvodnje acetata u bakterijama. Činjenica da *B. smithii* proizvodi značajne količine acetata iz glukoze ukazuju da je uključen alternativni put koji se trenutno istražuje. Nadalje, geni za piruvat-format liazu, piruvat dekarboksilazu i piruvat oksidoreduktazu nisu mogli biti pronađeni u genomu, stoga je kompleks piruvat dehidrogenaze najvjerojatnije jedini enzim odgovoran za pretvorbu piruvata u acetyl-CoA. Druga razlika u odnosu na *B. coagulans* je nedostatak kataboličkog alsSD operona u *B. smithii*, koji kodira za

enzimi acetolaktat sintazu i acetolaktat dekarboksilazu. To je u skladu s odsustvom proizvodnje 2,3-butandiola. Geni anaboličke acetolaktat sintaze male i velike podjedinice su prisutni. Ti su geni uglavnom uključeni u biosintetske puteve izoleucina i valina (Blomqvist i sur., 1993). S druge strane, geni specifični za (2S, 3S)-butandiol i (2S, 3R)-butandiol dehidrogenazu identificirani su u genomu. Iako je u genomu pronađeno nekoliko alkoholnih dehidrogenaza, nije pronađena bifunkcionalna acetaldehid dehidrogenaza/alkohol dehidrogenaza adhE, što je u skladu s odsutnošću proizvodnje alkohola kod fermentacije s *B. smithii* (Bosma i sur., 2015a). Identificirani su svi biosintetski putovi aminokiselina. Putovi za *de novo* sintezu i spasonosni putevi za pirimidine i purine također su identificirani. Kompletni putevi biosinteze vitamina identificirani su za kobalamin, riboflavin, tetrahidrofolat, pantotenat, p-aminobenzojevu kiselinu, nikotinsku kiselinu i piridoksal, ali ne i za tiamin, askorbat, piridoksamin i D-biotin.

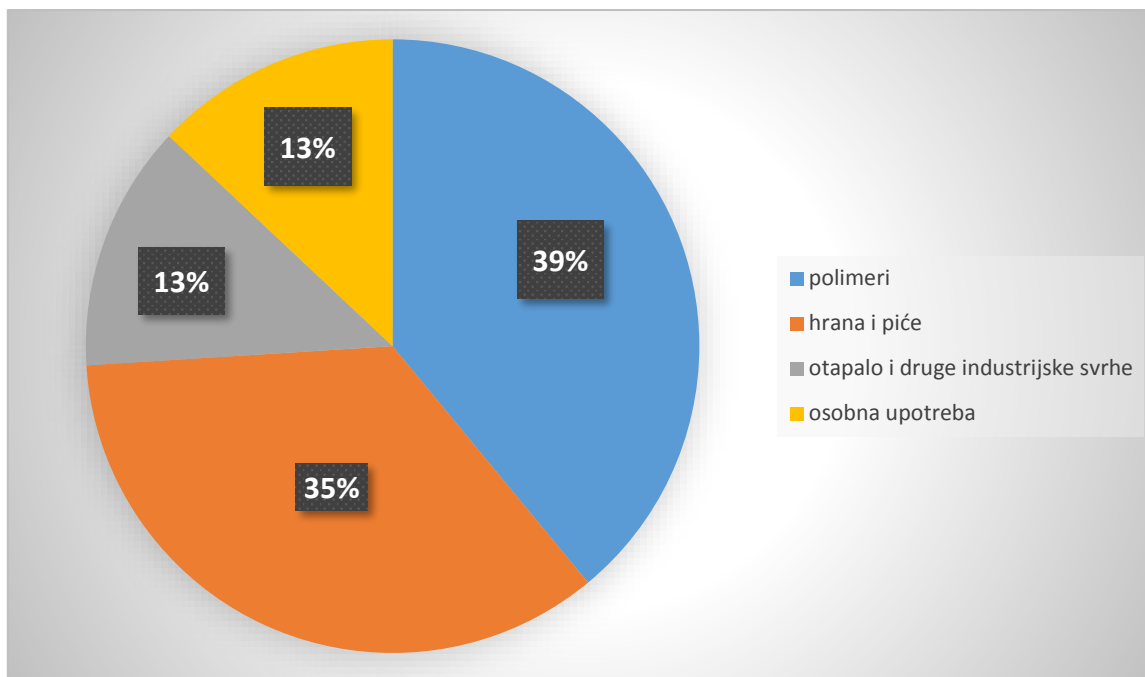
Otpornost na infekcije presudna je za industrijske mikroorganizme. Sustavi obrane domaćina mogu pružiti zaštitu, ali također može ometati genetsku dostupnost organizma. U genomu *B. smithii* pronađeno je nekoliko sustava obrane domaćina: restriksijska endonukleaza tip II, 5-metilcitozin specifični restriksijski enzim, sustav restriksijske modifikacije tipa I i sustav CRISPR-Cas Tip I-B (Bosma i sur., 2016).



Slika 1. *Bacillus smithii* pod elektronskim mikroskopom (Bosma i sur., 2016)

2.2. MLIJEČNA KISELINA

Mliječna kiselina ili 2-hidroksipropionska kiselina je najčešća hidroksikarboksilna kiselina u prirodi (Datta i Henry, 2006). Prirodna je organska kiselina s dugom poviješću primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i kemijskoj industriji (Ouyang i sur., 2013). Posljednjih godina potražnja za mliječnom kiselinom znatno se povećala zbog njene upotrebe kao monomera u proizvodnji polilaktične kiseline (PLA) (Abdel-Rahman i sur., 2013; Ouyang i sur., 2013), koji je biorazgradivi i biokompatibilni polimer koji ima široki spektar primjena (slika 2). Može se koristiti od pakiranja materijala i proizvodnje pjene (Abdel-Rahman i sur., 2013) pa sve do biomedicinskih uređaja (Lasprilla i sur., 2012). Mliječna kiselina može se dobiti fermentacijom ili kemijskom sintezom. Proizvodnja postupkom fermentacije privukla je interes zbog svojih prednosti, a to su proizvodnja čistih izomera L (+) - ili D (-) - mliječne kiseline, upotreba obnovljivih i jeftinih sirovina, mala potrošnja energije i blagi uvjeti potrebni za rad. Mliječnu kiselinu prvi je put otkrio u kiselom mlijeku 1780. švedski kemičar Scheele (Lima i sur., 2001). Fremy je 1839. godine provodio mliječnokiselinsku fermentaciju raznih ugljikohidrata, poput šećera, mlijeka, škroba i dekstrina (Holten i sur., 1971). Pasteur je 1857. godine otkrio da mliječna kiselina nije komponenta mlijeka, već metabolit koji određeni mikroorganizmi proizvode fermentacijom (Benninga, 1990). U posljednjih nekoliko desetljeća proizvodnja mliječne kiseline znatno se povećala ponajprije zbog razvoja novih namjena i proizvoda. Procijenjeno je da je globalna potražnja za mliječnom kiselinom u 2013. godini iznosila 714,2 kilotona, a očekuje se da će godišnje rasti za 15,5 % da bi dosegla 1960 kilotona do 2020. godine (Abdel-Rahman i Sonomoto, 2016). Tri najveća potrošačka tržišta na svijetu su SAD (31 % ukupne potrošnje mliječne kiseline u 2013. godini), zatim Kina i zapadna Europa. Kina je nadmašila zapadnu Europu zbog izvozne potražnje, kao i potrošnje u industriji hrane i pića. Svjetski vrh tri proizvođača mliječne kiseline, a to su Purac, Cargill i Henan Jindan Lactic Acid Technology Co., Ltd., 2013. godine pohvalili su se kombiniranim kapacitetom od 505 000 tona. Cargill uglavnom dobavlja proizvode s mliječnom kiselinom svojoj podružnici - NatureWorks za proizvodnju polilaktične kiseline (PR Newswire, 2016). Američko Ministarstvo energetike izdalo je 2010. godine izvješće o kemikalijama koje se smatraju potencijalnim gradivnim blokovima za budućnost, a mliječna kiselina je bila uključena (Jong i sur., 2012).



Slika 2. Upotreba mliječne kiseline u svijetu (The Essential Chemical Industry, Online 2013)

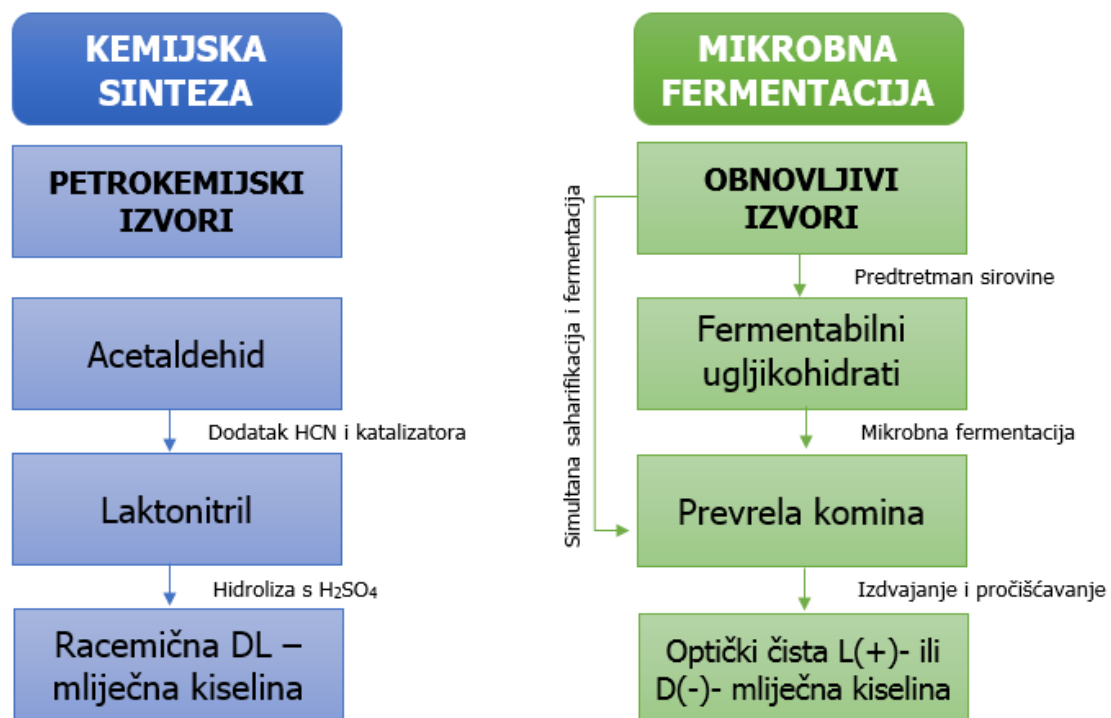
Mliječna kiselina je žuta do bezbojna tekućina (pri 15 ° C i atmosferskom tlaku) i nema mirisa. To je najjednostavnija hidroksikarbonska kiselina. Mliječna kiselina je i alkohol i kiselina, a ima asimetrični ugljik koji daje optičku aktivnost. Može se naći u dva optički aktivna oblika, L (+) - mliječna kiselina i D (-) - mliječna kiselina, ili u racemičnom obliku, koji je smjesa L (+) - mliječne kiseline i D (-) - mliječne kiseline. Dva izomera imaju ista fizikalna svojstva (točka topljenja, topljivost, konstanta disocijacije, gustoća, itd.) i ista kemijska svojstva, osim kada su u reakcijama u kojima su prisutni i drugi spojevi s optičkom aktivnošću. Jedna od posljedica tih reakcija je poteškoća u odvajanju spojeva tradicionalnim tehnikama (kromatografija, destilacija i kristalizacija). Stoga je potrebno odabrati odgovarajuće tehnike odvajanja pri upotrebi tvari s optičkom aktivnošću. Čisti izomeri imaju veću vrijednost od racemične smjese jer se koriste za određene industrijske primjene, npr. L (+) - mliječna kiselina koristi se u sintezi L (+) - polilaktične kiseline, biorazgradivog polukristalnog i duromernog polimera. Druga primjena je proizvodnja D (-) - polilaktične kiseline, gdje se koristi D (-) - izomer mliječne kiseline. Uz to, izomeri se različito ponašaju u živim tkivima. L (+) - mliječna kiselina se češće nalazi u živim organizmima od D (-) - mliječne kiseline. U ljudskom tijelu samo L (+) - mliječna kiselina nastaje tijekom kontrakcije mišića. Za primjenu u hrani i u medicini je poželjna L (+) - mliječna kiselina jer je metabolička pretvorba L (+) - mliječne kiseline u tijelu brža od D (-) - mliječne kiseline. U proizvodnji mliječne kiseline kemijskom sintezom dobiva se racemična smjesa, gdje su koncentracije izomera jednake, dok fermentacija omogućuje proizvodnju jednog izomera u većoj količini (Castillo Martinez i sur., 2013).

Mliječna kiselina ima širok spektar primjene u proizvodnji kemikalija, farmaceutskih proizvoda i hrane, a preteča je nekoliko proizvoda. U prehrambenoj industriji, koja čini velik dio potražnje (35 %), mliječna kiselina ima brojne svrhe. Koristi se kao sredstvo za zakiseljavanje zbog blagog kiselog okusa u usporedbi s drugim kiselinama koje se koriste u hrani, te kao konzervans u maslinama i ukiseljenom povrću. Također se koristi kao aroma, pH regulator i inhibitor preostalih bakterija u preradi hrane, poput slatkiša, kruha, bezalkoholnih pića, piva i drugih proizvoda. Neophodan je sastojak i fermentirane hrane, poput jogurta, maslaca i konzervi povrća. Mliječna kiselina ima primjenu u industriji štavljenja kože, u procesima uklanjanja kamenca, u tekstilnoj industriji kao sredstvo za vezivanje boje, a može zamijeniti etilen glikol u antifrizu, što rezultira većom učinkovitošću i nižim troškovima. U kemijskoj industriji, mliječna kiselina može se prevesti u etanol, propilen glikol i akrilne polimere. Derivati mliječne kiseline, soli i esteri koriste se kao otapala, emulgatori i plastifikatori. Mliječna kiselina se također koristi u proizvodnji propilen oksida, acetaldehida, akrilne kiseline, propionske kiseline, 2,3-pentandiona, etil laktata, laktida i polilaktične kiseline. U farmaceutskoj industriji mliječna kiselina se koristi u implantatima, tabletama, dijalizi, kirurškim šavovima i kontroliranim sustavima za otpuštanje lijekova. U kozmetičkoj industriji mliječna kiselina se koristi u proizvodnji higijenskih i estetskih proizvoda zbog rehidratirajućeg, antimikrobnog i pomlađujućeg djelovanja na kožu. Također se koristi u proizvodima za oralnu higijenu (Castillo Martinez i sur., 2013). Razvijene su nove primjene za mliječnu kiselinu, poput proizvodnje biorazgradivog i biokompatibilnog PLA polimera (Abdel-Rahman i sur., 2013), otapala, i oksigeniranih kemikalija. Proizvodnja polimera čini najveći udio mliječne kiseline potražnje za kiselinom (39 %). Kod proizvodnje polimera, voda se uklanja iz mliječne kiseline u prisutnosti kiselinskih katalizatora kako bi se stvorili laktidi. Laktidi se polimeriziraju kako bi se dobio biorazgradivi termoplastični polimer, PLA. Sve je veća potražnja za derivatima PLA koji zamjenjuju konvencionalne plastične materijale, kao i za upotrebu u materijalima za medicinske uređaje (Gao i sur., 2011). L (+) - mliječna kiselina osigurava visok prinos laktida, koji zauzvrat daje polimere s visokim molekulskim masom, visokim stupanjem kristaličnosti i velikom vlačnom čvrstoćom. Ti polimeri su prozirni, što je važno za pakiranje; imaju duge vijekove trajanja jer polako se razgrađuju hidrolizom (koja se može kontrolirati sastavom i molekulom masom polimera), a njihove su karakteristike slične polimerima dobivenim iz fosilnih goriva. Polimeri mliječne kiseline imaju prednost nad uobičajenim polimerima jer se proizvode iz obnovljivih izvora ugljikohidrata. Ostala željena svojstva mogu se dobiti kopolimerizacijom s drugim monomerima kisika. Veliki je broj patenata i članaka o polimerima mliječne kiseline objavljen posljednjih godina (Li i sur., 2012).

Iako se potražnja za PLA proširila, njegov trenutni proizvodni kapacitet od 450 milijuna kg godišnje se ne može mjeriti s ukupno 200 milijardi kg plastike proizvedene godišnje. Ovaj niski obujam proizvodnje uglavnom je posljedica visokih troškova proizvodnje. U industrijskim razmjerima, ciljani proizvodni troškovi monomera mliječne kiseline manji je od 0,8 američkih dolara po kg, jer se prodajna cijena PLA mora smanjiti otprilike za polovicu svoje trenutne cijene od 2,2 američka dolara po kilogramu da bi se mogao natjecati s plastikom dobivenom iz fosilnih goriva (Wee i sur., 2006). Većina troškova proizvodnja PLA povezana je s troškovima proizvodnje monomera mliječne kiseline. Upotreba mliječne kiseline u proizvodnji zelenih otapala, koja su ekološki prihvatljiva otapala, drugo je područje za potencijalni rast. Konkretno, korištenje laktatnih estera u formulaciji pesticida i drugih bioaktivnih komponenata zbog njegove niske razine toksičnosti ima visok potencijal za rast. Kemijski derivati kisika iz mliječne kiseline široko se proizvode i uključuju propilen glikol, propilen oksid, akrilnu kiselinu i akrilatne estere (Datta i Henry, 2006). Iako postoji širok spektar primjena, upotreba mliječne kiseline i dalje je ograničena konačnim proizvodnim troškovima povezanim s procesima izdvajanja, koji su odgovorni za 30 % do 40 % ukupnih troškova proizvodnje mliječne kiseline (López-Garzón i Straathof, 2014).

Svjetska proizvodnja mliječne kiseline iz mikrobiološke fermentacije čini oko 90 % ukupne proizvodnje mliječne kiseline (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000) i privukla je zanimanje zbog svojih brojnih prednosti u usporedbi s kemijskom sintezom, poput proizvodnje čistih izomera i korištenja obnovljivih izvora za hranjive podloge (slika 3). Proces fermentacije karakterizira biološka razgradnja supstrata (glukoza) pomoću mikroorganizama u metabolite, kao što su etanol, limunska kiselina i mliječna kiselina (Silveira, 2009). Proizvod fermentacije visoke čistoće dobiva se kada se koristi čisti supstrat, poput saharoze iz šećerne trske i šećerne repe, što rezultira smanjenjem troškova pročišćavanja. Nažalost, visoka cijena šećera čini ga neizvedivim za upotrebu. Međutim, mogu se koristiti otpadni proizvodi iz prehrambene industrije, poljoprivredne industrije, mlinova za šećernu trsku i biomase, što je s ekološkog i ekonomskog stanovišta isplativo. Trošak sirovina jedan je od glavnih čimbenika u ekonomskoj proizvodnji mliječne kiseline. Budući da se povećanjem mjerila ne može smanjiti trošak podloge, opsežne studije trenutno se bave istraživanjem novih podloga za proizvodnju mliječne kiseline (Abdel-Rahman i sur., 2013). Škrobni materijali, poput pšenice, kukuruza, kukuruza, kasave, krumpira, riže, raži, ječma (Li i sur., 2012; Wang i sur., 2010) potencijalna su sirovina za proizvodnja mliječne kiseline (tablica 1). Prednosti su u tome što kod škrobnih materijala ne dolazi do inhibicije visokim koncentracijama glukoze (Nakano i sur., 2012). Otprilike 90 %

komercijalno dostupne mliječna kiselina proizvodi se submerznim vrenjem kukuruza (Wang i sur., 2016). Lignocelulozna biomasa također je obećavajući izvor za proizvodnju mliječne kiseline jer predstavlja najrasprostranjeniji globalni izvor biomase (Eom i sur., 2015; Hu i sur., 2015). Može se koristiti za dobivanje otopina šećera koje mogu biti iskorištene za proizvodnju mliječne kiseline kroz sljedeće korake: (a) predobrada za razgradnju lignocelulozne strukture, (b) enzimatska hidroliza za depolimerizaciju lignoceluloze do fermentacijskih šećera i (c) fermentacija šećera do mliječne kiseline (Idler i sur., 2015). Iako su troškovi lignoceluloze niski, korak predobrade čini cijeli postupak ekonomski neisplativim. To se događa iz sljedećih razloga: (a) dodatni troškovi enzima i kemikalija, (b) inhibitorni spojevi nastali tijekom kemijske hidrolize (npr. furfural, 5-hidroksimetilfurfural i neke organske kiseline) koji su inhibiraju mikroorganizme koji se koriste u fermentaciji, (c) proizvodnja različitih šećera kao što su pentoze, koje ne može fermentirati većina sojeva proizvođača. Da bi se prevladali ovi izazovi, velik interes predstavlja izravna konverzija polimernih šećera (Abdel-Rahman i Sonomoto, 2016). Uz to, hidrotermalna obrada jedna je od najjednostavnijih i najperspektivnijih metoda. U tom se postupku kao reakcijski medij koristi samo vruća voda, smanjujući troškove rada i održavanja (Eom i sur., 2015).



Slika 3. Pregled dviju proizvodnih metoda mliječne kiseline, kemijske sinteze i mikrobne fermentacije (Komesu i sur., 2017)

Tablica 1. Proizvodnja mliječne kiseline pomoću različitih mikroorganizama iz različitih supstrata (Komesu i sur., 2017)

Supstrat	Mikroorganizam	Vrsta procesa	Mliječna kiselina			Referenca
			Koncentracija (g L ⁻¹)	Prinos (g g ⁻¹)	Produktivnost (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
vlakna lucerne	<i>Lb. plantarum</i>	šaržno	46,4	0,46	0,64	Sreenath i sur., 2001
jabučni trop	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	šaržno	32,5	0,88	5,41	Gullón i sur., 2008
otpaci u preradi manioke	<i>Lb. delbrueckii</i> NCIM 2025	šaržno	81,9	0,94	1,36	John i sur., 2009
celobioza	<i>E. mundtii</i> QU 25	šaržno	119	0,83	1,12	Abdel-Rahman i sur., 2011
celobioza	<i>Lb. delbrueckii</i> mutant Uc-3	šaržno	90	0,90	2,25	Adsul i sur., 2007
celuloza	<i>B. coagulans</i> 36D1	šaržno s pritokom	80	0,80	0,30	Ou i sur., 2011
sirutka	<i>Lb. casei</i> NRRL B-441	šaržno	96	0,93	2,2	Büyükkileci i Harsa, 2004
kukuruzno sijeno	<i>B. coagulans</i> LA204	šaržno s pritokom	97,59	0,68	1,63	Hu i sur., 2015
melasa iz klipa kukuruza	<i>Bacillus</i> sp. soj	šaržno s pritokom	74,7	0,50	0,38	Wang i sur., 2010
glukoza	<i>Lb. lactis</i> BME5-18M	šaržno s pritokom	210	0,97	2,2	Bai i sur., 2003
glicerol	<i>E. coli</i> AC-521	šaržno	56,8	0,88	0,94	Hong i sur., 2009
hidrolizati lignoceluloze	<i>Bacillus</i> sp. NL01	šaržno s pritokom	75	0,75	1,04	Ouyang i sur., 2013
papirni mulj	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	šaržno	73	0,97	2,90	Marques i sur., 2008
otpaci šećerne trske	<i>Lc. lactis</i> IO-1	šaržno	10,9	0,36	0,17	Laopaiboon i sur., 2010
hidrolizat mekinja bijele riže	<i>Lb. rhamnosus</i> LA-04-1	šaržno	82	0,81	3,73	Li i sur., 2012
hidrolizat drveta	<i>E. faecalis</i> RKY1	šaržno	93	0,93	1,7	Wee i sur., 2004

2.2.1. Vođenje procesa i izolacija mliječne kiseline

Mikroorganizmi koji se koriste u fermentaciji mogu se podijeliti u dvije skupine: bakterije i plijesni (Wee i sur., 2006). Izbor vrste mikroorganizama ovisi prvenstveno o ugljikohidratima koje treba fermentirati, s obzirom da se metabolizam mikroorganizma razlikuje na različitim izvorima ugljika (Lunelli, 2010).

Mliječna kiselina se obično proizvodi šaržnim postupkom, ali također se mogu koristiti kontinuirani i šaržni uzgoj s pritokom. Fermentacija u šaržnom načinu ima superiornu konverziju i prinos u usporedbi s kontinuiranom fermentacijom, ali je volumetrijska produktivnost niža. U šaržnom postupku sav se supstrat iskoristi, dok u kontinuiranom procesu postoji određena koncentracija supstrata na kraju procesa. Najveća moguća produktivnost za kontinuiranu fermentaciju se postiže visokom brzinom razrjeđenja i dugotrajnim vođenjem procesa. Izbor načina rada ovisi o cijeni supstrata i kapitalne investicije. Ako je supstrat skup, prinos se maksimalizira, bilo šaržnim ili polukontinuiranim radom. Ako su troškovi ulaganja visoki, volumetrijska produktivnost se maksimalizira kontinuiranim radom (John i sur., 2007). Visoka volumetrijska produktivnost se postiže recikliranjem stanica, što rezultira velikom gustoćom stanica s potpunom konverzijom glukoze (Ohleyer i sur., 1985). Proizvodnja ostalih organskih kiselina tijekom fermentacije mliječne kiseline ovisi o čistoći i kvaliteti inokuluma, metaboličkom putu koji se koristi i uvjetima procesa, koji bi trebali spriječiti vanjsku kontaminaciju. Nusproizvodi, poput octene kiseline, mravlje kiseline, ugljikovog dioksida i etanola mogu nastati, ali za učinkovitu proizvodnju mliječne kiseline, nastajanje nusproizvoda treba izbjegavati ili svesti na najmanju moguću mjeru (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000).

Osim izvora supstrata i mikroorganizma, parametri koji mogu utjecati na učinkovitost fermentacije su pH i temperatura medija, dušik i izvori vitamina, postupak fermentacije i sinteza nusproizvoda. pH fermentacije opada kako raste koncentracije proizvedene mliječne kiseline. Za kontrolu pH u medij se dodaje baza, poput kalcijevog karbonata, kalcijev hidroksid ili natrijev hidroksid, jer je u kiselom mediju proizvodnja mliječne kiseline ili nula ili minimalna. Kontrola pH može se izvršiti i ekstrakcijom, adsorpcijom ili elektrodijalizom mliječne kiseline (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000). Nekoliko studije pokazuju da je pH vrijednost od približno 6,5 optimalni pH za rast i proizvodnju mliječne kiseline (Silveira, 2009). pH ispod 5,7 optimalan je samo za sojeve *Lactobacillus*, za koje je poznato da podnose niže pH vrijednosti od bakterija iz roda *Lactococcus* (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000). Proces šaržne fermentacije pri kontroliranom pH značajno poboljšava proizvodnju, prinos i produktivnost mliječne kiseline kod različitih sojeva bakterija mliječne kiseline, npr.

Lactobacillus delbrueckii, *Enterococcus mundtii* QU 25 i *Enterococcus faecium* (Abdel-Rahman i sur., 2011). Temperatura je važan parametar za rast bakterija (Silveira, 2009) i odnosi se na kinetičke parametre rasta, proizvodnju mliječne kiseline i potrošnju supstrata. Većina studija produktivnosti mliječne kiseline provedena je na temperaturama u rasponu od 30 do 43 °C (Abdel-Rahman i sur., 2011). Izvori dušika i vitamini važni su prvenstveno zbog ograničenih mogućnosti bakterija za sintezu vitamina B skupine. Glavni izvori dušika su ekstrakt kvasca i amonijev sulfat. Na industrijskoj razini, upotreba ekstrakta kvasca ima visoku cijenu, iako je najbolja za uzgoj bakterija mliječne kiseline. Amonijev sulfat je praktična alternativa, ponajviše zbog nižih troškova. Jeftini dodaci izvora dušika (npr. brašno graška, crvene leće, crnog slanutka, soje, pekarski kvasac) ispitivani su kako bi zamijenili komercijalni ekstrakt peptona i kvasca (Altaf i sur., 2007). Dodavanje ostalih hranjivih sastojaka u podlogu općenito pozitivno utječe na proizvodnju mliječne kiseline; izvori uključuju pepton i ekstrakt mesa (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000).

Procesi izdvajanja ključni su za kemijsku i njoj povezane industrije. Približno 40 % do 70 % operativnih i kapitalnih troškova čine postupci izdvajanja (Wankat, 2007). U procesima proizvodnje mliječne kiseline, razvoj učinkovitih metoda izdvajanja i pročišćavanja mliječne kiseline iz komine je izuzetno važno za ekonomsku održivost. Iako je razlika između vrelišta mliječne kiseline i vode relativno velika, gotovo je nemoguće dobiti čistu kristalnu mliječnu kiselinu. To je zato što mliječna kiselina ima visok afinitet za vodu i dimer laktata nastaje kada su koncentracije mliječne kiseline dovoljno visoke (Lunelli, 2010). Klasični postupak izdvajanja mliječne kiseline uključuje niz operacija poput taloženja, filtracije, zakiseljavanja, adsorpcije na ugljen, isparavanja, kristalizacije i drugih (Pal i sur., 2009). Broj daljnjih koraka obrade značajno utječe na kvalitetu i cijenu proizvoda (Idler i sur., 2015). Dostupni izvori pružaju samo ograničene podatke o postupcima izdvajanja industrijskih proizvoda (Idler i sur., 2015). Došlo je do napretka tehnologije pročišćavanja i danas se mogu dobiti učinkoviti prinosi i čistoća mliječne kiseline, ali još uvijek postoje mnogi nedostaci. U procesu taloženja nedostaci uključuju visoku cijenu reagensa i potrebu filtracije i drugih postupaka odvajanja, posebno kada je potreban proizvod veće čistoće. S ekološkog stajališta, stvaranje velike količine otpadne vode glavni je nedostatak. Nadalje, za proizvodnju jedne tone mliječne kiseline, potrebna je približno jedna tona jeftinog kalcijevog sulfata (Pal i sur., 2009), koji predstavlja ozbiljan problem u pogledu obrade otpada. U ekstrakciji pomoću otapala, potrebna je velika dodirna površina između faza što zahtijeva skupu opremu. Ekstraktivna fermentacija *in situ* ograničena je reciklacijom otapala u postupku stripiranja i visokom toksičnošću otapala za mikroorganizme

(Gao i sur., 2009). Membranski procesi izdvajanja su obećavajuće tehnologije, ali visoka cijena membrana i problemi polarizacije i začepjenja ograničavaju uporabu procesa elektrodijalize u velikim razmjerima. Posljednjih godina provedena su mnoga istraživanja koja pokušavaju riješiti probleme uobičajenog procesa izdvajanja korištenjem netradicionalne destilacijske separacije, primjerice reaktivne destilacije (Lunelli i sur., 2010) i molekularne destilacije (Wei i sur., 2004). Još jedan mogući pristup je izravna fermentacija organskih laktata, kao što su amonijevi laktati (piperazinijev dilaktat, imidazol laktat i heksametilendiamin dilaktat) za proizvodnju mliječne kiseline visoke čistoće (Idler i sur., 2015).

Ionska izmjena široko se koristi u bio-separacijama. Adsorbens mliječne kiseline mora posjedovati važne karakteristike visokog kapaciteta i selektivnosti za mliječnu kiselinu nad vodom i supstratom, regenerabilnost i biokompatibilnost s mikroorganizmima. Nedavno je istraženo mnogo različitih adsorbenata za uklanjanje mliječne kiseline iz fermentacijske komine, poput poli (4-vinilpiridin) smole (PVP), Reillex 425, MWA-1, VI-15, Amberlite IRA-400, IRA-420, IRA- 900, IRA-92, IRA-35 i IRA-96, itd. (Amrane i sur., 2009). Nekoliko radova izvijestilo je da je smola IRA-67 koristan adsorbens za ekstrakciju mliječne kiseline ili neke druge organske kiseline (Bayazit i sur., 2010). Međutim, malo je sustavnih studija provedeno na mehanizmu i učinkovitosti adsorpcije mliječne kiseline pod različitim radnim uvjetima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam u ovom radu tijekom istraživanja je bila termofilna bakterija *Bacillus smithii* DSM 460 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije korištene u ovom radu

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
tripton	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	≥ 98 %	Kemika, Hrvatska
amonijev acetat	≥ 98 %	Merck KGaA, Njemačka
amonijev sulfat	≥ 99 %	Honeywell, SAD
mravlja kiselina	≈ 98 %	Honeywell, SAD
octena kiselina	99,5 %	Avantor, SAD
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	99 %	Honeywell, SAD
borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
cinkov klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev tartarat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
etanol	96 %	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
natrijev hidroksid	≥98 %	Merck KGaA, Njemačka
sumporna kiselina	96 %	Merck KGaA, Njemačka
agar	tehnički	Biolife, Italija
DL-mliječna kiselina	85 %	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Hranjive podloge

Za održavanje radne kulture, proizvodnju inkuluma i uzgoje provedene u Erlenmeyerovim tikvicama i bioreaktorima koristile su se podloge sastava napisanim u tablicama 3-5.

Sastav podloge za uzgoj inkuluma bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 prikazan je u tablici 3. Čvrsta podloga za održavanje radne kulture istog je sastava kao podloga za uzgoj inkuluma uz dodatak agara u koncentraciji 15 g L⁻¹. Sastav podloga za uzgoje ove bakterije u tikvicama i bioreaktoru prikazane su u tablici 4, a koncentracije elemenata u tragovima koje su dodavane u sve podloge za uzgoje provedene u tikvicama i bioreaktoru prikazane su u tablici 5. U bioreaktorima se koristila podloga koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa dobivenog tretmanom slabom kiselinom u visokotlačnom reaktoru te je prikazan u tablici 4. Predtretmani lignoceluloznih sirovina i dobivanje hidrolizata nisu bili dio ovog rada. Sastav hidrolizata dobiven je tijekom istraživanja na projektu "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina " (HRZZ-9717).

Tablica 3. Sastav izvora dušika i ugljika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj inkuluma bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

Tvar	Koncentracija [g L⁻¹]
mesni ekstrakt	3
pepton	5
glukoza	1

Tablica 4. Sastav soli, faktora rasta te izvora ugljika i dušika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u tikvicama

Kemikalija	tikvica			bioreaktori*
	podloga 1	podloga 2	podloga 3	podloga 4
	γ [g L ⁻¹]			
glukoza	15	-	10	24
ksiloza	-	15	10	11
kvašćev ekstrakt	5	5	5	5
pepton	5	5	5	5
magnezijev sulfat heptahidrat	0,2	0,2	0,2	0,2
kalijev dihidrogenfosfat	3,5	3,5	3,5	3,5
kalijev hidrogenfosfat	2,5	2,5	2,5	2,5
amonijev acetat	5	5	5	5
amonijev sulfat	4	4	4	4
mravlja kiselina	-	-	-	0,5
octena kiselina	-	-	-	0,8

*bioreaktor s miješalom, HRCB

Tablica 5. Koncentracije elemenata u tragovima za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

Tvar	Koncentracija [g L ⁻¹]
željezov sulfat heptahidrat	2,500
kobaltov klorid heksahidrat	0,075
bakrov sulfat pentahidrat	0,031
borna kiselina	0,258
cinkov klorid	0,021
natrijev molibdat dihidrat	0,023
natrijev tartarat dihidrat	2,100
manganov klorid dihidrat	1,800

3.1.4. Aparature i uređaji

3.1.4.1. Spektrofotometar

Pomoću spektrofotometra „Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies“ određivana je promjena optičke gustoće hranjive podloge kao indirektnog pokazatelja rasta stanica bakterije *Bacillus smithii* DSM 460. Izuzete suspenzije su homogenizirane i prebačene u staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Optička gustoća 0. razrijeđenja suspenzije bakterijske biomase određivana je pri valnoj duljini od 600 nm.

3.1.4.2. Centrifuga

Za izdvajanje bakterijske biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga „Harrier 18/80, Sanyo“ pri broju okretaja od 8000 o min⁻¹, a za pripremu uzoraka za UPLC centrifuga „Witeg CF-10“ pri broju okretaja od 10000 o min⁻¹.

3.1.4.3. Vage

Analitička vaga „Shimadzu“, AX-200 W/O AC ECTA korištena je za određivanje suhe tvari biomase, dok se za sve ostale potrebe vaganja koristila tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211.

3.1.4.4. Sušionik

Za sušenje centrifugiranih uzoraka s bakterijskom biomasom izuzetih tijekom rasta stanica korišten je sušionik „Instrumentaria ST-50“.

3.1.4.5. Termostatirana tresilica za mikrobiološke uzgoje

Za istraživanje utjecaja temperature i vrste izvora ugljika na rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 te pripremu inokuluma korištena je termostatirana tresilica za mikrobiološke uzgoje BIOSAN (Environmental shaker incubator ES 20/60). Tresilica je zatvorenog tipa s automatskom kontrolom temperature u rasponu od 10 do 80 °C i kontrolom broja okretaja u rasponu od 50 do 250 o min⁻¹.

3.1.4.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)

Tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), određene su koncentracije supstrata i produkata fermentacije (slika 4). Uređaj se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (**OpenLAB CDS**). Kao mobilna faza korištena

je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL , a protok mobilne faze 0,6 mL min^{-1} .



Slika 4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)

3.1.4.7. Bioreaktor s miješalom

Za proces šaržnog uzgoja nesumpornih ljubičastih bakterija korišten je laboratorijski bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka) izrađen od nehrđajućeg čelika ukupnog volumena 30 L (slika 5). Maksimalna brzina rotacije miješala je 3000 min^{-1} . Miješalo pokreće elektromotor snage 0,9 kW. Miješalo se sastoji od tri turbine koje se mogu postaviti na različite udaljenosti od podnice reaktora. Svaka turbina ima po 6 ravnih lopatica. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom s ugrađenim sustavom za mjerenje i praćenje osnovnih parametara procesa: temperatura, pH, brzina okretaja miješala, te parcijalni tlak kisika u reaktoru. Hranjiva podloga se sterilizira zajedno s bioreaktorom pomoću indirektno vodene pare preko dvostrukog plašta. Bioreaktor ima izlaz za izuzimanje uzoraka koji se može sterilizirati parom, kao i in situ sterilizabilan izlaz za pražnjenje reaktora (Matoković, 2020).



Slika 5. Bioreaktor s miješalom Biostat Cplus s regulacijom pH i temperature

3.1.4.8. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) se sastoji od nosača, bioreaktora izrađenog od nehrđajućeg čelika, elektromotora i kontrolne jedinice (slika 6). Nosač bioreaktora podupire posudu bioreaktora čime omogućava njenu rotaciju preko osovine koju pokreće elektromotor. Kontrolna jedinica omogućuje regulaciju broja okretaja bioreaktora i intervalno uključivanje/isključivanje rotacije. Bioreaktor se rotira pomoću elektromotora snage 0,9 kW. Maksimalni broj okretaja reaktora iznosi 60 min^{-1} . Opisani bioreaktor nema regulaciju temperature i pH vrijednosti, a ukupni volumen iznosi 30 L. Bioreaktor ima ugrađena dva lopatasta miješala duljine 0,6 m i širine 0,04 m učvršćena na unutrašnju stijenku bioreaktora. Sterilizacija se provodi direktnom parom. Bioreaktor ima dva mjesta za izuzimanje uzoraka: za izuzimanje tekuće faze i za izuzimanje čvrste faze.



Slika 6. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

3.1.4.9. Ostala oprema

Od ostalog laboratorijskog pribora korišteno je stakleno i plastično posuđe, plamenici, vorteks miješalica, magnetna miješalica, autoklav i zamrzivač za čuvanje uzoraka na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema podloge

Za uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 koristilo se 3 vrste hranjivih podloga: kemijski definirana podloga za uzgoj inokuluma, kemijski definirane podloge s definiranim izvorima ugljika (glukoza ili/i ksiloza) za uzgoj u manjem volumenu te kemijski definirana podloga koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog troja dobiven pretretmanom slabom kiselinom ($0,5\text{ }\%$ H_2SO_4) u visokotlačnom reaktoru pri $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ te vremenu zadržavanja 10 minuta.

Podloge za uzgoj inokuluma su se pripremile tako da se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana masa potrebnih tvari sastava prema tablici 2. Čvrsta podloga za održavanje radne kulture istog je sastava kao podloga za uzgoj inokuluma uz dodatak agara u koncentraciji 15 g L^{-1} .

Hranjive podloge za istraživanje kinetike rasta bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na izvorima ugljika podrijetlom iz predobrađenih lignoceluloznih sirovina (glukoza ili/i ksiloza) pri temperaturama od 45 i 55 °C, pripremile su se na način da se u određen volumen demineralizirane vode dodala izračunata i odvagana masa potrebnih tvari sastava iz tablice 3. Pripremljena podloga se sterilizirala 20 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije u ohlađenu podlogu se sterilno dodalo 450 µL koncentrirane otopine elemenata u tragovima.

Hranjiva podloga za istraživanje kinetike rasta bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktorskim sustavima (bioreaktor sa miješalom i horizontalno rotirajući cijevni bioreaktor) pri različitim temperaturama pripremljena je prema tablici 2. Sastav podloge je istovjetan sastavu tekućeg hidrolizata otpadnog pivskog tropa, dobivenog je pretretmanom slabom kiselinom (0,5 % H₂SO₄) u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C te vremenu zadržavanja 10 minuta u sklopu istraživanja na projektu "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (HRZZ-9717). Kod pripreme podloge za bioreaktor s miješalom, sve krutine su prebačene u bioreaktor nakon čega se dodalo 5 L demineralizirane vode. Zatim je slijedila *in situ* sterilizacija u bioreaktoru tijekom 20 minuta pri 121 °C te se nakon hlađenja dodalo 15 mL elemenata u tragovima i podesila pH vrijednost na 6,5 te željena istraživana temperatura 45 ili 55 °C). Hranjiva podloga za uzgoj u HRCB se pripremala *ex situ* prema tablici 2, pripremljenoj podlozi se podesila pH vrijednost na 6,5 dodatkom 3 M otopine natrijevog hidroksida nakon čega se sterilizirala 20 minuta pri 121 °C u autoklavu. Nakon hlađenja podloge na željenu temperaturu (45 ili 55 °C), podloga se sterilno prebacila u HRCB te se dodalo sterilno preko filtera 15 mL otopine elemenata u tragovima. Temperatura podloge u HRCB-u se održavala pomoću grijalice smještene ispod bioreaktora, a regulacije pH nije bilo.

3.2.2. Nadzor procesa uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci po 5 mL iz svake tikvice ili bioreaktora. Iz svakog se uzorka na spektrofotometru očitavala adsorbancija na 600 nm za 0. razrjeđenje te po potrebi za 1. decimalno razrjeđenje. Nakon toga uzorak se centrifugirao na 8000 min⁻¹ 10 minuta. Supernatant je odvajan i korišten za analizu pomoću tekućinske kromatografije ultra djelotvornosti (u daljnjem tekstu UPLC), dok se izdvojena biomasa sušila te je nakon toga gravimetrijski određena masa nastale bakterijske biomase.

3.2.3. Određivanje optičke gustoće

Absorbancija uzoraka očitavana je na spektrofotometru, model „Cary 13E, Varian“ na valnoj duljini od 600 nm.

3.2.4. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase bakterija

U osušene i izvagane kivete otpipetirano je 4 mL uzorka koji je centrifugiran 10 minuta na 8000 min^{-1} . Supernatant je primijenjen za određivanje koncentracije izvora ugljika (glukoze i ksiloze). Kivete s talogom bakterijske biomase sušene su na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Ohlađene kivete vagane su na analitičkoj vagi, a dobivene mase biomase korištene su za određivanje njene koncentracije ($X \text{ [g L}^{-1}\text{]}$) prema slijedećoj ovisnosti;

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

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom,

m_{pk} - masa prazne suhe kivete,

V_{uz} - volumen uzorka

3.2.5. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Odmjereno je $750 \text{ }\mu\text{L}$ supernatanta uzoraka i dodano $750 \text{ }\mu\text{L}$ pripremljene 10 %-tne otopine ZnSO_4 čija je svrha vezati proteine i nečistoće nastale tijekom procesa. Sadržaj se dobro homogenizirao i ostavio 20 minuta u mirovanju. Nakon toga uzorci su centrifugirani na 10000 min^{-1} tijekom 5 min. Volumen od 1,5 ml nastalog supernatanta se filtrirao kroz mikrobiološki filter ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$, Sartorius) u staklenu vialu i tako pripremljen uzorak se koristio za UPLC analizu.

3.2.6. Uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

Hranjive podloge za inokulum i uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pripremile su se prema sastavu opisanom u tablicama 3 i 4 (podloga za pripremu inokuluma, kemijski definirane podloge za istraživanje kinetike rasta bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 s različitim izvorima ugljika te podloge za uzgoj u različitim biorektorskim sustavima).

Inokulum se pripremao prenošenjem porasle bakterijske biomase na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama pomoću mikrobiološke igle u tikvicu s 100 mL podloge za inokulum. Inokulum je uzgajan statično, na temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ u termostatu. Nakon 24 sata, 10 mL poraslog inokuluma je prebačeno u tikvice sa 150 mL podloge sastava opisanog u tablici 2, te je time započeo proces uzgoja bakterije. Tako pripremljene i inokulirane tikvice su stavljene na tresilicu te se uzgoj vodio pri 120 okretaja u minuti i na željenoj temperaturi (45 ili $55 \text{ }^\circ\text{C}$). Uzgoj se pratio tijekom vremena, uzorci uzimani u pravilnim razmacima te se pratila koncentracija šećera UPLC analizom te koncentracija biomase mikrobiološkim metodama.

Za uzgoj u bioreaktorskim sustavima, pripremljeno se 500 mL inokuluma, na isti način kao i kod uzgoja u manjem volumenu podloge. Svi uzgoji vođeni su na 45 °C ili 55 °C u mikroaerofilnim uvjetima. Kod uzgoja u bioreaktoru sa miješalom broj okretaja miješala iznosio je 250 okretaja u minuti kako bi se spriječila površinska aeracija te onemogućila taloženje bakterijske biomase. Tijekom uzgoja u horizontalno rotirajućem cijevnom bioreaktoru, broj okretaja bioreaktora bio je kontinuirano 12 okretaja u minuti.

3.2.7. Određivanje kinetike adsorpcije mliječne kiseline na ionsku smolu Amberlite IRA-67

Pripremljeno je 20 mL standarda mliječne kiseline u koncentracijama od 5, 10, 25 i 50 g L⁻¹ razrjeđivanjem određenog volumena 85 %-tne otopine mliječne kiseline deioniziranom vodom. U svaki standard dodano je 2 g slabo bazne izmjenjivačke smole Amberlite IRA-67 i magnetni miješač. Nakon 5, 10, 20, 30, 40 i 50 minuta je uzimano 1 mL uzorka kako bi se pratila preostala koncentracija mliječne kiseline u suspenziji. Kako bi se utvrdio utjecaj hranjive podloge na adsorpciju mliječne kiseline, pripremljeno je 20 mL otopina s 5, 10, 25 i 50 g L⁻¹ mliječne kiseline dodavanjem određenog volumena 85 %-tne otopine mliječne kiseline u hranjivu podlogu. Proces adsorpcije se odvijao pri 20, 30, 40 i 50 °C kako bi se odredio utjecaj temperature na kinetiku adsorpcije.

3.2.8. Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460

Za izračunavanje pokazatelja uspješnosti biotehnološkog procesa korištene su sljedeće jednadžbe:

1. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_o - S \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [2]$$

S_o = koncentracija supstrata na početku uzgoja

S = koncentracija supstrata na kraju uzgoja

2. Prinos mase biomase (Y_x)

$$Y_p = X - X_o \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3]$$

X_o - koncentracija biomase na početku uzgoja

X - koncentracija biomase na kraju uzgoja

3. Prinos mliječne kiseline (Y_{MK})

$$Y_{MK} = MK - MK_o \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [4]$$

MK₀ - koncentracija mliječne kiseline na početku uzgoja

MK - koncentracija mliječne kiseline na kraju uzgoja

4. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu ($Y_{MK/S}$)

$$Y_{MK/S} = \frac{MK - MK_0}{S_0 - S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [5]$$

5. Produktivnost proizvodnje biomase (P_r)

$$P_r = \frac{Y_p}{t_u} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad [6]$$

t_u - ukupno vrijeme trajanja uzgoja

Specifična brzina potrošnje supstrata (r_S ; h^{-1}), specifična brzina rasta (μ ; h^{-1}) i specifična brzina sinteze produkta (r_P ; h^{-1}), određene su kao reakcije prvog reda (Mardetko i sur., 2018; Holwerda i Lynd, 2013; Doran, 1998) iz eksperimentalnih podataka. Dobiveni podaci su linearizirani prema jednadžbama:

$$\ln S = \ln S_0 + r_S \cdot t$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t$$

$$\ln P = \ln P_0 + r_P \cdot t$$

te su r_S , μ i r_P određene kao koeficijent smjera pravca linearizirane regresijske funkcije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu proveden uzgoj termofilne bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na podlogama s različitim izvorima ugljika. Cilj je bio odrediti kinetiku rasta bakterije na izvorima ugljika koji potječu iz tretirane lignocelulozne sirovine (glukoza ili/i ksiloza), te testirati potencijal za proizvodnju mliječne kiseline tijekom rasta istraživanog mikroorganizma. Prvi dio istraživanja bio je usmjeren prema istraživanju potencijala glukoze ili/i ksiloze kao izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama, za rast i proizvodnju mliječne kiseline tijekom uzgoja istraživane bakterije, dok je drugi dio istraživanja bio usmjeren prema istraživanju mogućnosti rasta i proizvodnji mliječne kiseline na podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa te izolaciji mliječne kiseline pomoću adsorpcijske smole. Na grafovima je prikazana promjena koncentracija izvora ugljika, biomase te produkata tijekom uzgoja. Nakon rezultata slijedi rasprava i izračun pokazatelja uspješnosti procesa. U zadnjem poglavlju prikazani su rezultati istraživanja adsorpcije mliječne kiseline na smolu Amberlite IRA-67 u svrhu izolacije mliječne kiseline iz fermentiranih podloga.

U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pri 45 °C i 55 °C u tikvicama na podlozi s glukozom kao izvorom ugljika.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pri 45 °C i 55 °C u tikvicama na podlozi sa ksilozom kao izvorom ugljika.

U poglavlju 4.3. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pri 45 °C i 55 °C u tikvicama na podlozi s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika.

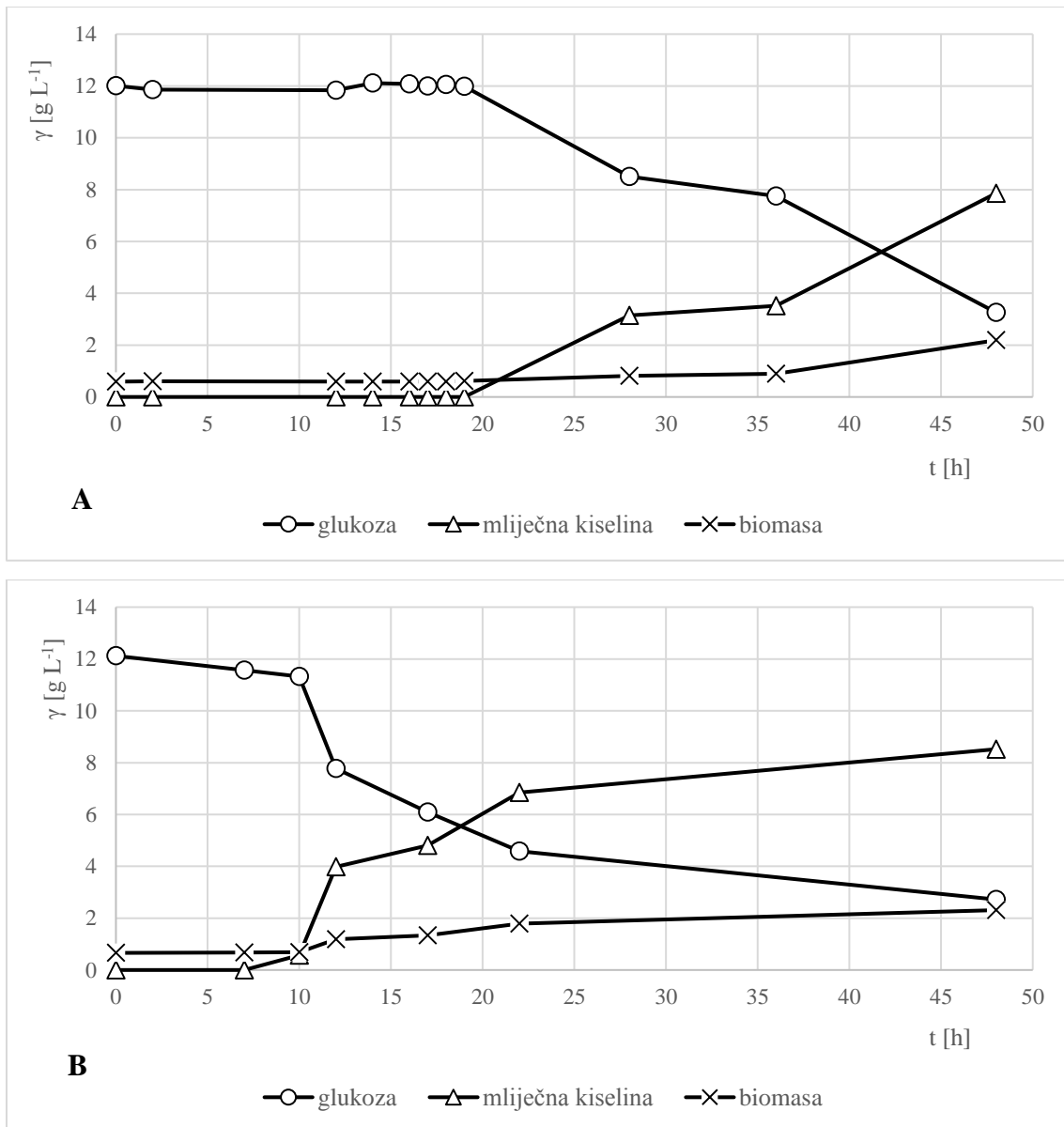
U poglavlju 4.4. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pri 40 °C i 45 °C na simuliranoj podlozi u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору.

U poglavlju 4.5. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 pri 45 °C i 55 °C na simuliranoj podlozi u bioreктору s miješalom.

U poglavlju 4.6. prikazani su rezultati adsorpcije mliječne kiseline na smolu Amberlite IRA-67.

4.1. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C U TIKVICAMA NA PODLOZI S GLUKOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA

U ovom setu eksperimenata istraživao se rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na podlozi s glukozom pri 45 °C i 55 °C radi moguće primjene u biotehnologiji – za proizvodnju mliječne kiseline. Sastav i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.1.3. i 3.2.1., a vođenje procesa u poglavlju 3.2.6. Rezultati su prikazani na slici 7 i tablici 6.



Slika 7. Promjena koncentracije glukoze, mliječne i octene kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom bez regulacije pH vrijednosti podloge na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) šaržnim postupkom pri temperaturi od (A) 45 °C i (B) 55 °C

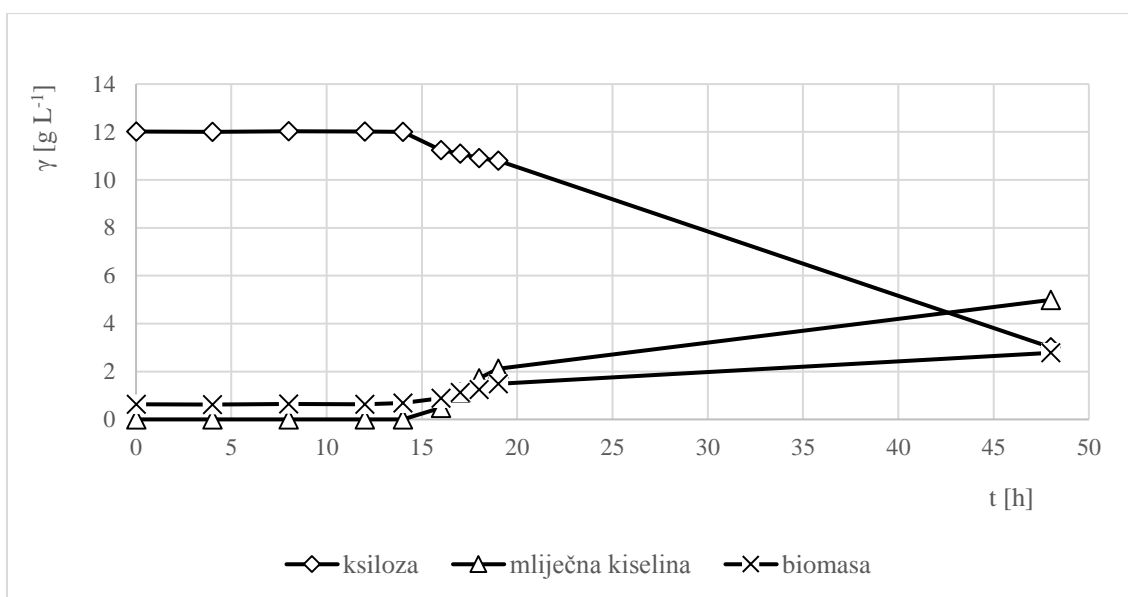
Tijekom uzgoja bakterije pri 45 °C utrošilo se od 8,751 g L⁻¹ glukoze u 48 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio 2,192 g L⁻¹. Najviša koncentracija mliječne kiseline postignuta je na kraju uzgoja kada je bila 7,864 g L⁻¹. Prinos acetata iznosio je 1,510 g L⁻¹. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosi 0,654 g g⁻¹ računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila 18. do 19. sata te je iznosila 0,388 g L⁻¹ h⁻¹. Ukupna produktivnost za mliječnu kiselinu iznosila je 0,164 g L⁻¹ h⁻¹.

Tijekom uzgoja bakterije pri 55 °C došlo je do potrošnje glukoze od 9,401 g L⁻¹ u 48 sati uzgoja. Prinos biomase iznosio je 2,312 g L⁻¹, a mliječne kiseline 8,520 g L⁻¹. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je 0,703 g g⁻¹ računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata bila je od 10. do 12. sata kada je iznosila 1,775 g L⁻¹ h⁻¹. Koncentracija acetata nije se značajnije mijenjala, na kraju uzgoja prinos je iznosio 0,975 g L⁻¹. Ukupna produktivnost iznosila je 0,178 g L⁻¹ h⁻¹. Specifična brzina potrošnje supstrata iznosila je 0,2 h⁻¹, specifična brzina rasta 0,55 h⁻¹, a specifična brzina sinteze produkta 0,52 h⁻¹.

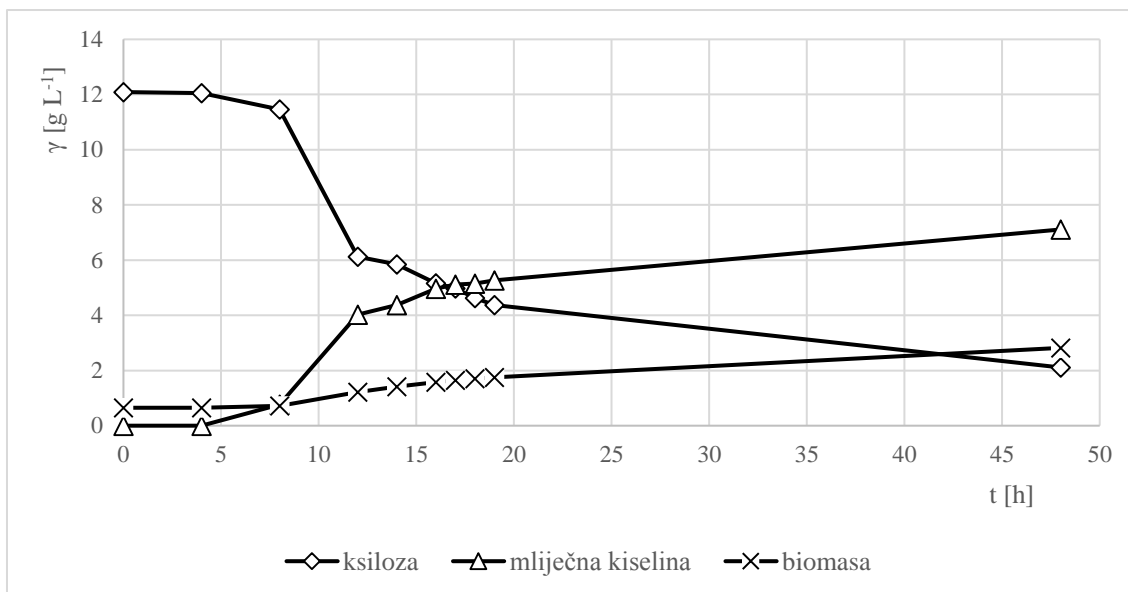
U ovim pokusima su dobivene niže vrijednosti koncentracije mliječne kiseline nego kod srodnih vrsta iz roda *Bacillus* gdje su postignute koncentracije od oko 15 g L⁻¹ (Ohara i Yahata, 1996).

4.2. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C U TIKVICAMA NA PODLOZI SA KSILOZOM KAO IZVOROM UGLJIKA

Ksiloza je ugljikohidrat koji se dobiva u višim koncentracijama tijekom pretretmana lignoceluloznih sirovina, pa je bilo zanimljivo istražiti potencijal ksiloze za uzgoj istraživanog mikroorganizma. U ovom setu eksperimenata istraživao se rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na podlogama s ksilozom kao izvorom ugljika pri 45 °C i 55 °C. Sastav i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.1.3. i 3.2.1., a vođenje procesa u poglavlju 3.2.6. Rezultati su prikazani na slici 8 i tablici 6.



Slika 8A. Promjena koncentracije ksiloze, mliječne kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi sa ksilozom bez regulacije pH vrijednosti podloge na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) šaržnim postupkom pri temperaturi od 45 °C



Slika 8B. Promjena koncentracije ksiloze, mliječne kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi sa ksilozom bez regulacije pH vrijednosti podloge na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) šaržnim postupkom pri temperaturi od $55 \text{ }^\circ\text{C}$

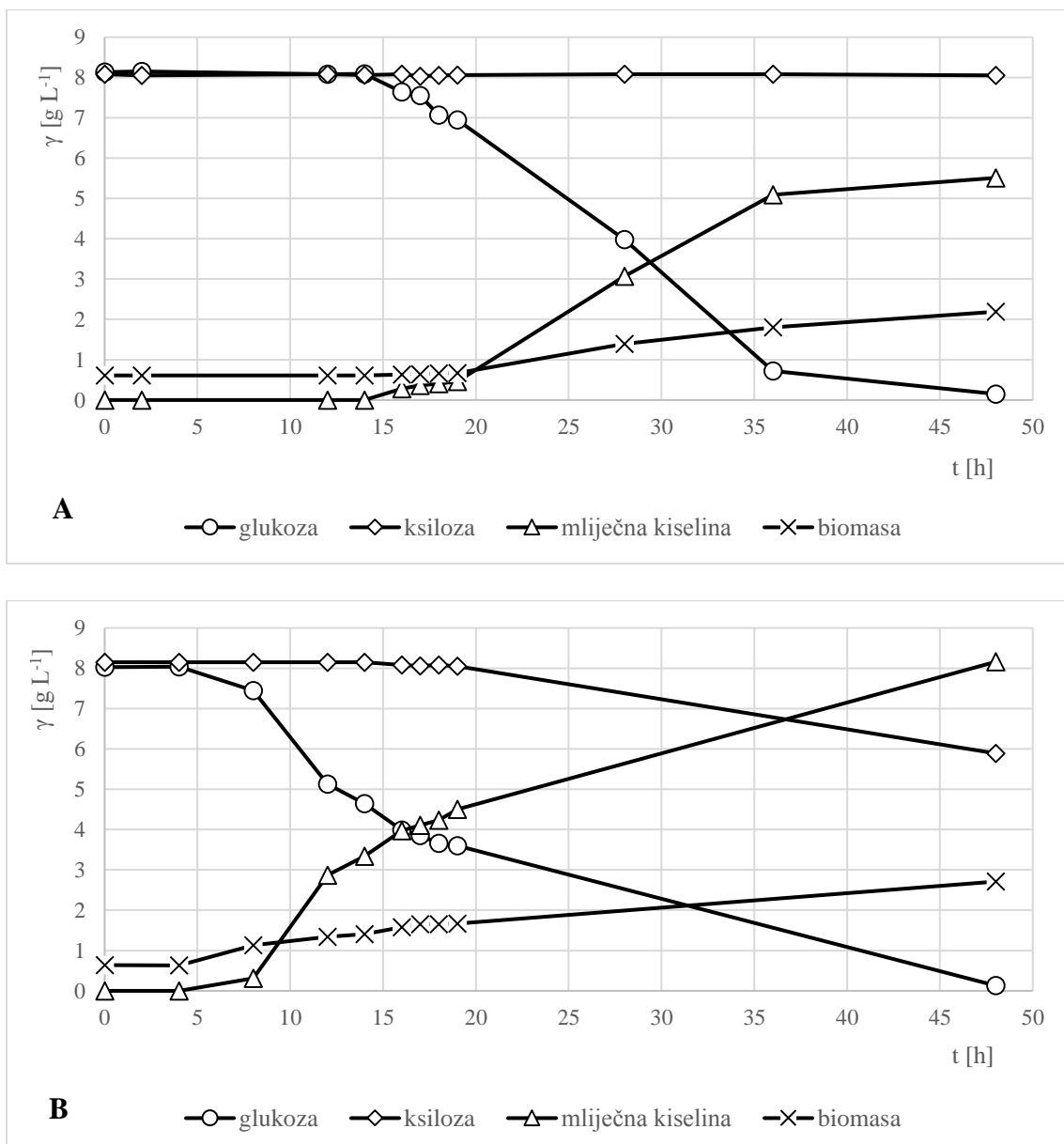
Tijekom uzgoja bakterije pri $45 \text{ }^\circ\text{C}$ na podlozi s ksilozom utrošilo se od $9,011 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze u 48 sati uzgoja. Prinos biomase je iznosio $2,783 \text{ g L}^{-1}$. U ovim uvjetima je došlo do povećane sinteze octene kiseline. Najveći prinos acetata zabilježen je na kraju uzgoja kada je iznosio $3,984 \text{ g L}^{-1}$. Koncentracija mliječne kiseline nakon 48 sati uzgoja iznosila je $4,992 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,554 \text{ g g}^{-1}$ računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 16. do 17. sata kada je iznosila $0,650 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ukupna produktivnost za mliječnu kiselinu iznosila je $0,104 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Što se tiče metaboličkog puta ksiloze, ona prvo izomerizira u ksilulozu pomoću ksiloza izomeraze, a zatim se ksiluloza fosforilira u ksilulozu-5-fosfat pomoću enzima ksiluloza kinaza. Nakon toga, fosfoketolaza katalizira reakciju između ksiluloze-5-fosfata i fosfata pri čemu nastaje acetil fosfat, gliceraldehid-3-fosfat i voda. Acetil fosfat fosforilira ADP pri čemu nastaje ATP, a kao nusprodukt ostaje acetat koji se nakuplja (Glenn i Smith, 2015).

Slično je primijećeno kod uzgoja srodne bakterije *Paenibacillus polymyxa* koja je proizvela više octene kiseline i manje butandiola iz ksiloze nego iz glukoze. Između ostalih proizvoda, na ksilozi je nastalo više acetata nego na glukozi ($0,38 \text{ g acetata po g ksiloze}$ i $0,05 \text{ g acetata po g glukoze}$). U stanicama uzgojenim na ksilozi utvrđena je veća aktivnost acetat kinaze i manja sposobnost unosa acetata u odnosu na stanice uzgojene glukozom. Nadalje, aktivnost fosfoketolaze bila je veća u stanicama uzgojenim ksilozom nego u stanicama uzgojenim glukozom (Marwoto i sur., 2004).

Tijekom uzgoja bakterije pri 55 °C utrošilo se 9,981 g L⁻¹ ksiloze. Prinos biomase bio je najveći na kraju uzgoja kada je iznosio je 2,826 g L⁻¹. Primijećena je veća sinteza mliječne kiseline nego na 45 °C, a postignuta je koncentracija od 7,112 g L⁻¹. Koeficijent pretvorbe supstrata u mliječnu kiselinu bio je 0,713 g g⁻¹ računato na dodani supstrat. Prinos acetata bio je 3,424 g L⁻¹. Maksimalna brzina potrošnje supstrata bila je od 4. do 8. sata kada je iznosila 1,333 g L⁻¹ h⁻¹. Ukupna produktivnost za mliječnu kiselinu iznosila je 0,148 g L⁻¹ h⁻¹. Specifična brzina potrošnje supstrata iznosila je 0,10 h⁻¹, specifična brzina rasta 0,49 h⁻¹, a specifična brzina sinteze produkta 0,46 h⁻¹.

4.3. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C NA PODLOGAMA S GLUKOZOM I KSILOZOM KAO IZVORIMA UGLJIKA

Istraživao se rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na podlozi s glukozom i ksilozom radi primjene u biotehnologiji – za proizvodnju mliječne kiseline. Podloga je sadržavala i glukozu i ksilozu kako bi se istražilo utječe li prisutnost oba šećera na povećanu brzinu rasta bakterija i sintezu mliječne kiseline. Sastav i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.1.3. i 3.2.1., a vođenje procesa u poglavlju 3.2.6. Rezultati su prikazani na slici 9 i tablici 6.



Slika 9. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze i mliječne kiseline te biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi s glukozom i ksilozom bez regulacije pH vrijednosti podloge na tresilici ($n = 130 \text{ min}^{-1}$) šaržnim postupkom pri temperaturi od (A) 45 °C i (B) 55 °C

Tijekom 48 sati uzgoja bakterije pri 45 °C na podlozi s glukozom i ksilozom došlo je do potrošnje glukoze od 7,981 g L⁻¹, a ksiloza se nije utrošila. Prinos biomase je iznosio 2,194 g L⁻¹, prinos acetata 2,324 g L⁻¹, a mliječne kiseline 5,510 g L⁻¹. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je 0,690 g g⁻¹ računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 28. do 36. sata kada je iznosila 0,408 g L⁻¹ h⁻¹. Ukupna produktivnost za mliječnu kiselinu iznosila je 0,115 g L⁻¹ h⁻¹.

Tijekom 48 sati uzgoja pri 55 °C na podlozi s glukozom i ksilozom došlo je do potrošnje glukoze od 7,904 g L⁻¹ i ksiloze od 2,260 g L⁻¹. Prinos biomase iznosio je 2,716 g L⁻¹, a prinos mliječne kiseline 8,167 g L⁻¹. Koncentracija acetata na kraju uzgoja iznosila je 2,254 g L⁻¹. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu je 0,804 g g⁻¹ računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 8. do 12. sata kada je iznosila 0,584 g L⁻¹ h⁻¹. Ukupna produktivnost za mliječnu kiselinu iznosila je 0,170 g L⁻¹ h⁻¹. Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je 0,21 h⁻¹, a ksiloze 0,04 h⁻¹. Specifična brzina rasta bila je 0,62 h⁻¹, a specifična brzina sinteze produkta 0,65 h⁻¹.

Tablica 6. Biokinetički parametri određeni tijekom uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 u podlozi sa glukozom (podloga 1), podlozi sa ksilozom (podloga 2) i podlozi sa glukozom i ksilozom (podloga 3)

T _{uzgoj} (°C)	podloga	t _{lag} (h)	t _{eksp} (h)	γ _{MKmaks} (g L ⁻¹)	Y _{MK/S} * (g g ⁻¹)	Pr _{MK} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	r _S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	r _{MK} (h ⁻¹)
45	podloga 1	18	5	7,86	0,65	0,164	n.o.	n.o.	n.o.
	podloga 2	17	n.o.	4,99	0,55	0,104	n.o.	n.o.	n.o.
	podloga 3	19	4	5,51	0,69	0,115	n.o.	n.o.	n.o.
55	podloga 1	10	2	8,52	0,70	0,178	0,20	0,55	0,52
	podloga 2	12	n.o.	7,11	0,71	0,148	0,10	0,49	0,46
	podloga 3	6	3	8,17	0,80	0,170	0,21 ^a /0,04 ^b	0,62	0,65

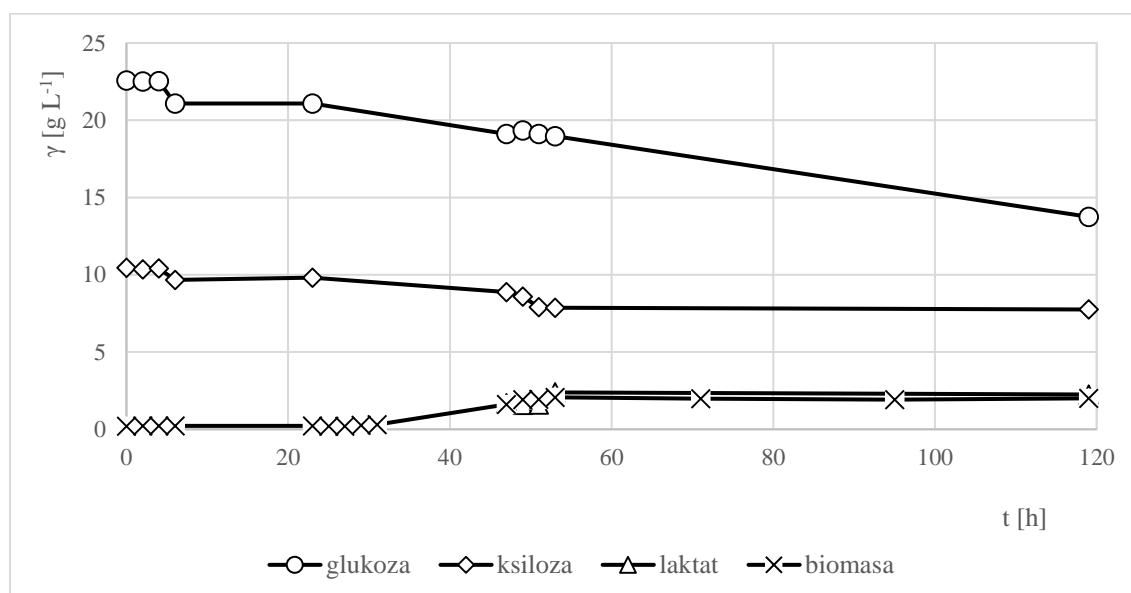
*izračunato na dodani supstrat; ^a, brzina potrošnje glukoze; ^b, brzina potrošnje ksiloze; n.o., nije određeno

Tijekom uzgoja pri 45 °C ova bakterija ima vrlo dugu fazu prilagodbe i proizvodi vrlo niske koncentracije mliječne kiseline (γ ≈ 2 g L⁻¹) u svim testiranim podlogama, dok pri

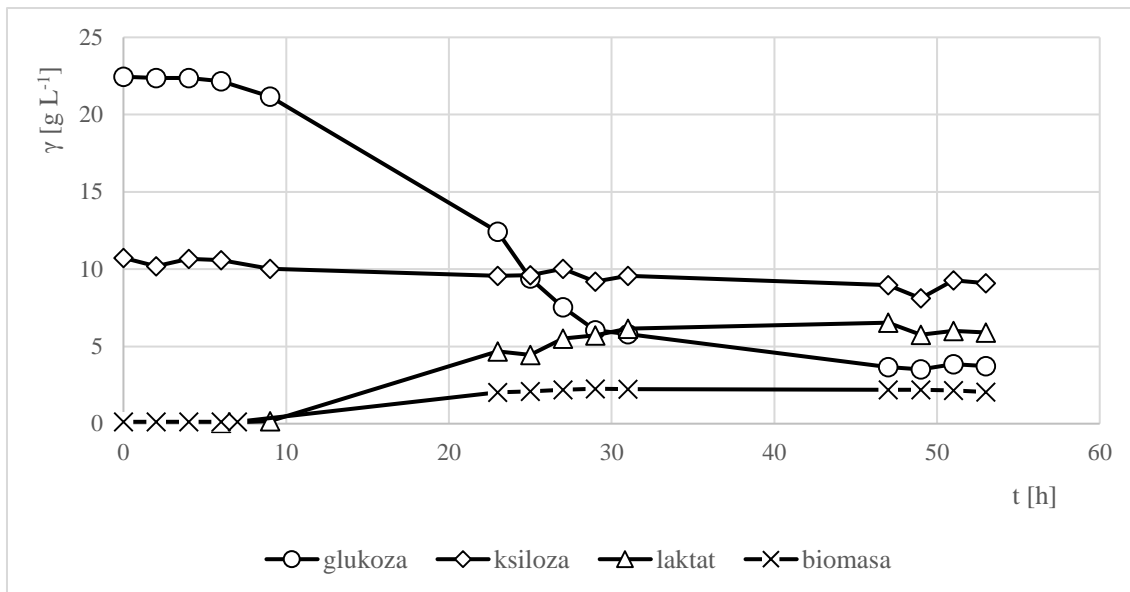
temperaturi od 55 °C lag faza je značajno kraća (tablica 6) i proizvede se 3 puta više mliječne kiseline (5,64 – 6,05 g L⁻¹). Kako su navedeni uzgoji provedeni u podlogama u kojima nije bilo moguće održavati pH vrijednost podloge konstantnom, nego je s povećanjem koncentracije mliječne kiseline dolazi do snižavanja pH vrijednosti podloge pa i ulaska stanica u stacionarnu fazu rasta može se zaključiti da koncentracija mliječne kiseline od približno 6 g L⁻¹ ima inhibitorni učinak na rast i aktivnost ove bakterije.

4.4. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C NA SIMULIRANOJ PODLOZI U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU

Istraživao se rast bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa također radi primjene u biotehnologiji – za proizvodnju mliječne kiseline. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor predstavlja jeftiniji način vođenja uzgoja jer nema regulaciju pH i temperature, a miješanje je drugačije. Iz tog razloga je bilo važno istražiti kinetiku rasta *Bacillus smithii* DSM 460 jer bi u slučaju dobrog rasta primjena ove bakterije u biotehnologiji značajno smanjila troškove. S obzirom da je iz literature poznato da sinteza mliječne kiseline prestaje ispod pH 4,5, očekuje se sporiji rast bakterije, kao i zbog prisutnosti inhibitorских spojeva. Sastav i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.1.3. i 3.2.1., a vođenje procesa u poglavlju 3.2.6. Rezultati su prikazani na slici 10 i tablici 7.



Slika 10A. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline i biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata pivskog tropa (podloga 4) bez održavanja pH vrijednosti podloge u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru ($n = 12 \text{ min}^{-1}$) šaržnim postupkom pri temperaturi uzgoja pri 40 °C



Slika 10B. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline i biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata pivskog tropa bez održavanja pH vrijednosti podloge u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru ($n = 12 \text{ min}^{-1}$) šaržnim postupkom pri temperaturi uzgoja pri $45 \text{ }^\circ\text{C}$

Tijekom 119 sati uzgoja na $45 \text{ }^\circ\text{C}$ došlo je do potrošnje glukoze od $8,829 \text{ g L}^{-1}$ te $2,695 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. Najveća koncentracija mliječne kiseline je postignuta je u 53. satu kada je iznosila $2,389 \text{ g L}^{-1}$ te se više nije mijenjala do kraja uzgoja. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,07 \text{ g g}^{-1}$ što je 7% teoretske vrijednosti računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 4. do 6. sata te je iznosila $1,100 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila $0,045 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Koncentracija acetata nije se značajno mijenjala tijekom uzgoja. Bakterijska kultura je ušla u eksponencijalnu fazu rasta oko 31. sata. Nakon 53. sata potignuta je maksimalna koncentracija biomase od $2,069 \text{ g L}^{-1}$ i nije se mijenjala sve do kraja uzgoja. Primijećena je prisutnost acetoina i 2S,3S-butandiola u podlozi od 47. sata i nadalje. Na kraju uzgoja zabilježena je koncentracija acetoina od $0,874 \text{ g L}^{-1}$ i koncentracija 2S,3S-butandiola od $0,844 \text{ g L}^{-1}$. Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je $0,004 \text{ h}^{-1}$, a ksiloze $0,007 \text{ h}^{-1}$. Specifična brzina rasta bila je $0,06 \text{ h}^{-1}$, a specifična brzina sinteze produkta $0,10 \text{ h}^{-1}$.

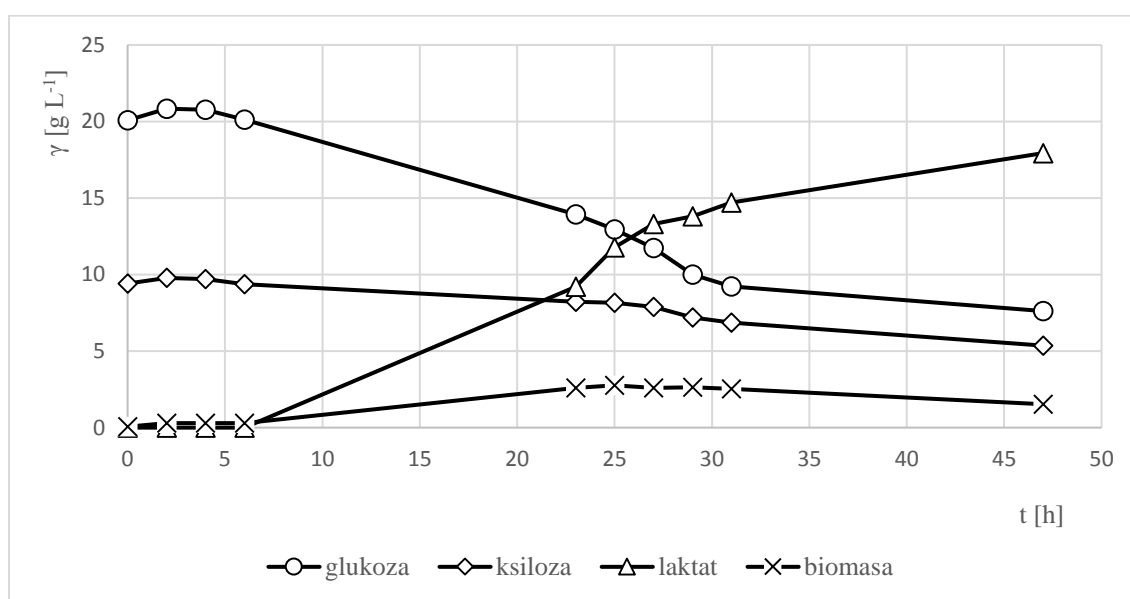
Tijekom 53 sati uzgoja na $55 \text{ }^\circ\text{C}$ došlo je do potrošnje glukoze od $18,725 \text{ g L}^{-1}$ te $1,638 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. Maksimalna koncentracija biomase iznosila je $2,264 \text{ g L}^{-1}$, a postignuta je nakon 29 sati. Najveća koncentracija mliječne kiseline postignuta je u 47. satu i iznosila je $6,536 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,197 \text{ g g}^{-1}$ što je $19,7 \%$

teoretske vrijednosti računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 9. do 23. sata te je iznosila $0,658 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila $0,139 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je $0,10 \text{ h}^{-1}$, a ksiloze $0,005 \text{ h}^{-1}$. Specifična brzina rasta bila je $0,10 \text{ h}^{-1}$, a specifična brzina sinteze produkta $0,22 \text{ h}^{-1}$. Koncentracija acetata se nije mijenjala tijekom uzgoja. Iz grafa je vidljivo da do eksponencijalne faze ne dolazi tijekom prvih 7 sati uzgoja, a biomasa počinje odumirati nakon 50 sati. Primijećena je prisutnost acetoina i 2S,3S-butandiola u podlozi od 47. sata i nadalje. Na kraju uzgoja zabilježena je koncentracija acetoina od $2,070 \text{ g L}^{-1}$ i koncentracija 2S,3S-butandiola od $2,277 \text{ g L}^{-1}$. Može se zaključiti da je temperatura od $55 \text{ }^\circ\text{C}$ bolja za rast bakterijske biomase i sintezu mliječne kiseline s obzirom da je ukupna potrošnja supstrata 77 % veća, prinos mliječne kiseline 274 % veći te produktivnost 309 % veća. To se moglo očekivati jer je ovaj soj bakterije izoliran iz pogona za ekstrakciju šećerne repe koja se odvija pri $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Metabolička funkcija 2,3-butandiola nije poznata, no pretpostavlja se da je evolucijska prednost tih mikroorganizama sinteza neutralnog proizvoda koji je manje inhibitoran od ostalih proizvoda djelomične oksidacije i ne smanjuje pH toliko kao organske kiseline. Također, pretvorbom piruvata ($\text{pKa } 2,45$) u 2,3-butandiol ($\text{pKa } 14,9$) sprječava se zakiseljavanje citosola stanice (Sabra i sur., 2011). Bakterije provode mliječno-kiselu fermentaciju kako bi regenerirale koenzim NAD^+ , no kako ne postoji regulacija pH, podloga se brzo zakiseli. Kako bi se izbjeglo dodatno zakiseljavanje podloge, bakterije usmjeravaju metabolizam u sintezu 2,3-butandiola kako bi regenerirale NAD^+ , s obzirom da on ne zakiseljuje podlogu kao mliječna kiselina.

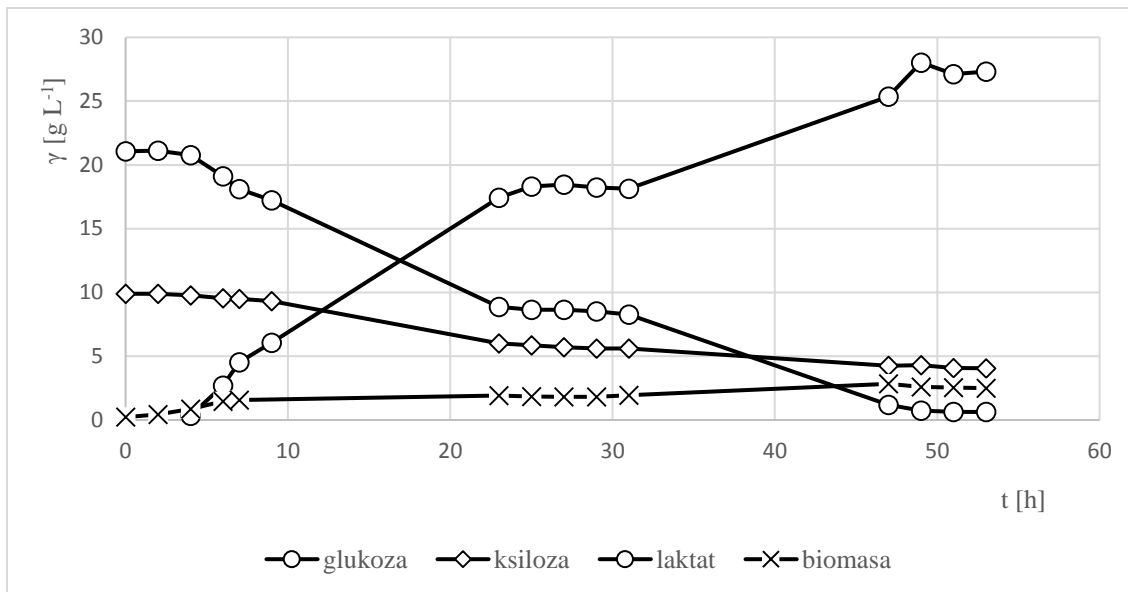
Slične rezultate su dobili Chacon i sur. (2021). U njihovom uzgoju *B. smithii* bili su vidljivi znakovi toksičnosti mliječne kiseline i dobiven je konačni titar od samo $5,1 \text{ g L}^{-1}$ mliječne kiseline nakon 53 sata uzgoja uz faktor iskorištenja od 32 %. Također je zabilježeno da *B. smithii* DSM 4216 proizvodi 58 % manje mliječne kiseline kada se fermentacija provodi pri pH 4,5 u usporedbi s pH 6,5. S obzirom da je pH podloge iznosio 4,61 na kraju uzgoja u HRCB-u pri $45 \text{ }^\circ\text{C}$, jasno je da regulacija pH nužna za postizanje većih prinosa i efikasnosti procesa.

4.5. UZGOJ BAKTERIJE *Bacillus smithii* DSM 460 PRI 45 °C I 55 °C NA SIMULIRANOJ PODLOZI U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM

U ovom istraživanju proveden je uzgoj bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru s miješalom na podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa također radi primjene u biotehnologiji – za proizvodnju mliječne kiseline. Vrijednost pH tijekom uzgoja se konstantno održavala na 6,5. Svrha istraživanja bila je ispitati povećanje prinosa mliječne kiseline uslijed regulacije pH. Sastav i priprema podloge opisani su u poglavljima 3.1.3. i 3.2.1., a vođenje procesa u poglavlju 3.2.6. Rezultati su prikazani na slici 11 i tablici 7.



Slika 11A. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline i biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata pivskog tropa uz održavanje pH vrijednosti podloge (pH 6,5 jedinica) u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom ($n = 250 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi uzgoja 45 °C



Slika 11B. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, mliječne kiseline i biomase tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata pivskog tropa uz održavanje pH vrijednosti podloge (pH 6,5 jedinica) u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom ($n = 250 \text{ min}^{-1}$) pri temperaturi uzgoja $55 \text{ }^\circ\text{C}$

Tijekom 47 sati uzgoja u bioreaktoru s miješalom pri $45 \text{ }^\circ\text{C}$ je došlo do potrošnje glukoze od $13,222 \text{ g L}^{-1}$ te $4,423 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. Maksimalna koncentracija biomase iznosila je $2,604 \text{ g L}^{-1}$, a postignuta je nakon 25 sati. Najveća koncentracija mliječne kiseline postignuta je na kraju uzgoja i iznosila je $17,935 \text{ g L}^{-1}$. Brzina sinteze mliječne kiseline bila je najveća od 23. do 25. sata kada je bila $1,290 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,586 \text{ g g}^{-1}$ što je 58,6 % teoretske vrijednosti računato na dodani supstrat. Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 25. do 27. sata te je iznosila $0,740 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ukupna produktivnost je iznosila $0,382 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Koncentracija acetata nije se mijenjala tijekom uzgoja. Iz grafa je vidljivo da ni nakon prvih 6 sati nije započela eksponencijalna faza rasta. Nakon 30. sata koncentracija biomase se počela naglo smanjivati. Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je $0,21 \text{ h}^{-1}$, a ksiloze $0,04 \text{ h}^{-1}$. Specifična brzina rasta bila je $0,05 \text{ h}^{-1}$, a specifična brzina sinteze produkta $0,04 \text{ h}^{-1}$ na glukozi te $0,01 \text{ h}^{-1}$ na ksilozi.

Tijekom 53 sati uzgoja u bioreaktoru s miješalom pri $55 \text{ }^\circ\text{C}$ je došlo do potrošnje glukoze od $20,489 \text{ g L}^{-1}$ te $5,823 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. Maksimalna koncentracija biomase iznosila je $2,834 \text{ g L}^{-1}$, a postignuta je nakon 47 sati. Najveća koncentracija mliječne kiseline je postignuta na kraju uzgoja i iznosila je $28,092 \text{ g L}^{-1}$. Brzina sinteze mliječne kiseline bila je najveća od 6. do 7. sata kada je bila $1,847 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu iznosio je $0,906 \text{ g g}^{-1}$ što je 90,6 % teoretske vrijednosti računato na dodani supstrat.

Maksimalna brzina potrošnje supstrata je bila od 6. do 7. sata te je iznosila $1,071 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ukupna produktivnost iznosila je $0,572 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Koncentracija acetata nije se mijenjala tijekom uzgoja. Iz grafa je vidljivo da lag faze uopće nije bilo te da je biomasa odmah počela rasti kao i koncentracija mliječne kiseline. Specifična brzina potrošnje glukoze iznosila je $0,03 \text{ h}^{-1}$, a ksiloze $0,02 \text{ h}^{-1}$. Specifična brzina rasta bila je $0,10 \text{ h}^{-1}$ na glukozi te $0,02$ na ksilozi, a specifična brzina sinteze produkta $0,27 \text{ h}^{-1}$ na glukozi te $0,03 \text{ h}^{-1}$ na ksilozi. Iz usporedbe rezultata dobivenih tijekom uzgoja bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 u bioreaktoru sa mješalom, može se zaključiti da je temperatura od $55 \text{ }^\circ\text{C}$ bolja za rast bakterijske biomase i sintezu mliječne kiseline s obzirom da je ukupna potrošnja supstrata 49 % veća, prinos mliječne kiseline 57 % veći te produktivnost 50 % veća. To se moglo očekivati jer je ovaj soj bakterije izoliran iz pogona za ekstrakciju šećerne repe koja se odvija pri $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Za razliku od uzgoja u horizontalnom rotirajućem bioreaktoru, u ovom reaktoru nije primijećena sinteza acetoina i butandiola, vjerojatno zbog konstantne regulacije pH.

U literaturi se mogu naći podaci da su vrijednosti konverzije supstrata u mliječnu kiselinu uvijek iznad 90 % u bioreaktorskim sustavima ukoliko je prisutna regulacija pH. Alkalofilna *Bacillus* sp. WL-S20 proizvela je 225 g L^{-1} mliječne kiseline uz iskorištenje od 99,3 %. Početna koncentracija glukoze iznosila je 80 g L^{-1} , a kasnije je dodavano 40 g glukoze u 4 navrata. U slučaju početne koncentracije glukoze od 135 g L^{-1} i samo jedne prihrane od 80 g glukoze proizvedeno je 180 g L^{-1} mliječne kiseline uz iskorištenje od 98,6 %. Svi uzgoji su provedeni pri pH 9 na temperaturi od $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Ključni faktor je održavanje pH vrijednosti, odnosno sprječavanje zakiseljenja podloge (Meng i sur., 2012). Također je pokazano da je moguć visoko učinkovit proces proizvodnje mliječne kiseline na hidrolizatu kukuruzovine pomoću srodne *Bacillus coagulans* u kontinuiranom sustavu uz iskorištenje od 91 % i prinos od 91 g L^{-1} mliječne kiseline (Ma i sur., 2016).

Tablica 7. Biokinetički parametri određeni tijekom uzgoja bakterije *B. smithii* DSM 460 u podlozi koja simulira sastav hidrolizata otpadnog pivskog tropa.

bioreaktor	T_{uzgoj} (°C)	t_{lag} (h)	γ_{MKmaks} (g L ⁻¹)	$Y_{MK/S}^*$ (g g ⁻¹)	Pr_{MK} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	r_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	r_{MK} (h ⁻¹)
bioreaktor s	45	6	17,94	0,59	0,38	0,03 ^a /0,02 ^b	0,05	0,04 ^a /0,01 ^b
miješalom	55	0	28,03	0,91	0,57	0,08 ^a /0,02 ^b	0,10 ^a /0,02 ^b	0,27 ^a /0,03 ^b
HRCB	45	26	2,39	0,07	0,05	0,004 ^a /0,007 ^b	0,06	0,10
	55	7	6,54	0,20	0,14	0,10 ^a /0,005 ^b	0,10	0,22

*izračunato na dodani supstrat; ^a, na glukozi; ^b, na glukozi i ksilozi

4.6. IZOLACIJA MLIJEČNE KISELINE POMOĆU AMBERLITE IRA-67 SMOLE

U ovom setu eksperimenata istraživala se mogućnost izolacije mliječne kiseline iz fermentirane podloge pomoću Amberlite IRA-67 smole. Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama 8 i 9 te na slikama 12-15. S obzirom na moguću bakterijsku kontaminaciju tijekom procesa uklanjanja mliječne kiseline *in situ*, 50 °C je obećavajuća radna temperatura koja bi mogla smanjiti mogućnost takve kontaminacije. Količina mliječne kiseline adsorbirane na smolu u ravnoteži izračunata je iz masene bilance prikazane ispod:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{W} \quad [6]$$

gdje su C_0 i C_e početna i ravnotežna koncentracija otopine mliječne kiseline (g L^{-1}), q_e količina mliječne kiseline adsorbirane u ravnoteži (g g^{-1} vlažne smole), V volumen otopine mliječne kiseline (L), a W masa upotrijebljene smole (g). Adsorpcija mliječne kiseline na smolu se može opisati reverzibilnom reakcijom $R(s) + LA(aq) \leftrightarrow R_LA(s)$, gdje R (s) označava smolu u čvrstom stanju, LA (aq) predstavlja slobodnu mliječnu kiselinu u tekućem stanju, a R_LA (s) je smola na koju se adsorbirala mliječna kiselina. Promjena koncentracije mliječne kiseline ($-\frac{dC_{LA}}{dt}$) relativna je s $(C_{LA} - C_e)^n$, gdje n ima vrijednost 1 ili 2. Kada je $n = 1$, jednačba glasi:

$$-\frac{dC_{LA}}{dt} = k_1(C_{LA} - C_e) \quad [7]$$

Nakon izračuna dobiva se sljedeća jednačba

$$C_0 - C_{LA} = (C_0 - C_e)(1 - e^{-k_1 t}) \quad [8]$$

Supstituiranjem jednačbe (3) u jednačbu (1), dobiva se:

$$q_e - q_t = q_e e^{-k_1 t} \quad [9]$$

gdje C_{LA} predstavlja koncentraciju mliječne kiseline u vremenu t (min), q_t količinu adsorbirane mliječne kiseline u vremenu t (min), a k_1 konstantu ravnotežne brzine adsorpcije pseudo-prvog reda.

U slučaju pseudo-drugog reda, kada je $n = 2$, jednačba glasi:

$$-\frac{dC_{LA}}{dt} = k_2(C_{LA} - C_e)^2 \quad [10]$$

Nakon izračuna, izvedena je sljedeća jednačba:

$$C_0 - C_{LA} = k_2 t ((C_0 - C_e) - (C_0 - C_{LA})) (C_0 - C_e) \quad [11]$$

Supstitucijom jednadžbe (6) u jednadžbu (1) dobiva se:

$$q_t = k_2 t (q_e - q_t) q_e \quad [12]$$

Jednadžba (7) može se preurediti u linearni oblik:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad [13]$$

gdje je k_2 konstanta brzine pseudo-drugog reda.

Konstante brzine dobivene su crtanjem ovisnosti $\ln(q_e - q_t)$ o t u slučaju $n = 1$ te crtanjem ovisnosti t/q_t o t u slučaju $n = 2$.

Tablica 8. Izračunate konstante za otopinu mliječne kiseline

temperatura	$q_{e, \text{exp}}$	pseudo prvi red			pseudo drugi red		
		k_1	$q_{e, \text{teor}}$	r^2	k_2	$q_{e, \text{teor}}$	r^2
20	0,2350	0,0845	0,2326	0,9876	0,4323	0,2690	1
30	0,2385	0,0772	0,2380	0,9916	0,7644	0,2567	0,9996
40	0,2480	0,0709	0,2486	0,9704	0,8892	0,2623	0,9999
50	0,2395	0,0727	0,2402	0,9745	0,9674	0,2523	0,9999

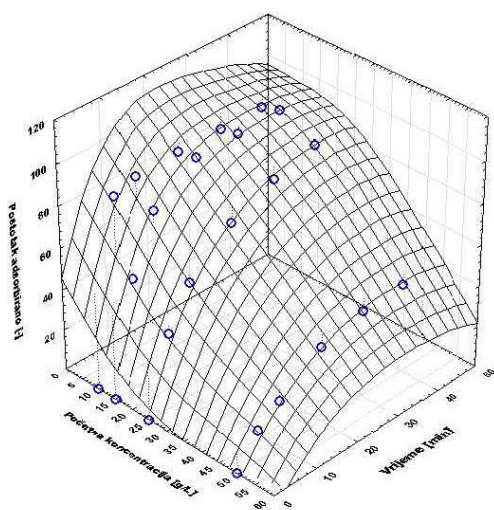
Tablica 9. Izračunate konstante za hranjivu podlogu s mliječnom kiselinom

temperatura	$q_{e, \text{exp}}$	pseudo prvi red			pseudo drugi red		
		k_1	$q_{e, \text{teor}}$	r^2	k_2	$q_{e, \text{teor}}$	r^2
20	0,2000	0,0936	0,1978	0,9827	0,3922	0,2400	0,9980
30	0,2050	0,0909	0,2003	0,9670	0,3032	0,2548	0,9954
40	0,2080	0,0907	0,2050	0,9864	0,3702	0,2492	0,9992
50	0,2050	0,0884	0,2008	0,9764	0,3390	0,2492	0,9983

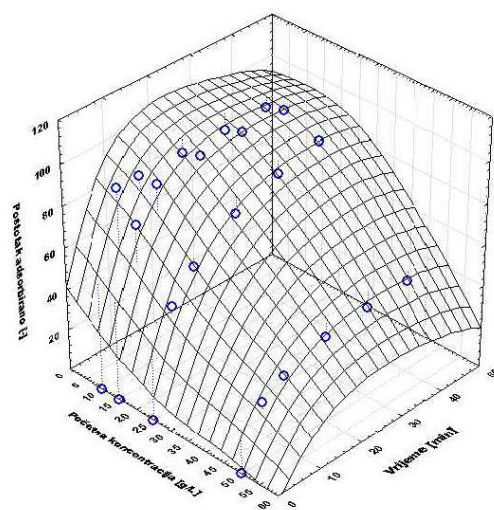
Rezultati u tablicama otkrili su da je kinetički model pseudo-drugog reda pružio bolju korelaciju za adsorpciju mliječne kiseline pomoću IRA-67 u usporedbi s modelom pseudo-prvog reda, jer su vrijednosti (0,9954-1) bile više (0,9670-0,9916). Također neke

eksperimentalne vrijednosti za q_e kod pseudo-prvog reda bile su više od teorijskih, što nije moguće. To je još jedna potvrda da pseudo-drugi red bolje opisuje kinetiku vezanja mliječne kiseline na Amberlite IRA-67 smolu. Očekivano, adsorpcija je manja u hranjivoj podlozi nego u čistoj otopini mliječne kiseline, vjerojatno zbog prisutnosti acetata. Smanjenje kapaciteta adsorpcije iznosi oko 15 % i ovisi o prisutnosti ostalih kiselina u podlozi koje se mogu vezati na smolu. To je dokazano smanjenjem koncentracija acetata u podlozi (nakon 50 minuta koncentracija acetata se smanjila s 4,4 na 2,76 g L⁻¹). Najviši kapacitet adsorpcije je postignut pri 40 °C (0,2480 i 0,2080 g g⁻¹), a najmanji pri 20 °C (0,2350 i 0,2000 g g⁻¹). Rezultati su skladu s literaturom. Gao i sur. (2010) također su dobili slične vrijednosti adsorbirane mliječne kiseline (0,1820-0,2093 g g⁻¹ vlažne smole) i utvrdili da kinetika vezanja mliječne kiseline slijedi pseudo-drugi red. Razlika u odnosu na njihovo istraživanje jest utjecaj temperature. U njihovom istraživanju dobiveno je da se najviše mliječne kiseline veže pri 20 °C (0,2093 g g⁻¹ vlažne smole), a najmanje pri 50 °C (0,1820 g g⁻¹ vlažne smole), dok je u ovim eksperimentima adsorpcija bila najviša pri 40 °C (0,2480 g g⁻¹ vlažne smole), a najniža pri 20 °C (0,2350 g g⁻¹ vlažne smole). Utjecaj temperature nema velik značaj na odvijanje procesa adsorpcije, a razlika između kapaciteta adsorpcije iznosi maksimalno 5 %. Iz grafova je vidljivo da je mliječna kiselina u koncentraciji od 5 g L⁻¹ i 10 g L⁻¹ nakon 10 minuta adsorpcije gotovo u potpunosti adsorbirana na smolu kod obje podloge. Kod koncentracije mliječne kiseline od 25 g L⁻¹ adsorbirano je nakon 50 minuta 83 % mliječne kiseline iz hranjive podloge te 91 % iz čiste otopine, a kod koncentracije od 50 g L⁻¹ adsorbirano je 44 % mliječne kiseline iz hranjive podloge te 45 % iz čiste otopine. Može se zaključiti da pri višim koncentracijama mliječne kiseline dolazi do zasićenja smole.

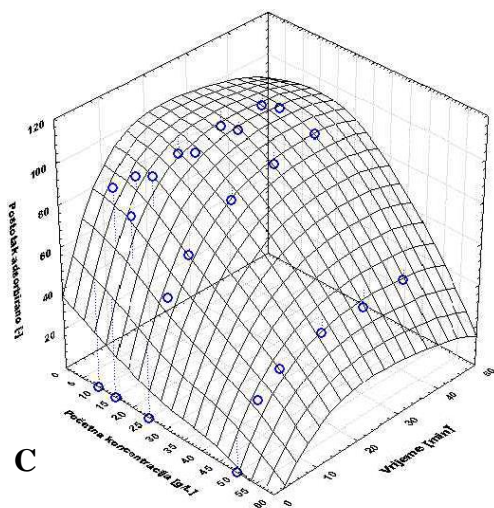
U slučaju izolacije mliječne kiseline ($\gamma = 28$ g L⁻¹) iz 5 L prevrele podloge pri 50 °C bilo bi potrebno 683 g Amberlite IRA-67 smole uz vrijeme adsorpcije od 50 min.



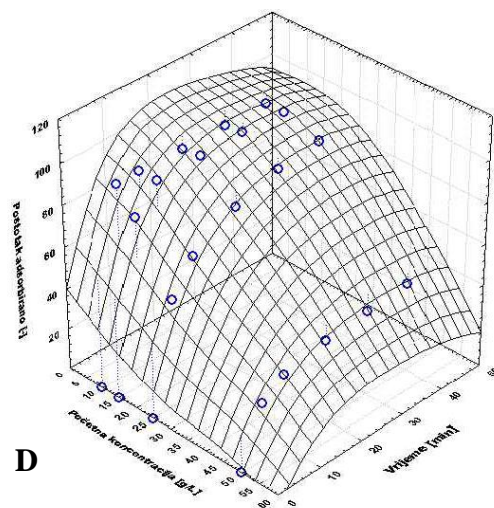
A



B

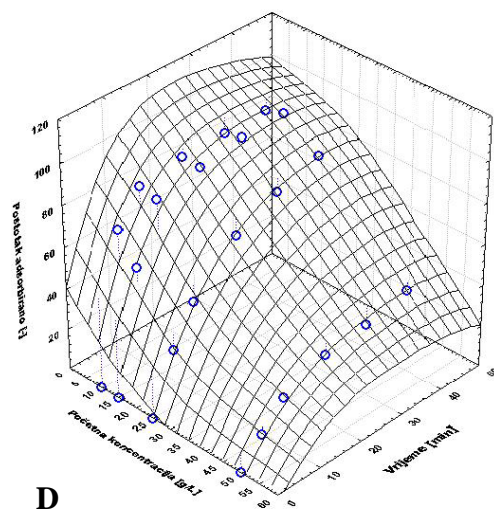
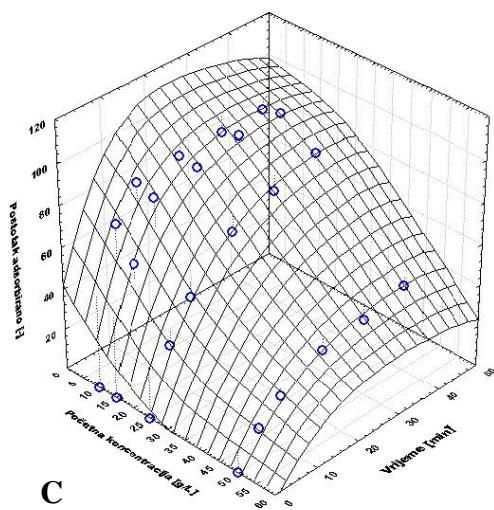
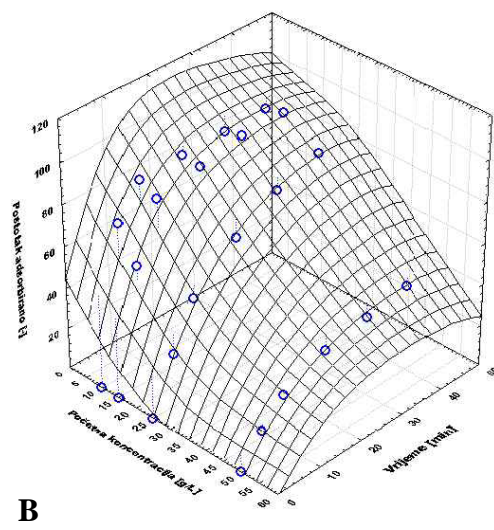
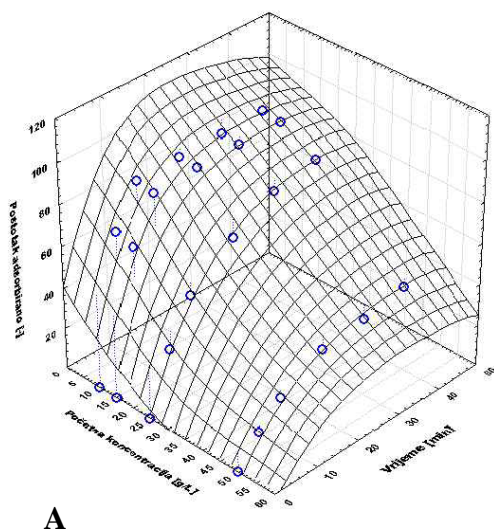


C

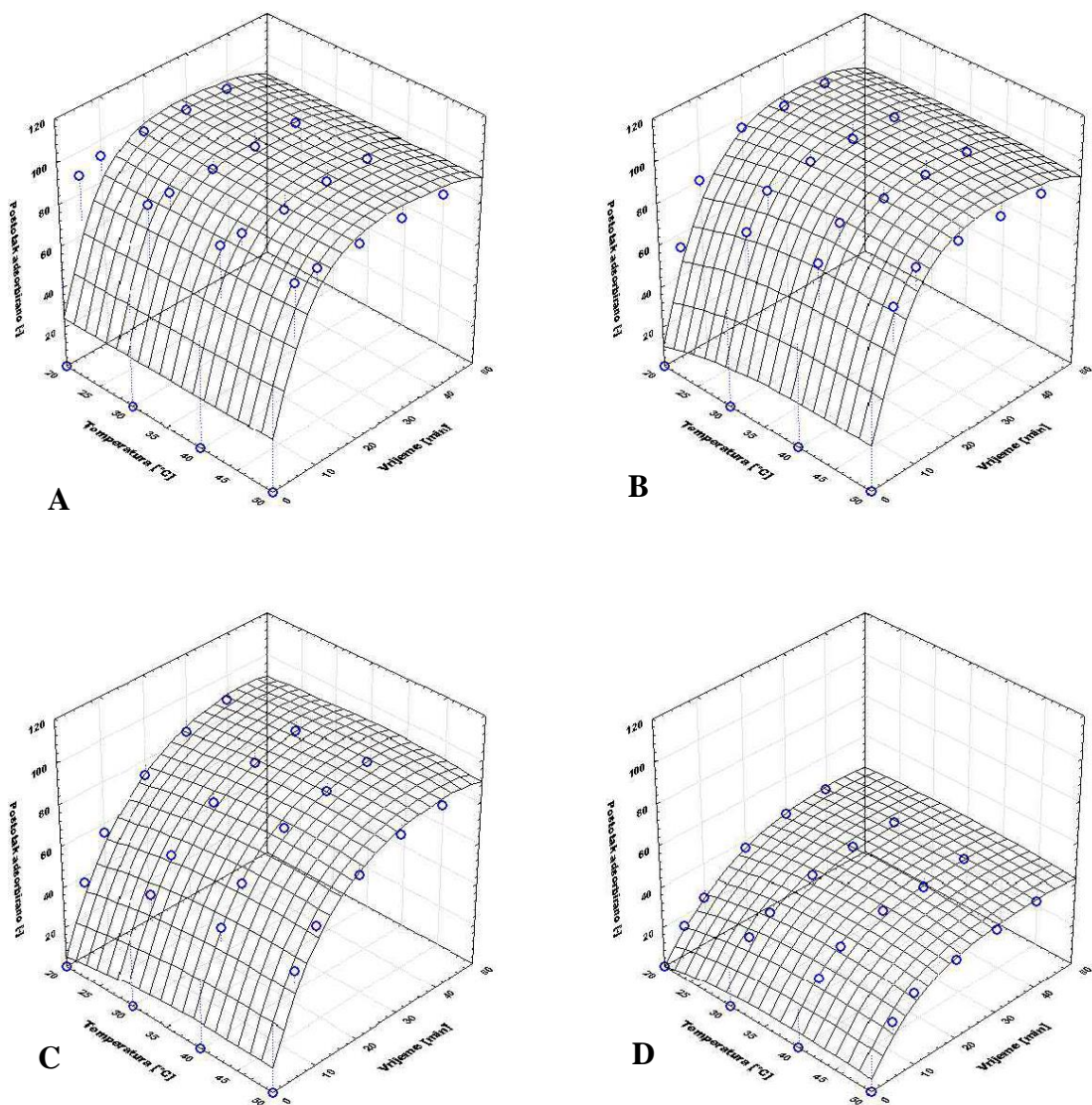


D

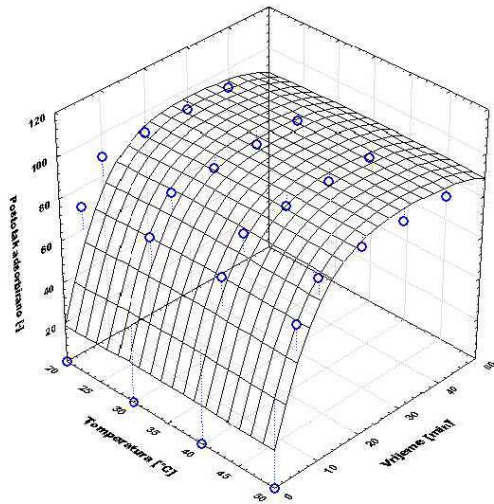
Slika 12. Ovisnost količine adsorbirane mliječne kiseline o temperaturi u čistoj otopini mliječne kiseline, x os – početna koncentracija, y os – vrijeme, z os – postotak adsorbirane mliječne kiseline, **A** – 20 °C, **B** – 30 °C, **C** – 40 °C, **D** – 50 °C



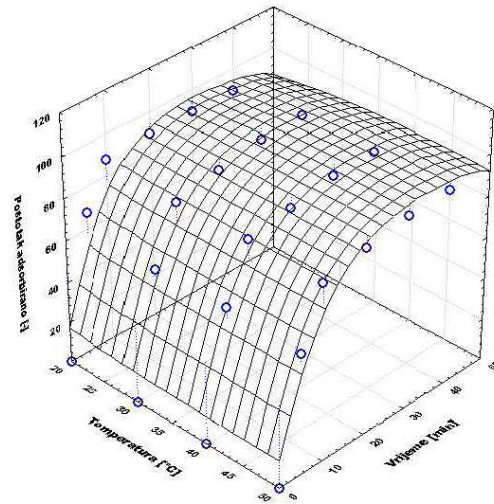
Slika 13. Ovisnost količine adsorbirane mliječne kiseline o temperaturi u hranjivoj podlozi s koncentracijom mliječne kiseline, x os – početna koncentracija, y os – vrijeme, z os – postotak adsorbirane mliječne kiseline, **A** – 20 °C, **B** – 30 °C, **C** – 40 °C, **D** – 50 °C



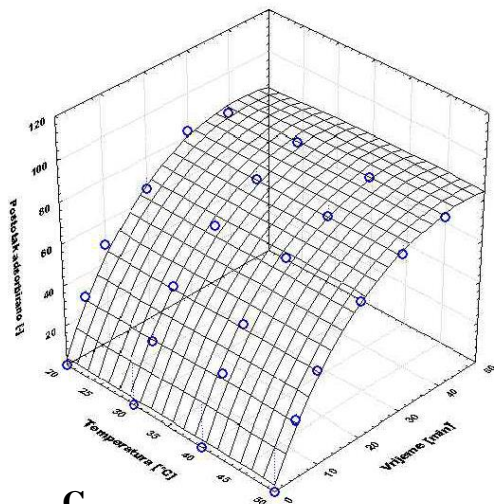
Slika 14. Ovisnost količine adsorbirane mliječne kiseline o početnoj koncentraciji mliječne kiseline u čistoj otopini, x os – temperatura, y os – vrijeme, z os – postotak adsorbirane mliječne kiseline, **A** – 10 g L⁻¹, **B** – 15 g L⁻¹, **C** – 25 g L⁻¹, **D** – 50 g L⁻¹



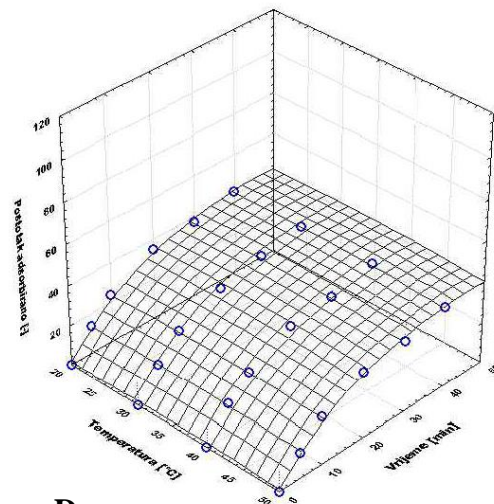
A



B



C



D

Slika 15. Ovisnost količine adsorbirane mliječne kiseline o početnoj koncentraciji mliječne kiseline u hranjivoj podlozi, x os – temperatura, y os – vrijeme, z os – postotak adsorbirane mliječne kiseline, **A** – 10 g L⁻¹, **B** – 15 g L⁻¹, **C** – 25 g L⁻¹, **D** – 50 g L⁻¹

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobivenih tijekom uzgoja termofilne bakterije *Bacillus smithii* DSM 460 na različitim izvorima ugljika izvedeno je više zaključaka:

1. Bakterija *Bacillus smithii* DSM 460 može učinkovito koristiti ksilozu i glukozu pri čemu uobičajeni inhibitori prisutni u hidrolizatima nemaju utjecaja na brzinu rasta i sintezu mliječne kiseline ukoliko je podloga neutralizirana. Optimalna temperatura rasta iznosi 55 °C. Pri nižim temperaturama i sa ksilozom kao jedinim izvorom ugljika, metabolizam se usmjerava na proizvodnju octene kiseline. Potrebno je istražiti utjecaj miješanja na sintezu proizvoda.
2. Tijekom uzgoja ove bakterije u podlozi koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa u bioreaktoru s miješalom pri optimalnoj temperaturi uzgoja od 55 °C i održavanjem optimalne pH vrijednosti podloge, postižu se više koncentracije mliječne kiseline ($\approx 28 \text{ g L}^{-1}$) uz koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu preko 90 % teoretske vrijednosti. Tijekom uzgoja provedenom pri temperaturi od 45 °C u istim uvjetima postiže se oko 40 % manja koncentracija mliječne kiseline ($\approx 17 \text{ g L}^{-1}$).
3. Koncentracija mliječne kiseline određena u podlozi koja simulira sastav otpadnog pivskog tropa u HRCB-u pri 55 °C i bez regulacije pH odgovara vrijednostima određenim u tikvicama u kojima se pH vrijednost podloge ne održava konstantnom dodatkom lužine i/ili kiseline i iznosi svega oko 6 g L^{-1} uz minimalan utrošak ksiloze iz podloge. Jedino su u HRCB-u detektirane niske koncentracije acetoina i 2S,3S-butandiola (oboje oko 2 g L^{-1}).
4. Učinkovita proizvodnja mliječne kiseline s pomoću ove bakterije uključuje različite izvedbe bioreaktora u kojima je moguće održavati pH vrijednost na 6,5 jedinica i temperaturu od minimalno 45 °C, te korištenje otpadnih lignoceluloznih sirovina kao glavnog izvora ugljika.
5. Pseudo-drugi red najbolje opisuje kinetiku vezanja mliječne kiseline na Amberlite IRA-67 smolu. Adsorpcijski kapacitet smole manji je u hranjivoj podlozi za oko 15 % u usporedbi s čistom otopinom mliječne kiseline. Smanjenje kapaciteta smole ovisi o koncentraciji ostalih kiselina u podlozi koje se mogu vezati na smolu. Utjecaj temperature zanemariv je na odvijanje procesa adsorpcije, a najveći kapacitet postignut je pri 40 °C ($0,2480 \text{ g mliječne kiseline / g vlažne smole}$).

6. POPIS LITERATURE

Abdel-Rahman, M. A., Sonomoto, K. (2016) Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *J. Biotechnol.* **236**, 176-192.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J. Biotechnol.* **156**, 286-301.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013) Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* **31**, 877- 902.

Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Ben Omar N., Gálvez A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 201-232.

Adsul, M. G., Khire J. M., Bastawade, K. B., Gokhale, D. V. (2007) Lactic acid production from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc- 3. *Appl. Environ. Microb.* **73**, 5055-5057.

Altaf, M., Naveena, B. J., Reddy, G. (2007) Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresour. Technol.* **98**, 498-503.

Amrane, A., Bensmaili, A., Chabani, M. (2009) Equilibrium sorption isotherms for nitrate on resin Amberlite IRA 400. *J. Hazard Mater.* **165**, 27–33.

Anandharaj, M., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R. P., Sivakumar, S. (2016) Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **178**, 1666–1686.

Atamer, Z., Ehling-Schulz, M., Hinrichs, J., Lücking, G., Stoeckel, M. (2013) Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int. J Food Microbiol.* **166**, 270–279.

Bai, D., Wei, Q., Yan, Z., Zhao, X., Li, X., Xu, S. (2003) Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of l-lactic acid. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1833–1835.

- Bayazit, Ş.S., İnici, İ., Uslu, H. (2010) Adsorption equilibrium data for acetic acid and glycolic acid onto Amberlite IRA-67. *J. Chem. Eng. Data.* **55**, 1295–1299.
- Benninga, H. A. (1990) A History of Lactic Acid Making, 1. izd, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Blomqvist, K., Nikkola, M., Lehtovaara, P., Suihko, M. L., Airaksinen, U., Stråby, K. B. (1993) Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *J Bacteriol.* **175**, 1392–1404.
- Blumenstock, I., Claus, D., Nakamura, L. K. (1988) Taxonomic Study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a Proposal for *Bacillus smithii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 63–73.
- Bosma, E. F., Daas, M. J. A., de Vos, W. M., van der Oost, J., van de Weijer, A. H. P., van Kranenburg, R. (2015a) Establishment of markerless gene deletion tools in thermophilic *Bacillus smithii* and construction of multiple mutant strains. *Microb. Cell Fact.* **14**, 99.
- Bosma, E. F., Daas, M. J. A., de Vos, W.M., van der Oost, J., van de Weijer, A. H. P., van Kranenburg, R. (2015b) Isolation and screening of thermophilic bacilli from compost for electrotransformation and fermentation: Characterization of *Bacillus smithii* ET 138 as a new biocatalyst. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1874–1883.
- Bosma, E. F., Koehorst, J. J., van Hijum, S. A., Renckens, B., Vriesendorp, B., van de Weijer, A. H., Schaap, P. J., de Vos, W. M., van der Oost, J., van Kranenburg, R. (2016) Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii* type strain DSM 4216(T). *Stand. Genom. Sci.* **11**, 52-56.
- Büyükkileci, A. O., Harsa, S. (2004) Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Technol. Biot.* **79**, 1036- 1040.
- Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti A., Oliveira, R. P. S. (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **30**, 70-83.
- Chacon, M., Ibenegbu, C., Leak, D. (2021) Simultaneous saccharification and lactic acid fermentation of the cellulosic fraction of municipal solid waste using *Bacillus smithii*. *Biotechnol. Lett.* **43**, 667-675.
- Christie, G., Setlow, P. (2020) Bacillus spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cell. Signal.* **74**, 109729.

- Coker, J. A. (2016) Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Research* **5**, F1000 Faculty Rev-396.
- Contesini, F. J., Melo, R. R., Sato, H. H. (2018) An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38**, 321–334.
- Cui, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z., Zhou, L., Zhou, Z. (2018) Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 145.
- Datta, R., Henry, M. (2006) Lactic acid: Recent advances in products, processes and technologies – A review. *J. Chem. Technol. Biot.* **81**, 1119-1129.
- Doran, P. (1998) Presentation and Analysis of Data. U: *Bioprocess Engineering Principles*, (Doran, P., ured.), Academic Press Limited, London, UK, str. 27–48.
- Dos Santos Aguilar, J. G., Sato, H. H. (2018) Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res. Int.* **103**, 253–262.
- Eom, I.-Y., Oh, Y.-H., Park, S. J., Lee, S.-H., Yu, J.-H. (2015) Fermentative L- lactic acid production from pretreated whole slurry of oil palm trunk treated by hydrothermolysis and subsequent enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **185**, 143-149.
- Gao, C., Ma, C., Xu, P. (2011) Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnol. Adv.* **29**, 930-939.
- Gao, M., Shimamura, T., Ishida, N., Nagamori, E., Takahashi, H., Uemoto, S., Omasa, T., Ohtake, H. (2009) Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant. *Enzyme Microb. Tech.* **44**, 350-354.
- Gao, Q., Liu, F., Zhang, T., Zhang, J., Jia, S., Yu, C. (2010) The Role of Lactic Acid Adsorption by Ion Exchange Chromatography. *PLoS ONE* **5**, e13948.
- Gebhardt, K., Schimana, J., Müller, J. (2002) Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 199–205.
- Glenn, K., Smith, K. S. (2015) Allosteric Regulation of *Lactobacillus plantarum* Xylulose 5-Phosphate/Fructose 6-Phosphate Phosphoketolase (Xfp). *J. Bacteriol.* **197**, 1157–1163.
- Gomes, J., Steiner, W. (2004) The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* **42**, 223–235.

- Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J. L., Parajó, J. C. (2008) L-lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* **99**, 308-319.
- Harwood, C. R., Cranenburgh, R. (2008) *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* **16**, 73–79.
- Hermann-Krauss, C., Koller, M., Muhr, A. (2013) Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co-and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea* 129268.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Tech.* **26**, 87-107.
- Holten, C. H., Müller, A., Rehbinder, D., Ilra, S. (1971) *Lactic Acid: Properties and Chemistry of Lactic Acid and Derivatives*, Chemie, Weinheim.
- Holwerda, E.K., Lynd, L.R. (2013) Testing alternative kinetic models for utilization of crystalline cellulose (Avicel) by batch cultures of *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 2389-2394.
- Hong, A. C., Tanino, K., Peng, F., Zhou, S., Sun, Y., Liu, C., Liu, D. H. (2009) Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *J. Chem. Technol. Biot.* **84**, 1576-1581.
- Hosoi, T., Kiuchi, K. (2003) Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). *Handbook of Fermented Functional Foods* (Farnworth E.R., ured.), CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 227-245.
- Hu, J., Zhang, Z., Lin, Y., Zhao, S., Mei, Y., Liang, Y., Peng, N. (2015) High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non- sterile condition. *Bioresour. Technol.* **182**, 251-257.
- Ibrahim, M. H., Steinbüchel, A. (2010) High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly (3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus sp.* strain MW10. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7890–7895.
- Idler, C., Venus, J., Kamm, B. (2015) Microorganisms for the production of lactic acid and organic lactates. *Microbiol. Monogr.* **26**, 225-273.

- Jeong, H., Jeong, D., Kim, S.H., Song, G. C., Park, S. Y., Ryu, C. M., Park, S. H., Choi, S. K. (2012) Draft Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613T. *J. Bacteriol.* **194**, 4148–4149.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2009) Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnol. Adv.* **27**, 145-152.
- John, R. P., Nampoothiri, M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biot.* **74**, 524-534.
- Jong, E., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M. (2012) Bio-based Chemicals Value Added Products from Biorefineries. IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery, Amsterdam.
- Keen, E., Bliskovsky, V., Adhya, S., Dantas, G. (2017) Draft genome sequence of the naturally competent *Bacillus simplex* strain WY10. *Genome Announc.* **5**, e01295–17.
- Komesu, A., Wolf Maciel, M. R., Oliveira, J., da Silva Martins, L. H., Maciel Filho R. (2017) Purification of Lactic Acid Produced by Fermentation: Focus on Non-traditional Distillation Processes. *Sep. Purif. Rev.* **46**, 241-254.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V., Laopaiboon, L. (2010) Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresour. Technol.* **101**, 1036-1043.
- Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., Maciel Filho, R. (2012) Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – A review. *Biotechnol. Adv.* **30**, 321-328.
- Li, X., Lin, Y., Qi, X., Tu, R., Wang, Q., Zhang, Y. (2011) High-throughput screening and characterization of xylose-utilizing, ethanol-tolerant thermophilic bacteria for bioethanol production. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1584–1591.
- Li, Z., Lu, J., Yang, Z., Han, L., Tan, T. (2012) Utilization of white rice bran for production of L-lactic acid. *Biomass Bioenerg.* **39**, 53-58.
- Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001) *Biotechnologia Industrial Processos Fermentativos e Enzimáticos*, Blucher, São Paulo.

- Lodemann, U., Lorenz, B.M., Weyrauch, K.D., Martens, H. (2008) Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* **62**, 87–106.
- López-Garzón, C. S., Straathof, A. J. J. (2014) Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **32**, 873-904.
- Lunelli, B. H. (2010) Produção e Controle da Síntese do Éster de Ácido Acrílico Através da Fermentação do Ácido Láctico, PhD. Dissertation, University of Campinas, Campinas, Brazil.
- Lunelli, B. H., Andrade, R. R., Atala, D. I. P., Wolf Maciel, M. R., Maugeri Filho, F., Maciel Filho, R. (2010) Production of lactic acid from sucrose: Strain selection, fermentation and kinetic modeling. *Appl. Biochem. Biotech.* **161**, 227-237.
- Ma, K., Hu, G., Pan, L., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Ruan, Z., He, M. (2016) Highly efficient production of optically pure l-lactic acid from corn stover hydrolysate by thermophilic *Bacillus coagulans*. *Bioresour. Technol.* **219**, 114-122.
- Madigan, M. T., Mairs B. L. (1997) Extremophiles. *Sci. Am.* **276**, 66–71.
- Madigan, M., Martinko, J. (2005) Brock Biology of Microorganisms, 11. izd., Prentice Hall, Hoboken, New Jersey.
- Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biochem Eng Q* **32**, 483-499.
- Marques, S., Santos, J. A. L., Gírio, F. M., Roseiro, J. C. (2008) Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem. Eng. J.* **41**, 210-216.
- Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N. (2004) Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 112-119.
- Matoković, V. (2020) Utjecaj izvora dušika, ugljika i svjetlosti na kinetiku rasta nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

- Meng, Y., Xue, Y., Yu, B., Gao, C., Ma, Y. (2012) Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. *Bioresour. Technol.* **116**, 334-339.
- Mienda, B. S., Yahya, A., Galadima, I. A., Shamsir, M. S. (2014) An overview of microbial proteases for industrial applications. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **5**, 388–396.
- Nakano, S., Ugwu, C. U., Tokiwa, Y. (2012) Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. *Bioresour. Technol.* **104**, 791-794.
- Oguntoyinbo, A., Sanni, A. I., Franz C. M. A. P., Holzapfel, W. H. (2007) In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of okpehe, a traditional African fermented condiment. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 208–218.
- Ohara, H., Yahata, M. (1996) L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. *J Ferment Bioeng* **81**, 272-274.
- Ohleyer, E., Blanch, H. W., Wilke, C. R. (1985) Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor. *Appl. Biochem. Biotech.* **11**, 317-332.
- Ou, M. S., Ingram, L. O., Shanmugam, K. T. (2011) L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **38**, 599-605.
- Ouyang, J., Ma, R., Zheng, Z., Cai, C., Zhang, M., Jiang, T. (2013) Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresour. Technol.* **135**, 475- 480.
- Pal, P., Sikder, J., Roy, S., Giorno, L. (2009) Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chem. Eng. Process. Intens.* **48**, 1549-1559.
- PR Newswire (2016) Lactic acid market and derivatives 2016 forecasts (global, China) in new research report. (<http://www.prnewswire.com/news-releases/lactic-acid-market-and-derivatives-2016-forecasts-global-china-in-new-research-report-279286152.html>), pristupljeno 25. travnja 2021.
- Rampelotto P. H. (2013) Extremophiles and extreme environments. *Life* **3**, 482–485.
- Ryan, K. J., Ray, C. G. (2004) Sherris Medical Microbiology, 4. izd., McGraw Hill, New York.

- Sabra, W., Quitmann, H., Zeng, A., Dai, J., Xiu, Z. (2011) Microbial Production of 2,3-Butanediol. U: *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M., ured.), Elsevier B.V., Amsterdam, str. 87-97.
- Schallmey, M., Singh, A., Ward, O. P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**, 1-17.
- Silveira, M. S. (2009) Utilização do Suco de Caju Clarificado para Produção de Ácido Lático pelo *Lactobacillus casei* B-442, MSc Thesis, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil.
- Slonczewski, J. L., Foster, J. W. (2011) *Microbiology: An Evolving Science*, 2. izd., Norton, New York.
- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G., Straub, R. J. (2001) Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 518-523.
- The Essential Chemical Industry Online (2013) Biotechnology in the chemical industry (<http://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/biotechnology-in-the-chemical-industry.html>), pristupljeno 25. travnja 2021.
- Turnbull, P. C. B. (1996) *Bacillus*. U: *Barron's Medical Microbiology* (Baron, S., ured.), 4. izd., Univ of Texas Medical Branch, Austin.
- Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yu, B., Ma, C., Su, F., Hua, D., Li, Q., Ma, Y., Xu, P. (2010) Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. Strain. *Bioresour. Technol.* **101**, 7908-7915.
- Wang, Y., Meng, H., Cai, D., Wang, B., Qin, P., Wang, Z., Tan, T. (2016) Improvement of L-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation. *Bioresour. Technol.* **211**, 291-297.
- Wankat P. C. (2007) *Equilibrium Staged Separations*, Prentice Hall, New York.
- Wee, Y., Kim, J., Ryu, H. (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Biotech.* **44**, 163-172.
- Wee, Y., Yun, J., Park, D., Ryu, H. (2004) Biotechnological production of L(+) lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnol. Lett.* **26**, 71-74.

Wei, Q., Han, Z. W., Bai, D. M., Yan, Z. H., Zhao, X. M. (2004) Study on recovery and purification of l-lactic acid. U: *Frontiers on Separation Science and Technology* (Tong, Z., Kim, S.H., ured.), World Scientific, Singapur, str. 717-723.

Zhao, H.Y., Feng, H. (2018) Engineering *Bacillus pumilus* alkaline serine protease to increase its low-temperature proteolytic activity by directed evolution. *BMC Biotechnol.* **18**, 34.

7. PRILOZI

Prilog 1. Standardi korišteni za UPLC analizu

Tvar	RT (min)	Jednadžba kalibracijskog pravca	R²
mliječna kiselina	6,632	$y = 61091x + 1234,8$	0,9934
mravlja kiselina	7,11	$y = 47328x + 53,595$	1,0000
2S,3S-butandiol	9,909	$y = 98926x + 3003,6$	0,9995
octena kiselina	7,816	$y = 57358x + 697,25$	1,0000
glukoza	4,821	$y = 135278x - 3377$	0,9997
ksiloza	5,164	$y = 129878x - 627,53$	0,9998

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marko Sarić