

# Proizvodnja lignocelulotičkih enzima pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

---

**Radoš, Andrijana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:333044>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

Andrijana Radoš  
125164869

**PROIZVODNJA LIGNOCELULOTIČKIH ENZIMA  
POMOĆU BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* DSM 742**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biokemijsko inženjerstvo

**Mentor:** dr. sc. Nenad Marđetko

Zagreb, 2023.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Proizvodnja lignocelulotičkih enzima pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742  
Andrijana Radoš, 125164869**

## Sažetak:

U ovom radu istraživana je sposobnost bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 da proizvede enzime za razgradnju lignocelulozne biomase. Lignoceluloza je osnovni gradivni materijal biljaka, koji se može iskoristiti za proizvodnju biogoriva, biokemikalija i biopolimera, no mora se prethodno razgraditi na gradivne elemente. U ovom radu proveden je uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u kiselom i bazičnom pH na pet različitih izvora ugljika kako bi se ispitala njena sposobnost proizvodnje lignocelulotičkih enzima. Pratio se rast biomase, ukupna koncentracija proteina i enzimska aktivnost tijekom 25 h uzgoja u tikvicama i bioreaktoru s miješalom. Najveća specifična enzimska aktivnost izmjerena je na podlogama sa fruktozom kao izvorom ugljika u kiselom pH. Maksimalna specifična enzimska aktivnost ksilanaze iznosila je 0,7 U/mg, egzoglukanaze 1,8 U/mg i endoglukanaze 1,5 U/mg. U biorektoru uzgoj je provoden fruktozi u kiselom pH i dobivena je maksimalna enzimska aktivnost ksilanaze 9,3 U/mg, aktivnosti egzo- i endoglukanaza su bile manje od 0,8 U/mg.

**Ključne riječi:** bakterija *Paenibacillus polymyxa*, lignoceluloza, lignocelulotički enzimi, bioreaktor s miješalom

**Rad sadrži:** 30 stranica, 10 slika, 1 tablica, 34 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** dr. sc. Nenad Marđetko

**Datum obrane:** 14.9.2023

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing  
Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

Production of lignocellulosic enzymes by the bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Andrijana Radoš

### Abstract:

The aim of this study was to investigate the ability of the bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 to produce enzymes for the degradation of lignocellulosic biomass. Lignocellulose is the basic building material of plants that can be used for the production of biofuels, biochemicals and biopolymers, but it must first be broken down into building elements. In this study, the cultivation of the bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 was carried out in acidic and basic pH on five different carbon sources to test its ability to produce lignocellulosic enzymes. Biomass growth, total protein concentration and enzyme activity were monitored during 25 h of cultivation in flasks and a stirred tank bioreactor. The highest specific enzyme activity was measured on substrates with fructose as a carbon source in acidic pH. The maximum specific enzyme activity of xylanase was 0.7 U/mg, exoglucanase 1.8 U/mg and endoglucanase 1.5 U/mg. In the bioreactor, cultivation was carried out on fructose in an acidic pH and the maximum enzymatic activity of xylanase was 9.3 U/mg, the activities of exo- and endoglucanase were less than 0.8 U/mg.

**Keywords:** bacterium *Paenibacillus polymyxa*, lignocellulose, lignocellulosic enzymes, stirred tank bioreactor

**Thesis contains:** 30 pages, 10 figures, 1 table, 34 references.

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Nenad Marđetko, PhD

**Thesis defended:** 14.9.2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. LIGNOCELULOZA .....	2
2.1.1. SASTAV I IZVORI LIGNOCELULOZNE BIOMASE.....	2
2.1.2. CELULOZA.....	2
2.1.3. HEMICELULOZA .....	3
2.1.4. LIGNIN .....	3
2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNE BIOMASE .....	4
2.2.1. FIZIKALNE METODE PREDOBRAĐE .....	4
2.2.2. KEMIJSKE METODE PREDOBRAĐE .....	5
2.2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE PREDOBRAĐE.....	6
2.2.4. BIOLOŠKA PREDOBRAĐA .....	6
2.3. BAKTERIJA <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> .....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>11</b>
3.1. MATERIJALI .....	11
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZAM.....	11
3.1.2. KEMIJSKE, ENZIMI I SIROVINE.....	11
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE .....	12
3.1.4. OPREMA I UREĐAJI .....	13
3.2. METODE .....	14
3.2.1. BRADFORD METODA .....	14
3.2.2. DNSA METODA .....	14
3.2.3. UPLC (ULTRA-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY).....	15
3.2.4. PRIPREMA KRUTE HRANJIVE PODLOGE .....	16
3.2.5. PRIPREMA TEKUĆE HRANJIVE PODLOGE .....	16
3.2.6. PRIPREMA PODLOGE ZA UZGOJ U BIOREAKTORU.....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>17</b>
4.1. UZGOJ BAKTERIJE <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> DSM 742 NA PODLOGAMA S RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA .....	17
4.2. UZGOJ BAKTERIJE <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> DSM 742 NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA U SVRHU SINTEZE LIGNOCELULOLITIČKIH ENZIMA.....	19

5.3. UZGOJ BAKTERIJE <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> DSM 742 U BIOREKATORU S MIJEŠALOM NA FRUKTOZI KAO IZVORU UGLJIKA .....	24
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS LITERATURE.....	28

## 1. UVOD

Lignoceluloza je osnovna komponenta biljaka i široko se iskorištava u raznim granama industrije, npr. farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Smatra se jednom od važnih skupina obnovljivih izvora. Ogromna količina lignocelulozne biomase čini ju potencijalnim izvorom za proizvodnju biogoriva, biopolimera i biokemikalija, ali da bi se iz nje dobili fermentabilni šećeri, ova sirovina mora se prethodno fizički, kemijski ili biološki obraditi. Svaki lignocelulozni supstrat složena je mješavina celuloze, hemiceluloze i lignina, povezanih u matricu. Dok se celuloza i hemiceluloza mogu razgraditi na fermentabilne šećere, lignin se sastoji od fenil-propanoidnih jedinica i najotporiniji je gradivni materijal lignocelulozne biomase. Među različitim načinima predobrade lignoceluloze, biološka predobrada pomoću mikroorganizama kao što su bakterije i gljive postaje sve popularnija zbog svojih financijskih i ekoloških prednosti (Sharma, Xu, i Qin 2019). Ovi mikroorganizmi posjeduju enzimske sustave za depolimerizaciju i razgradnju polimera u lignoceluloznim supstratima (Saritha, Arora, i Lata 2012).

*Paenibacillus polymyxa* (ranije poznat kao *Bacillus polymyxa*) privukla je značajan interes zbog svog velikog biotehnološkog potencijala u različitim industrijskim procesima i održivoj poljoprivredi. Ovaj nepatogeni bacil koji stvara endospore prirodno se pojavljuje u tlu, rizosferi i korijenju usjeva te u morskim sedimentima. Tijekom posljednja dva desetljeća raste interes za njegovu primjenu u ekologiji i biotehnologiji. *P. polymyxa* ima širok raspon svojstava, uključujući fiksaciju dušika, poticanje rasta biljaka, solubilizaciju fosfora u tlu i proizvodnju egzopolisaharida, hidrolitičkih enzima, antibiotika, citokinina. Također pomaže u bioflokulaciji i povećanju poroznosti tla. Osim toga, poznato je da proizvodi optički aktivan 2,3-butandiol (BDL), vrijedan kemijski spoj koji ima mnoge primjene u biotehnološkoj, prehrambenoj industriji i šire (Lal i Tabacchioni 2009). U ovom radu ispitivao se potencijal bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 za proizvodnju lignocelulotičkih enzima na različitim izvorima ugljika i pri različitim uvjetima pH-vrijednosti podloge.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. LIGNOCELULOZA**

#### **2.1.1. SASTAV I IZVORI LIGNOCELULOZNE BIOMASE**

Lignoceluloza je sastavljena od polimera: celuloze (40-60 %), hemiceluloze (20-40 %), te aromatskog polimera: lignina (10-24 %) (Slika 1) koji je glavni gradivni element staničnih stijenki biljaka s malim količinama drugih komponenti, poput acetilnih skupina, minerala i fenolnih supstituenata (Sharma, Xu, i Qin 2019). Ovisno o vrsti lignocelulozne biomase, ti su polimeri organizirani u složene neuniformne trodimenzionalne strukture u različitim stupnjevima i različitom relativnom sastavu. Zajedno, ove komponente daju mnoge korisne prilagodbe potrebne za preživljavanje biljaka, uključujući strukturni integritet, vodonepropusnost i otpornost na napade mikroba. Lignoceluloza svoju otpornost kemijskoj i biološkoj razgradnji duguje kristalnoj strukturi celuloze, hidrofobnosti lignina i obavijenosti celuloze lignin-hemiceluloznom matricom (Isikgor i Becer 2015) a tradicionalno se koristila kao sirovina za izgradnju i kao gorivo. Međutim, kemijski sastav pojedinačnih polimera sugerira da postoji potencijal za korištenje lignoceluloze kao sirovine za proizvode visoke vrijednosti, kao što su transportna goriva, biokemikalije, bioplastika i drugi novi materijali (Smith 2019). Velike količine lignoceluloznog otpada godišnje se stvaraju kroz poljoprivrednu industriju, šumarstvo, papirnu i celuloznu industriju, tekstilnu i drvenu industriju ili pivovare (Georgiadou i ostali 2021). Također, kao izvori lignocelulozne biomase mogu se iskoristiti komunalni kruti otpad i bioenergetski usjevi. Udio mekog drva, tvrdog drva i trave u lignoceluloznoj biomasi varira ovisno o biljnim vrstama koje se koriste kao izvor. Štoviše, sastav unutar jedne biljke se također razlikuje prema starosti, fazi rasta i uvjetima rasta biljke (Sharma, Xu, i Qin 2019).

#### **2.1.2. Celuloza**

Celuloza je strukturni materijal u staničnoj stijenki biljaka i izgrađena je od između 7000 i 15000 jedinica D-glukoze koje su međusobno povezane  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama (Smith 2019). Dugi polisaharidni lanci su nerazgranati i raspoređeni paralelno tvoreći celulozne mikrofibrile. Mikrofibrile celuloze međusobno su čvrsto povezane međumolekularnim i unutmolekularnim vodikovim vezama koje omogućuju krutu kristalnu ili amorfnu strukturu (Sharma, Xu, i Qin 2019). Ove su fibrile međusobno spojene hemicelulozama, amorfnim polimerima različitih šećera kao i drugim polimerima poput pektina, a prekrivene su ligninom..



Ova posebna i komplicirana struktura čini celulozu otpornom i na biološke i na kemijske tretmane (Taherzadeh i Karimi 2008). Hidrofobna površina celuloze veže ili odbija sloj vode što onemogućava ulazak enzima u unutrašnjost i degradaciju. (Jørgensen, Kristensen, i Felby 2007). Najveći dio celuloze (oko 2/3 ukupne celuloze) je u kristalnom obliku, dok ostatak ima amorfnu strukturu, koja je pristupačnija za razgradnju. (Taherzadeh i Karimi 2008).

### 2.1.3. Hemiceluloza

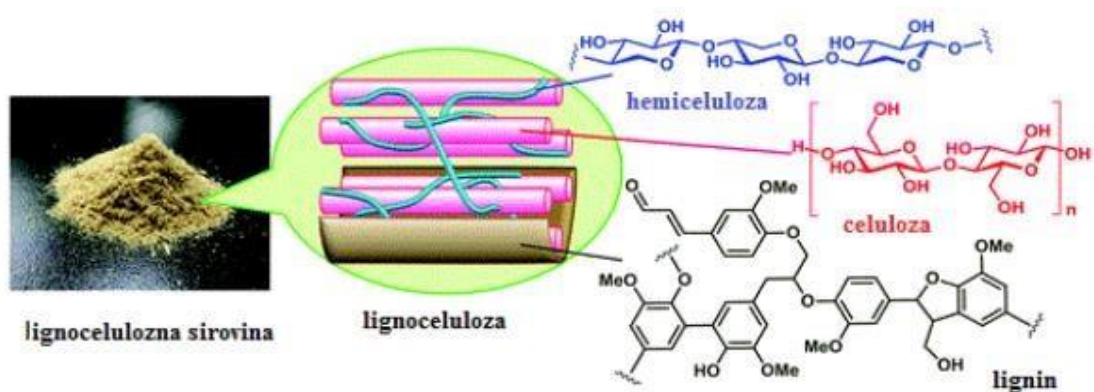
Hemiceluloza je složeni razgranati polisaharid koji se sastoji od heterogene smjese pentoza (ksiloza, arabinoza), heksoza (manoz, glukoza, galaktoza) i šećernih kiselina (4-O-metilglukuronska, galakturonska i glukuronska kiselina). Ovi su šećeri međusobno povezani  $\beta$ -1,4-glikozidnim, a ponekad i  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama. Hemiceluloze se vežu s celuloznim mikrofibrilima, ligninom i pektinom kako bi formirale umreženu mrežu heterogene mješavine pentoza i heksoza u staničnoj stijenci biljaka (Sharma, Xu, i Qin 2019).

Hemiceluloze se razlikuje prema udjelima pojedinog šećera u okosnici polimera, mogu na primjer imati veći udio ksilana ( $\beta$ -1,4-vezana ksiloza) ili manana ( $\beta$ -1,4-vezana manoz) što utječe na tvrdoću same sirovine. Tvrdo drvo sadrži ksilane i glukomanane; a meko drvo sadrži glukomanane, ksilane, arabinogalaktane, ksiloglukane i glukane. Biljke koje pripadaju obitelji trava sastavljene su uglavnom od glukuronoarabinoksilana. Zbog ovih razlika u sastavu hemiceluloze, poljoprivredni otpad poput slame, kao i materijali od tvrdog drva bogati su pentoznim šećerom ksilozom, dok je meko drvo bogato heksoznim šećerom manozom (Jørgensen, Kristensen, i Felby 2007).

### 2.1.4. Lignin

Lignin je produkt kondenzacije triju monomernih fenolnih alkohola: trans-*p*-kumarilnog, trans-*p*-konifilnog i trans-*p*-sinapilnog. Ovi monomeri kada tvore polimer, fenilpropanske jedinice nazivaju se *p*-hidroksifenilne, koniferilne i sinapilne jedinice. (Kucharska i ostali 2018). Konačni rezultat ove polimerizacije je heterogena struktura čije su osnovne jedinice povezane C-C i aril-eterskim vezama (Slika 1). Prisutan je u staničnoj stijenci biljaka i daje strukturu potporu, nepropusnost i otpornost na napad mikroba te oksidativni stres. Zahvaljujući svojoj strukturi nije topljiv u vodi, optički je neaktivan i teško razgradiv (Pérez i ostali 2002).

Lignin je najotpornija komponenta stanične stijenke biljke, a što je veći udio lignina, veća je otpornost na kemijsku i enzimsku razgradnju. Općenito, meko drvo sadrži više lignina nego tvrdo drvo i većine ostataka od poljoprivrede (Taherzadeh i Karimi 2008).



**Slika 1.** Kemijski sastav lignocelulozne sirovine (prilagođeno iz Kobayashi i Fukuoka, 2013).

## 2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Prvi korak pretvorbe lignoceluloze u biogoriva i bioproizvode je predobrada. Metode predtretmana dijele se u različite kategorije kao što su mehaničke ili fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode (Georgiadou i ostali 2021), (Isikgor i Becer 2015). Primjenom metoda predobrade mijenjaju se svojstva povezivanja lignoceluloznih materijala modificiranjem molekularne strukture matrice celuloza-hemiceluloza-lignin. Stoga je predobrada lignocelulozne biomase, prije drugih metoda obrade, bitan korak kako bi se povećala dostupnost celuloze i hemiceluloze te biorazgradivost za enzimsko ili kemijsko djelovanje (Isikgor i Becer 2015). Cilj postupka predtretmana je uklanjanje lignina i hemiceluloze, smanjiti kristalnost celuloze i povećati poroznost lignoceluloznih materijala. Predobrada mora izbjeći razgradnju ili gubitak ugljikohidrata, izbjeći stvaranje nusproizvoda koji inhibiraju hidrolizu i procese fermentacije, te biti isplativa (Kumar i ostali 2009). Nakon predobrade, hidrolitički enzimi se koriste za depolimerizaciju celuloze i hemiceluloze u jednostavne šećere, a u završnom koraku, šećeri se fermentiraju i pomoću mikroorganizama pretvaraju u etanol ili druga goriva (Georgiadou i ostali 2021).

### 2.2.1. Fizikalne metode predobrade

Fizička predobrada uključuje mehaničke procese kao što su usitnjavanje, mljevenje, drobljenje, te metode kao što su mikrovalno zračenje, ultrazvuk, sušenje raspršivanjem, gama zračenje i piroliza (Kucharska i ostali 2018). Glavne prednosti fizičke predobrade su smanjenje veličine čestica biopolimera, povećanje dostupne površine i veličine pora, te smanjenje kristalnosti i

stupnjeva polimerizacije celuloze. Smanjenje kristalnosti poboljšava enzimsku hidrolizu i povećava biorazgradivost lignoceluloznih materijala (Taherzadeh i Karimi 2008). Mehanička predobrada koristi se u predobradi materijala kao što su razni poljoprivredni i šumski ostaci. Pokazalo se da delignifikacija i depolimerizacija koje se odvijaju tijekom fizikalnih predtretmana biomase mogu značajno ograničiti količine toksičnih spojeva (furana i njegovih derivata) koji nastaju tijekom hidrolize i fermentacije. Međutim, mehanička predobrada iziskuje velike količine energije i može biti ekonomski neisplativa (Amin i ostali 2017).

### 2.2.2. Kemijske metode predobrade

Kemijske metode predobrade koriste se češće nego biološke ili fizikalne metode predobrade jer su učinkovitije i pospješuju biorazgradnju složenih materijala. Uobičajene kemikalije koje se koriste u metodama kemijske predobrade su sumporna kiselina ( $H_2SO_4$ ), klorovodična kiselina ( $HCl$ ), octena kiselina ( $CH_3COOH$ ), natrijev hidroksid ( $NaOH$ ), kalijev hidroksid ( $KOH$ ), vapno ( $Ca(OH)_2$ ), amonijak ( $NH_4OH$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) te ozon ( $O_3$ ) (Singhvi, Zinjarde, i Kim 2022).

Kiselinska predobrada rezultira prekidom van der Waalsovih sila, vodikovih veza i kovalentnih veza koje drže zajedno komponente biomase, što posljedično uzrokuje otapanje hemiceluloze i redukciju celuloze (Amin i ostali 2017). Iako su vrlo efikasne za hidrolizu celuloze, koncentrirane kiseline su otrovne, korozivne i opasne, pa stoga zahtijevaju reaktore koji su otporni na korozije, što čini proces vrlo skupim. Ozonoliza je jedan od načina smanjenja sadržaja lignina u lignoceluloznom otpadu pri čemu dolazi do oksidacije lignina u spojeve niske molekularne težine, kao što su octena kiselina, mravlja kiselina itd. To rezultira povećanjem in vitro probavljivost tretiranog materijala. Ozon se može koristiti za razgradnju lignina i hemiceluloze u mnogim lignocelulozama materijali kao što su pšenična slama, zeleno sijeno, kikiriki, bor, slama pamuka itd. Ozonoliza najviše utječe na lignin, utjecaj na hemicelulozu je malen, a na celuloza nikakav (Kumar i ostali 2009).

Alkalna predobrada uključuje dodavanje baza biomasi, što dovodi do povećanja unutarnje površine bubrenjem, smanjenja stupnja polimerizacije i kristalnosti celuloze, uništavanja veza između lignina i drugih polimera i razgradnje lignina. Alkalna predobrada funkcionira bolje kod biomase s niskim sadržajem lignina, te povećanje sadržaja lignina u biomasi čini ovu metodu manje učinkovitom.  $NaOH$ ,  $KOH$  i  $Ca(OH)_2$  najčešće su korištene kemikalije u alkalnoj predobradi, koja ima relativno blage procesne uvjete, ali je vremenski dugotrajna metoda predobrade (Amin i ostali 2017).

### 2.2.3. Fizikalno-kemijske metode predobrade

Glavne metode fizikalno kemijske predobrade su autohidroliza ili eksplozija vodenom parom te eksplozija amonijakom. Pri obradi parom lignocelulozni materijal se prvo obrađuje vodenom parom pri visokoj temperaturi (160-260 °C) i visokom tlaku (0.69–4.83 MPa). Zatim se tlak pare naglo smanjuje, što dovodi do uništenja unutarnje prostorne strukture lignoceluloze. Visoka temperatura i tlak pospješuju razgradnju glikozidnih veza u celulozi i hemicelulozi i cijepanje veza hemiceluloza-lignin. Prednosti su mali učinak na okoliš, ograničena upotreba kemikalija i visoka energetska učinkovitost (Baruah i ostali 2018). Međutim, nedostatak ove metode je veliki gubitak hemiceluloze, mali učinak na lignin i visoka cijena (Zeng i ostali 2021). Predobrada eksplozijom amonijaka slično je predobradi parom. Lignocelulozna biomasa zagrijava se s tekućim amonijakom (u omjeru 1:1) u zatvorenoj posudi na temperaturi oko 60–100 °C pod visokim tlakom u trajanju od 5–30 min, a zatim se tlak naglo smanjuje (Sindhu, Binod, i Pandey 2016). Korištenjem ove metode može se učinkovito ukloniti lignin i smanjiti kristaličnost celuloze. Nedostatak su i u ovom slučaju cijena opreme i energije (Zeng i ostali 2021).

### 2.2.4. Biološka predobrada

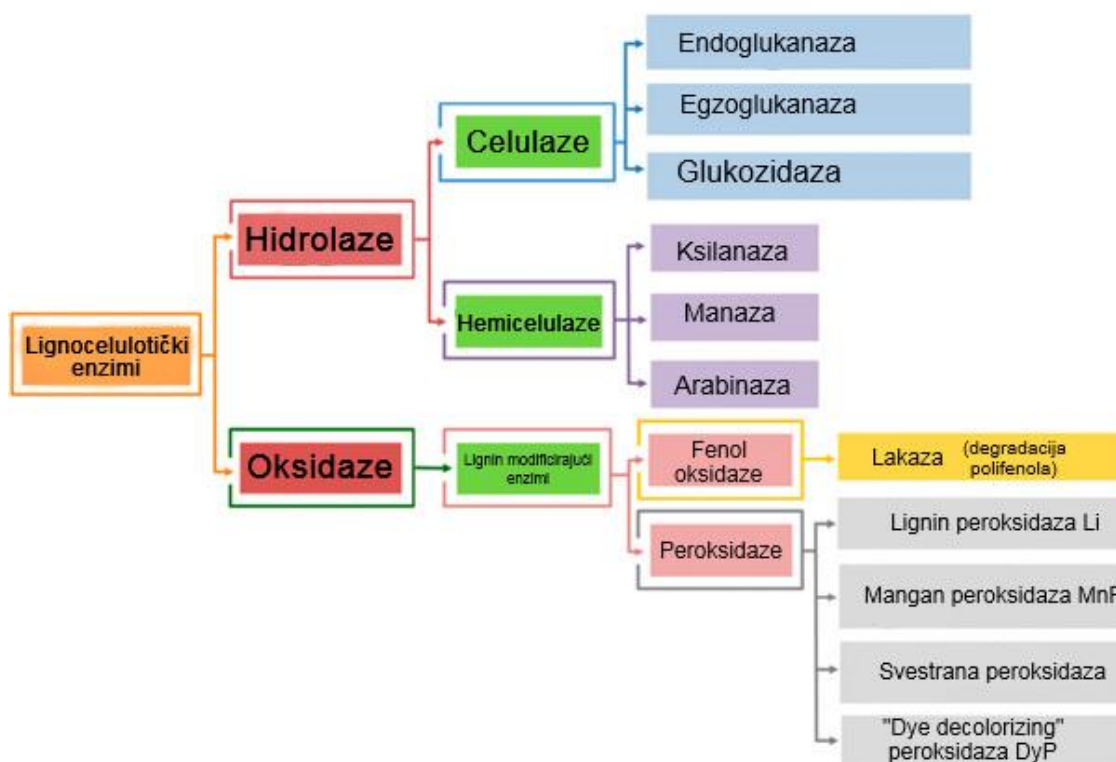
Biološka predobrada zahtijeva žive mikroorganizme ili izolirane enzime za obradu lignoceluloznog materijala i ova metoda je ekološki prihvatljivija te zahtijeva manje uložene energije od ostalih metoda predobrade, pri čemu ne nastaju inhibitorini spojevi jer se provodi u blagim uvjetima (Aftab i ostali 2019). U prirodi postoji veliki broj mikroorganizama koji se mogu primijeniti u biološkoj predobradi. Sposobnost razgradnje mikroorganizama uglavnom potječe iz njihovih jedinstvenih enzimskih sustava (Wu i ostali 2022).

Enzimi su makromolekule koje proizvode živi organizmi, a kada se uvedu u reakciju ili sustav, mogu ubrzati biološke/biokemijske reakcije. Time potpomažu pretvorbi supstrata u krajnje produkte jer daju odgovarajuće uvjete za odvijanje reakcija. Enzimi se smatraju "zelenim" industrijskim kemikalijama sa širokim spektrom industrijske primjene i mogu se koristiti u ekološki prihvatljivim bioprocima. Svi poznati enzimi spadaju u jednu od šest glavnih klasa: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Lignocelulolitički enzimi mogu se okarakterizirati kao velika skupina uglavnom izvanstaničnih proteina koji se koriste kao biokatalizatori uključeni u razgradnju lignina i celuloznih materijala u njihove komponente

za daljnju hidrolizu u korisne proizvode. Mogu se podijeliti na celulaze, hemicelulaze i ligninaze ovisno o supstratu kojeg hidroliziraju (Slika 2) (Li i ostali 2022).

Celulaze se prvenstveno sastoje od endoglukanaze, egzoglukanaze i  $\beta$ -glukozidaze. Endo- i egzo-glukanaze hidroliziraju  $\beta$ -1,4-glikozidne veze s krajeva lanca celuloze kako bi se oslobodila celobioza i nešto glukoze.  $\beta$ -glukozidaze konačno cijepaju celobiozu na glukozu (Sharma, Xu, i Qin 2019). Među hemicelulazama endo-1,4- $\beta$ -d-ksilanaza je hidrolaza koja cijepa  $\beta$ -ksilozidnu vezu. Hemicelulaze također uključuju enzime poput  $\beta$ -ksilosidaze,  $\alpha$ -arabinofuranozidaze i esteraze koji hidroliziraju ksilooligosaharide u ksilozu; arabinozu u furanozu i piranozu; acetilne skupine u arabinozu i ferulinsku kiselinu (Li i ostali 2022).

Glavne ligninaze uključuju lakazu, lignin peroksidazu i mangan peroksidazu. Važnost lakaze u razgradnji lignina pripisuje se njezinoj sposobnosti da oksidira nefenolne ligninske modelne spojeve preko određenih redoks medijatora. LiP katalizira cijepanje  $\beta$ -o-4 eterskih veza i C $\alpha$ -C $\beta$  veza u ligninu, uzrokujući tako depolimerizaciju lignina. Također katalizira hidroksilaciju, stvaranje kinina i cijepanje aromatskog prstena. MnP je oksidaza ovisna o Mn(II) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koja oksidira lignin (Saritha, Arora, i Lata 2012).



**Slika 2.** Shematski prikaz podjele lignocelulotičkih enzima (prilagođeno iz Kumla i ostali 2020).

Trenutno se enzimi koji se koriste za hidrolizu lignoceluloze proizvode pomoću gljiva. Međutim, njihova relativno visoka proizvodna cijena čini 20-40 % ukupnih troškova

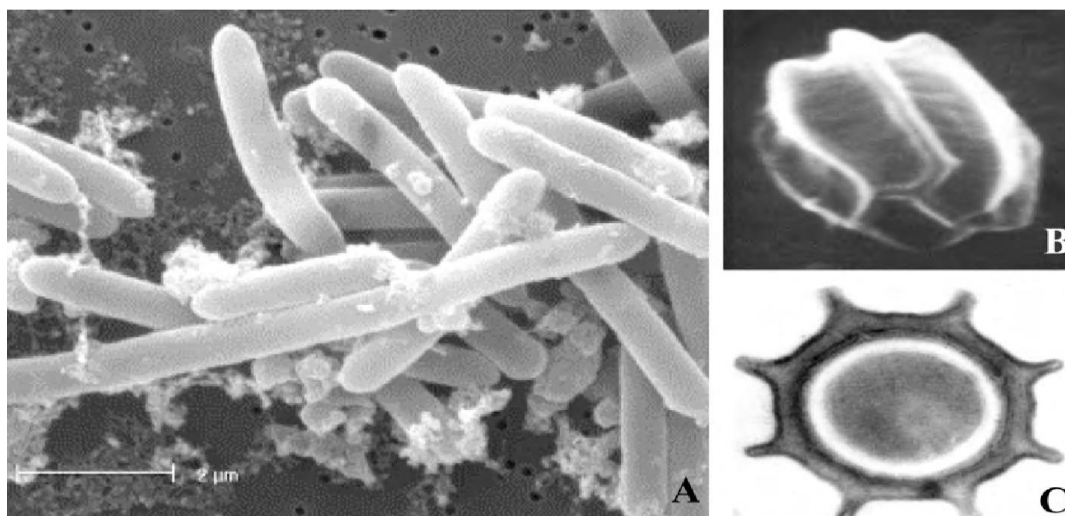
proizvodnje celuloznog etanola (Naresh Kumar et al., 2019.). Korištenje bakterijskih enzima za hidrolizu polisaharida moglo bi biti povoljnije zbog šire dostupnosti, bolje tolerancije i stabilnosti pri teškim procesnim uvjetima, te bolje prilagodljivosti na potencijalne inhibitore nastale tijekom procesa pretvorbe lignoceluloze. Oni mogu bolje podnijeti stres iz okoliša jer posjeduju sposobnost prilagodbe na promjene temperature, saliniteta, pH i dostupnost kisika. Bakterijski sojevi općenito imaju kratko generacijsko vrijeme što znači da se mogu lakše uzgajati i genetički manipulirati. Rast bakterija u kasnijoj fazi razgradnje lignoceluloze može se povećati, što je posebno korisno jer je poznato da ova faza ima materijale koji se obično teško razgrađuju. Bakterijske lignocelulaze tvore multienzimske komplekse koji su prikladniji za složenu razgradnju biomase a neki bakterijski rodovi koji su pokazali mogućnost korištenja za razgradnju biomase i proizvodnju lignoceluloznih enzima uključuju *Acetovibrio*, *Paenibacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomanas*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Microbispora*, *Ruminococcus*, *Streptomyces* i *Thermomonospora* (Chukwuma et al., 2021).

Čimbenici koji doprinose otpornosti lignoceluloze na enzimsku hidrolizu uključuju sljedeće: sadržaj lignina i hemiceluloze, kristalnost celuloze, dostupna površina te poroznost. Prisutnost lignina i hemiceluloze otežava pristup enzima celulaze celulozi, čime se smanjuje učinkovitost hidrolize. S druge strane, lignin djeluje kao fizička barijera, sprječava hidrolizaciju probavljivih dijelova supstrata i neproduktivno se veže za celulolitičke enzime. Prisutnost hemiceluloze smanjuje srednju veličinu pora supstrata i stoga smanjuje dostupnost celuloze hidrolitičkim enzimima. Stupanj polimerizacije i kristaliničnost celuloze smatraju se važnim čimbenicima u određivanju brzina hidrolize. Veća kristalnost celuloze, zajedno s duljinom lanca glukana, otežava proces hidrolize. Veličina pora supstrata u odnosu na veličinu enzima još je jedan ograničavajući čimbenik u enzimatskoj hidrolizi lignocelulozne biomase. Celulaze se mogu zarobiti u porama ako je unutarne područje mnogo veće od vanjskog, što je slučaj s mnogim lignoceluloznim materijalima (Saritha, Arora, i Lata 2012).

### **2.3. BAKTERIJA *Paenibacillus polymyxa***

*Paenibacillus* su štapićaste, gram-pozitivne, pokretne, fakultativno anaerobne ili striktno aerobne bakterije koje uglavnom pokazuju optimalan rast pri neutralnom pH unutar temperaturnog raspona od 28-40 °C (Raza, Yang, i Shen 2008). Bakterije koje pripadaju rodu *Paenibacillus* izolirane su iz različitih okoliša, većina ih se nalazi u tlu i često su povezane s korijenjem biljaka. Ove rizobakterije potiču rast biljaka i iskoristive su u poljoprivredi, mnoge vrste proizvode antimikrobne spojeve koji su korisni u medicini ili kao pesticidi, a mnoge daju

enzime koji se mogu koristiti za bioremedijaciju ili za proizvodnju vrijednih kemikalija (Grady i ostali 2016). Za nekoliko vrsta roda *Paenibacillus* je pronađeno da sudjeluje u atmosferskoj fiksaciji dušika, solubilizaciji fosfata i kalija, proizvodnji fitohormona i antimikrobnih metabolita, te unosu biljnih mikronutrijenata. Osim toga, nekoliko vrsta *Paenibacillus* izoliranih iz različitih okoliša također ima potencijal za bioremedijaciju ksenobiotika u nepovoljnim uvjetima okoliša (Patowary i Deka 2020). *Paenibacillus polymyxa* je jedna od 165 vrsta od kojih se sastoji rod *Paenibacillus* (Jeong i ostali 2019). *P. polymyxa* je također gram-pozitivna, neutrofilna, sporulirajuća, štapićasta bakterija s peritrihnim flagelama (bičevi po cijeloj površini stanice) (Slika 3). Prebiva uglavnom u tlu, rizosferi i biljnom tkivu, te se može izolirati i iz morskih sedimenata i fermentirane hrane. *Paenibacillus polymyxa* promjenila je nekoliko imena od svog otkrića 1880. Prvo je označena kao *Clostridium polymyxa*, koja je 1889. promijenjena u *Bacillus polymyxa* zbog svojih štapićastih stanica. Godine 1993. komparativna analiza sekvence 16S rRNA roda *Bacillus* dovela je do reklasifikacije novog roda pod nazivom *Paenibacillus* (Langendries i Goormachtig 2021).



**Slika 3.** A) Stanice bakterije *Paenibacillus polymyxa*. B) Cijeli prikaz i C) presjek spora *P. polymyxa* (prilagođeno iz Raza, Yang, i Shen 2008).

### 2.1.1. Primjena u industriji

Zbog učinkovite proizvodnje niza spojeva korisnih u industrijskim procesima, *P. polymyxa* je važan potencijalni biotehnoški iskoristiv mikroorganizam. Nekoliko sojeva proizvodi enzime koji razgrađuju stanične stijenke biljaka, kao što su  $\beta$ -1,3-glukanaze, celulaze, kitinaze, proteaze, ksilanaze i  $\beta$ -glukozidaze. *P. polymyxa* kodira za dvije homologne  $\beta$ -glukozidaze, BglA i BglB, koje posjeduju različite kvartarne strukture i specifičnosti supstrata. BglA je vrlo

specifična za celobiozu, a BglB djeluje kao egzo- $\beta$ -glukozidaza koja hidrolizira celobiozu i celodekstrine višeg stupnja polimerizacije (Lal i Tabacchioni 2009) . Izvanstanične proteaze koriste se u formulaciji deterdženata, prehrambenoj industriji, preradi kože, kemijskoj sintezi i gospodarenju otpadom. Još jedan primjer spojeva korisnih u industriji koje proizvodi ova bakterija su mikrobnih egzopolisaharidi (EPS), koji se primjenjuju, među ostalim, u uklanjanju metalnih iona u tokovima otpada, preradi minerala, kozmetičkoj proizvodnji i prehrambenoj industriji (Langendries i Goormachtig 2021). Poznato je da *P. polymyxa* proizvodi dvije vrste peptidnih antibiotika, jedna vrsta je aktivna samo protiv bakterija, a druga je aktivna protiv gljivica, gram pozitivnih bakterija i aktinomiceta. Ova vrsta također sintetizira biljne hormone auksin i citokinin, otapa fosfor u tlu, povećava poroznost tla i koristi se za flokulaciju i flotaciju raznih minerala. Spore *P. polymyxa* uzrokuju deformaciju sporangija i imaju debele stijenke sa zvjezdastim dijelom te mogu dugo ostati u stanju mirovanja. Zbog svoje sposobnosti da prežive ekstremne uvjete, uključujući visoke temperature, biocide, pritisak, UV zračenje, sušenje i otrovne kemikalije endospore mogu tolerirati pasterizaciju i preživjeti u industrijskim pogonima. *P. polymyxa* proizvodi razne antimikrobne spojeve (tj. sekundarne metabolite) uključujući lipopeptidni polimiksin, fusaricidine, paenilipoheptin, paenilan i tridekaptin – koji su potencijalno korisni za liječenje infekcija rezistentnih na više lijekova i drugih biljnih i ljudskih mikrobnih patogena (Pandey, Barbetti, i Lamichhane 2023). Ovaj antagonistički potencijal osnova je za učinkovitu primjenu sojeva *P. polymyxa* kao alternativu kemijskoj kontroli širokog skupa gljivičnih i bakterijskih biljnih patogena. Polimiksini djeluju baktericidno na Gram-negativne bacile, posebice iz roda *Pseudomonas* i koliformne bakterije. Prvi član obitelji polimiksina, polimiksin B, otkriven je 1947. Od tada je otkriveno najmanje 15 različitih polimiksina u različitim bakterijskim vrstama. Opća struktura polimiksina uključuje ciklički heptapeptidni dio vezan za tripeptidni bočni lanac s masnim acilnim ostacima na N-terminalnoj amino skupini. Polimiksini se mogu međusobno razlikovati po sastavu aminokiselina ili masnih kiselina. Polimiksin B i polimiksin E (kolistin) opsežno su karakterizirani i koriste se kao sulfatni, sulfometilirani ili kolistimetatni oblici lijekova, posebno za infekcije uzrokovane Gram-negativnim bakterijama (Raza, Yang, i Shen 2008). Još jedan industrijski važan proizvod koji proizvodi *P. polymyxa* je optički aktivni 2,3-butandiol koji ima mnoge industrijskim namjene. Njegovi se derivati koriste za proizvodnju sintetičke gume, sredstava protiv smrzavanja, otapala, plastike, aroma u proizvodnji hrane, lijekova, kozmetičkih proizvoda, losiona i aditiva u hrani. Njegova mikrobna proizvodnja posebno je privukla pažnju kao alternativa proizvodnji na bazi nafte (Hakizimana, Matabaro, i Lee 2020).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten tijekom istraživanja bila je bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Radna kultura čuvana je pri 4 °C na odgovarajućoj krutoj hranjivoj podlozi, u Petrijevim zdjelicama.

##### 3.1.2. Kemikalije, enzimi i sirovine

**Tablica 1.** Kemikalije, enzimi i sirovine korišteni prilikom izrade ovog rada

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
amonijev klorid	p.a.	Poch, Poljska
amonijev sulfat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
agar	tehnički	Biolife, Italija
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Biolab, Mađarska
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
tripton	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
glukoza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	≥ 98 %	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	99 %	Honeywell, SAD
natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska

mikrokristalična celuloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
karboksimetilceluloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksilan	> 95 %	Biosynth Carbosynth, Švicarska
D-(-)-fruktoza	za biokemiju i mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
D-(+)-celobioza	≥ 97.0 %	Molekula, UK
arabinoksilan	≈ 95 %	Megazyme, Irska
sumporna kiselina	96%	MerckKgaA, Njemačka

### 3.1.3. Hranjive podloge

#### 3.1.3.1. Kruta podloga

Sastav krute podloge bio je sljedeći (u g/L): pepton 5, mesni ekstrakt 3, i glukoza 1, agar 15.

#### 3.1.3.2. Tekuća podloga

Za uzgoj u reaktoru i održavanje kulture u epruvetama i tikvicama korištena je tekuća podloga sastava (u g/L): pepton 5, mesni ekstrakt 3, i glukoza 1.

#### 3.1.3.3. Medij za uzgoj

Medij za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama i reaktoru bio je sljedećeg sastava (u g/L): ekstrakt kvasca 5, tripton 5,  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  0,2,  $KH_2PO_4$  3,5,  $K_2HPO_4$  3,75,  $NH_4Cl$  1,  $(NH_4)_2SO_4$  4,  $Na_2HPO_4$  6. Otopina elemenata u tragovima pripremljena je zasebno, filtrirana kroz jednokratni sterilni filter pomoću štrcaljke (veličina pora 0,20  $\mu m$ , pa 20/25, najlon; CHROMAFIL Xtra, Macherey-Nagel GmbH & Co., KG, Düren, Njemačka), te dodana količina od 1mL u medij nakon sterilizacije. Otopina elemenata u tragovima sadržavala je sljedeće (u g/L):  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  2,5,  $C_4H_4Na_2O_6 \times 2 H_2O$  2,1,  $Cl_2Mn \times 2 H_2O$  1,8,  $CoCl_2 \times 6 H_2O$  0,075,  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  0,031, borna kiselina 0,258,  $NaMoO_4 \times 2 H_2O$  0,023 i  $ZnCl_2$  0,021. U tikvice za uzgoj dodani su sljedeći izvori ugljika (1% w/w): natrijeva karboksimetilceluloza (CMC), arabinoksilan, D-(-)-fruktoza, D-(+)-celobioza, mikrokristalna celuloza (MCC), za uzgoj u reaktoru korišteno je 1% w/w D-(-)-fruktoze.

### 3.1.4. Oprema i uređaji

#### 3.1.4.1. Centrifuga

Tijekom pripreme uzoraka za UPLC analizu i pripremu uzoraka za DNS analizu korištena je centrifuga CF-10 High-Performance (Witeg, Njemačka) pri 9 000 rpm.

#### 3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje koncentracija supstrata i produkata u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja. Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B 1290 Vialsampler), pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) te računalnog softvera za obradu podataka (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline protoka 0,6 ml/min, a volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL.

#### 3.1.4.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje optičke gustoće hranjive podloge kao pokazatelja rasta biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 pri valnoj duljini od 600 nm. Također, za određivanje koncentracije glukoze i ksiloze mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 575 nm i određivanje koncentracije proteina po Bradfordu pri 595 nm.

#### 3.1.4.4. Vage

Za vaganje kemikalija korištena je analitička vaga Acculab ALC210.4 (SAD) i tehnička vaga Tehtnica ET-1211 (Slovenija).

#### 3.1.4.5. Tresilica za mikrobiološke uzgoje

Uzgoji bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Erlenmeyerovim tikvicama provedeni su na tresilici Certomat RM (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka) pri 30 °C i 140 rpm.

#### 3.1.4.6. Bioreaktor

U svrhu uzgoja u bioreaktoru korišten je bioreaktor Biostat (Sartorius group, Njemačka) s miješalom maksimalnog kapaciteta 1,5 L

#### 3.1.4.7. Ostala oprema

Od ostale opreme i pribora korišten je pH metar, autoklav za sterilizaciju podloga, laboratorijskog posuđa i dijelova bioreaktora (Sutjeska, Jugoslavija), zamrzivač za pohranu uzoraka pri -20 °C, termomikser TS-100 (BioSan, Latvija) za miješanje i održavanje stalne temperature prilikom DNS analize, vortex miješalica, plamenici te stakleno i plastično laboratorijsko posuđe.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Bradford metoda

Bradford metoda je metoda određivanja proteina koja uključuje vezanje Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Vezanje boje za protein uzrokuje pomak u apsorpcijskom maksimumu boje sa 465 na 595 nm, a prati se povećanje apsorpcije na 595 nm (Bradford 1976).

Uzorci su pripremljeni miješanjem 40 µL uzorka sa 600 µL Bradfordovog reagensa u plastičnoj kiveti. Kiveta je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta nakon čega je izmjerena apsorbanca uzoraka na 595 nm korištenjem UV/VIS spektrofotometra. Koncentracije proteina su automatski izračunate pri čemu je u svrhu izračuna koncentracije proteina bilo potrebno napraviti baždarni dijagram. Za izradu dijagrama pripremljeno je pet otopina u rasponu masenih koncentracija od 1-10 g/L u Eppendorf kivetama od 1 mL. Potom su izmjerene apsorbanca na 595 nm za svih 5 točaka kako bi se dobio pravac tj. jednačba pravca [1] pomoću kojega program automatski računa koncentracije proteina.

$$Abs = 0,90188 * koncentracija (mg/mL) + 0,05423 \quad [1]$$

#### 3.2.2. DNSA metoda

DNSA metoda korištena je za određivanje koncentracije reducirajućih šećera. 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS ili DNSA) je aromatski spoj koji reagira s redukcijskim šećerima i drugim redukcijskim molekulama da bi se stvorila 3-amino-5-nitrosalicilna kiselina, koja snažno apsorbira svjetlost na 540 nm (Miller 1959). Aktivnost nekoliko celulolitičkih enzima može se procijeniti pomoću inkubacija otopine uzorka s različitim celuloznim ili hemiceluloznim supstratima i kvantificiranje oslobođenih šećera. Korištena su tri supstrata: natrijeva karboksimetil celuloza (CMC), mikrokristalna celuloza (MCC) i ksilan. Jedna jedinica enzimske aktivnosti = U određena je kao količina enzima koji otpušta 1 µmol

odgovarajućeg reducirajućeg šećera u minuti. Specifična enzimaska aktivnost izražena je kao enzimске jedinice po mg ukupnih proteina.

Uzorci za analizu su uzimati u razmacima od jednog sata, potom je u svrhu DNS analize razrijeđeno 700  $\mu\text{L}$  uzorka sa 300  $\mu\text{L}$  vode. Izvavano je 5-10 mg supstrata u reakcijsku epruvetu od 1500  $\mu\text{L}$  i dodano 1000  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine uzorka. Eppendorf kivete su stavljene na inkubaciju 30 minuta na termo tresilici pri 45 °C. Nakon inkubacije uzorci su stavljani na centrifugiranje 5 minuta pri 10 000 okretaja u minuti kako bi se istaložio višak supstrata. Potom je 600  $\mu\text{L}$  supernatanta dodano u 600  $\mu\text{L}$  DNSA reagensa u reakcijskoj epruveti od 2000  $\mu\text{L}$ . Smjesa je inkubirana 15 minuta na 95 °C, u slučaju prisutnosti redukcijskih šećera inkubaciju prati razvoj boje iz žute (boja DNA reagensa) u jantarnu. Nakon inkubacije odmah je dodano 200  $\mu\text{L}$  Rochellove soli za stabilizaciju boje. Uzorak je ostavljen 5 minuta na sobnoj temperaturi i mjerena je apsorbancija na 575 nm na UV/VIS spektrometru. Enzimaska aktivnost (U) računata je prema jednadžbi [2] gdje smo dobili U/mL, a specifična enzimaska aktivost U/mg izračunata je prema jednadžbi [3]. Ukupni volumen reakcije bio je 1 mL. Za pretvorbu masene koncentracije u količinu oslobođenog šećera ( $\mu\text{mol}$ ) korišteni su sljedeći odnosi:

$$\text{Glukoza: } 1\text{mg} = 5,5506 \mu\text{mol}$$

$$\text{Ksiloz: } 1\text{mg} = 6,6609 \mu\text{mol}$$

$$\text{Enzimaska aktivnost (U/mL)} = \frac{\text{oslobođeni šećer } [\mu\text{mol}]}{\text{vrijeme inkubacije [min]} \times 1\text{mL}} \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [2]$$

$$\text{Specifična enzimaska aktivnost (U/mg)} = \frac{\text{enzimaska aktivnost (U/mL)}}{\text{masena koncentracija proteina (mg/mL)}} \quad [3]$$

### 3.2.3. UPLC (Ultra-performance liquid chromatography)

Za određivanje koncentracije šećera u podlozi korišten je UPLC; Agilent Technologies 1290 Infinity II LC sustav (Santa Clara, CA, Sjedinjene Države), Carbo-H++ predkolona (4 mm  $\times$  3 mm; Phenomenex, Des Plaines, IL, Sjedinjene Države), kolumna Rezex ROA (15 cm  $\times$  7,8 mm; Phenomenex, Des Plaines, IL, Sjedinjene Države). Mobilna faza bila je 0,0025 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, volumen analiziranog uzorka bio je 10  $\mu\text{l}$ , a brzina protoka bila je 0,6 ml min<sup>-1</sup>.

Pripremljena je 10% w/w otopina ZnSO<sub>4</sub> tako što je otopljeno 5 g ZnSO<sub>4</sub> u 50 ml deionizirane vode. Uzorci za UPLC analizu pripremljeni su tako da je alikvot od 750  $\mu\text{l}$  supernatanta

pomiješan sa 750 µl 10% w/w ZnSO<sub>4</sub>. Dobivena smjesa je vrtložena 20 s i ostavio da stoji 10 minuta, nakon čega je uzorak centrifugiran pri 13.500 o/min tijekom 5 min (CF-10, witeg Labortechnik GmbH, Offenburg, Njemačka) za uklanjanje proteina. Volumen od 1,5 ml supernatant je filtriran kroz 0,20-µm najlonski filter u vijalu pomoću štrcaljke (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka).

#### 3.2.4. Priprema krute hranjive podloge

Za održavanje kulture bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u Petrijevim zdjelicama pripremljena je tekuća podloga kojoj je dodan agar (sastav definiran u poglavlju 3.1.3.1), Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C / 20 min i razlivena u Petrijeve zdjelice. Zatim je, nakon hlađenja razlivenih podloga, bakterijska kultura sterilno precijepljena na čvrste hranjive podloge i ostavljena na 30 °C preko noći kako bi kultura porasla.

#### 3.2.5. Priprema tekuće hranjive podloge

Za uzgoj u tikvicama i epruvetama pripremljena je hranjiva podloga tako da se u odgovarajući volumen demineralizirane vode dodaju i otope prethodno izračunate i odvagane mase potrebnih sastojaka (sastav definiran u poglavlju 3.1.3.2). U pet epruveta pripremljeno je 20 mL podloge i pomoću sterilne ušice precijepljena je prethodno porasla kultura na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama, te ostavljena na 30 °C preko noći. U pet Erlenmeyerovih tikvica dodano je po 300 mL pripremljene podloge za inokulum i po 1% supstrata. pH vrijednost hranjivih podloga, po potrebi, podešena je dodatkom sumporne kiseline. Tikvice su stavljene na sterilizaciju u autoklav pri 121 °C tokom 20 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja podloge, sterilno je dodano po 1 ml/L otopine elemenata u tragovima preko sterilnog filtera veličine pora 0,2 µm te su tikvice inokulirane s po 15 ml prethodno uzgojene kulture iz epruveta. Uzgoj se provodi preko noći, na tresilici, pri 140 okr/min i temperaturi od 35 °C. Uzorci za analizu uzimani su u sterilnim uvjetima tijekom 8 sati (uzgoj u lužnatom mediju), odnosno 9 sati (uzgoj u kiselom mediju), svakih sat vremena, potom nakon 24 i 25 sati od početka uzgoja u oba uzgoja.

#### 3.2.6. Priprema podloge za uzgoj u bioreaktoru

Za uzgoj u bioreaktoru pripremljena je podloga od 1,3 L u koju je dodano 1 % fruktoze, a za inokulum je pripremljeno 250 mL tekuće podloge (prethodno definirani sastavi u poglavlju 3.1.3). Prilagođen je pH podloge pomoću sumporne kiseline i tikvice su stavljene na

sterilizaciju u autoklav pri 121 °C / 20 min. Zatim je u podlogu za uzgoj u bioreaktoru dodano 5 mL otopine elemenata u tragovima i sadržaj tikvice prebačen je u bioreaktor s miješalom. U podlogu za uzgoj inokuluma precijepljena je kultura *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, zatim je sadržaj tikvice prebačen u reaktor i započet je uzgoj. Uzorci su uzimani svakih sat vremena, a uzgoj je trajao 24 sata.

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

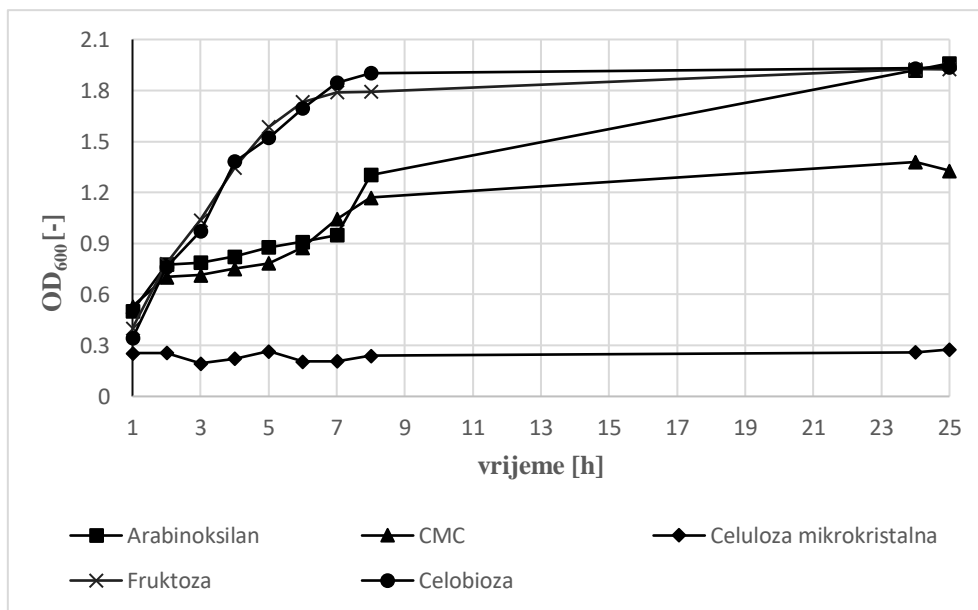
U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na pet različitih supstrata u bazičnim i kiselim podlogama. Na slikama 4. i 5. prikazan je rast bakterijske biomase tijekom 25 sati uzgoja bakterije u tikvicama s različitim izvorima ugljika. Poglavlje 4.2. sadrži prikaz rezultata enzimske aktivnosti tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bazičnim i kiselim uvjetima. Prikazani su grafovi (Slika 6. i 7. ) na kojima se vidi promjena enzimske aktivnosti tokom 25 h uzgoja na pet različitih izvora ugljika i tri supstrata korištena u DNSA analizi.

U poglavlju 4.3. su prikazani rezultati uzgoja u većem mjerilu u bioreaktoru s jednim miješalom na fruktozi kao izvoru ugljika pri pH vrijednosti 4,23.

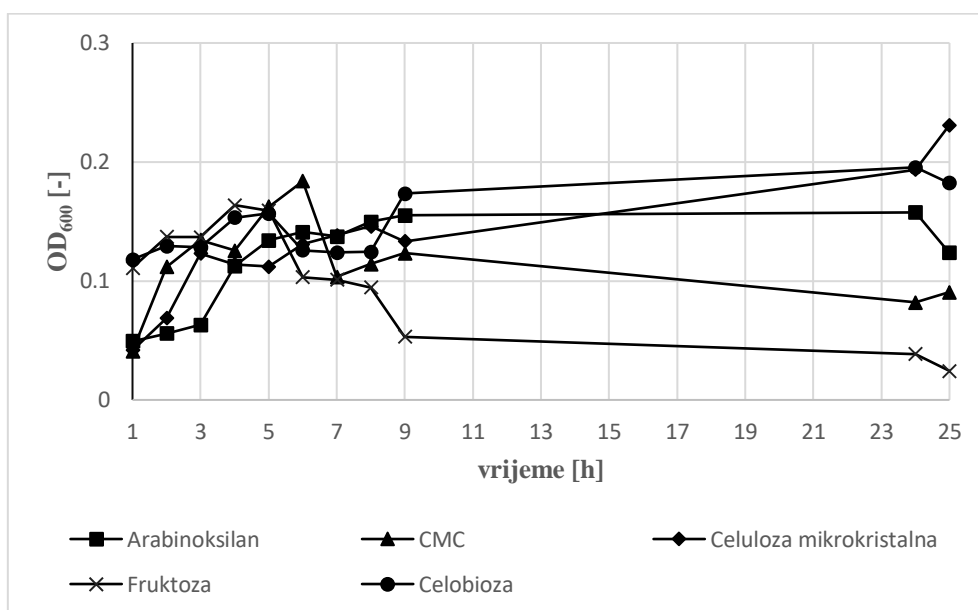
Nakon svakog rezultata prikazanog dijagramom slijedi rasprava dobivenih rezultata.

##### **4.1. Uzgoj bakterije *Paenibacillus Polymyxa* DSM 742 na podlogama s različitim izvorima ugljika**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja opisanog u poglavlju 3.2.5. Kao direktni pokazatelj rasta bakterijske biomase korištena je promjena optičke gustoće podloge pri 600 nm. Rezultati promjene optičke gustoće OD<sub>600</sub> tijekom vremena su prikazani na slikama 4. i 5.



**Slika 4.** Promjena OD<sub>600</sub> [-] tijekom uzgoja *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima ugljika pri pH 6,79



**Slika 5.** Promjena OD<sub>600</sub> [-] tijekom uzgoja *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima ugljika pri pH 4,54.

Prema dobivenim rezultatima na slici 4., gdje je prikazan uzgoj u bazičnim uvjetima, možemo vidjeti kako je eksponencijalna faza rasta nastupila gotovo odmah u prvih sat vremena uzgoja za sve izvore ugljika osim mikrokristalnu celulozu gdje nije zabilježen značajan porast bakterijske biomase. Najveći porast uočavamo na fruktozi i celobiozi kao izvorima ugljika,



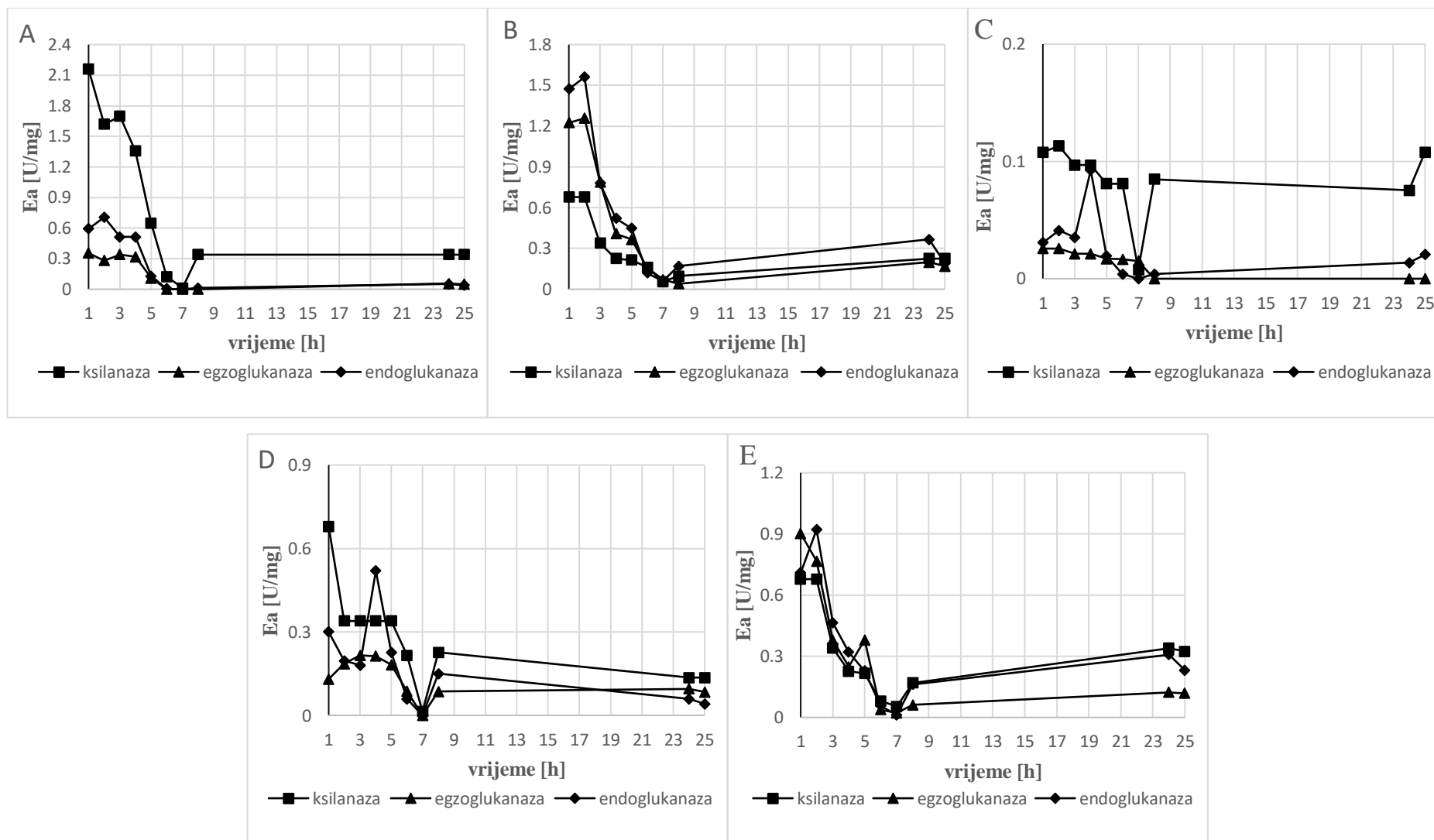
vrijednosti  $OD_{600}$  u ta dva slučaja rastu eksponencijalno do 8. sata uzgoja gdje dostižu vrijednosti između 1,8 i 2,0. Nakon toga bakterijska biomasa na celobiozi ulazi u stacionarnu fazu rasta što vidimo u nepromijenjenim vrijednostima u 24. i 25. satu rasta. Na fruktozi se vidi mali porast između 8. i 25. sata rasta, ali vrijednosti su još uvijek u intervalu od 1,8 do 2,0. Na arabinoksilanu i karboksimetil celulozi (CMC) zabilježen je pad u rastu biomase nakon 2. sata uzgoja, te lagani porast do 8. sata uzgoja. Na arabinoksilanu biomasa nastavlja rasti preko  $OD_{600}$  1,3 u 8. satu uzgoja do vrijednosti 2,0 u 25. satu uzgoja. Dok na CMC u 8. satu uzgoja dostiže vrijednost 1,1, a nakon toga zabilježen je rast do 1,3 u 24. satu uzgoja, a pad se vidi već u 25. satu uzgoja.

Prema dobivenim rezultatima na slici 5. vidimo da je u kiselim uvjetima rast bakterijske biomase slabiji nego u bazičnim uvjetima. Od početka do šestog sata uzgoja vidi se porast u vrijednostima  $OD_{600}$ . Vrijednosti su se uglavnom kretale između 0,1 i 0,2. Kod uzgoja na mikrokrystalnoj celulozi i CMC vidi se porast i nakon 8. sata uzgoja, za CMC rast prestaje nakon 24. sata i vidi se lagani pad. Kod mikrokrystalne celuloze rast se nastavlja prema 25. satu uzgoja. Na ostalim supstratima bakterija u 8. satu uzgoja ulazi su stacionarnu fazu pri čemu nakon 25. sata uzgoja dolazi do pada vrijednosti optičke gustoće uzoraka što ukazuje na odumiranje bakterijske biomase. Prema istraživanju (Walia i ostali 2013.) provedenom sa sojem *Paenibacillus polymyxa* CKWX1 bakterijska biomasa rasla je prvih 48 sati uzgoja i nakon toga se bilježio pad, uzgoj u ovom slučaju provodio se na pšeničnoj slami, koja sadrži 30 – 45% celuloze, 20 – 25% hemiceluloze, 15 – 20 % lignina. Istraživanje je također pokazalo da je optimalna količina supstrata u podlozi 1%, optimalna temperatura uzgoja bila je između 25 i 35 °C, a najuspješniji uzgoj bio je na pH između 6,5 i 7,5. U istraživanju (Gastelum-Arellanez, Paredes-López i Olalde, 2014.) korištena je bakterija *P. polymyxa* BEb-40 za ispitivanje proizvodne endoglukanaza na CMC kao izvoru ugljika u kiselim uvjetima pri mezofilnom temperaturnom opsegu. U ovim uvjetima rast bakterija uočen je samo u kulturama s glukozom, dok je tijekom cijelog vremena inkubacije s CMC-om zabilježena stabilna koncentracija biomase.

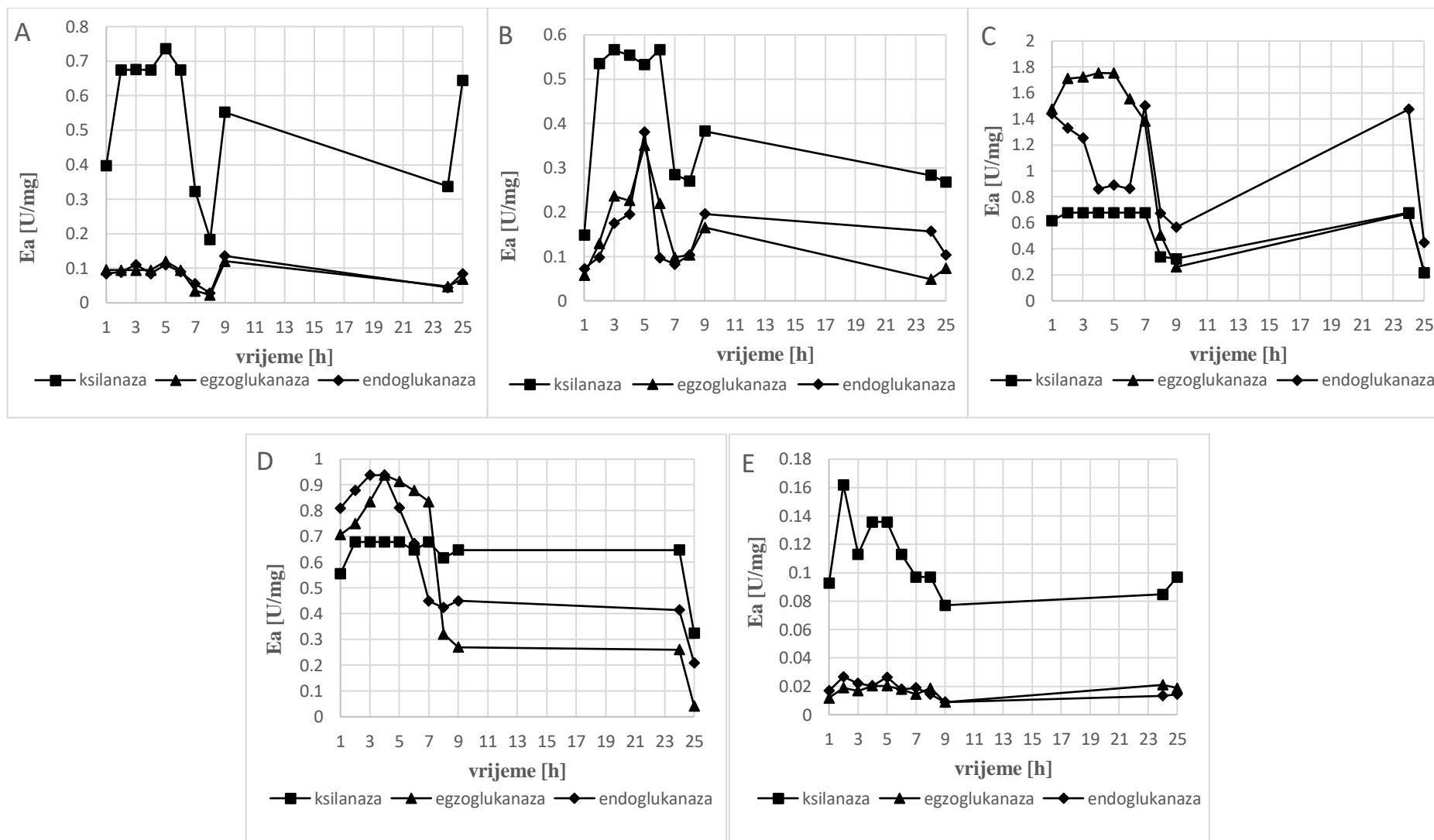
#### 4.2. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na različitim izvorima ugljika u svrhu sinteze lignocelulolitičkih enzima

Za ispitivanje proizvodnje lignocelulolitičkih enzima pomoću *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 korišteno je pet različitih supstrata i uzgoj je proveden u kiseloj i lužnatoj podlozi. Podloge sastava navedenog u poglavlju 3.1.3.2 i 3.1.3.3 su pripremljene u Erlenmeyerovim tikvicama

prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.5. Praćena optička gustoća prikazana je na slikama 4. i 5. i komentirana je u poglavlju 4.1., određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu opisano je u poglavlju 3.2.1., a koncentracije oslobođenih šećera određene DNSA metodom prevedene su u enzimске aktivnosti [U/mg] (opisano u poglavlju 3.2.2.) i prikazane su na slikama 6. i 7.



**Slika 6.** Promjena specifične enzimске aktivnosti [U/mg] dobivene uzgojem na podlogama s: A) CMC, B) arabinoksilanom, C) fruktozom, D) celobiozom, E) mikrokristalnom celulozom, tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u lužnatom mediju



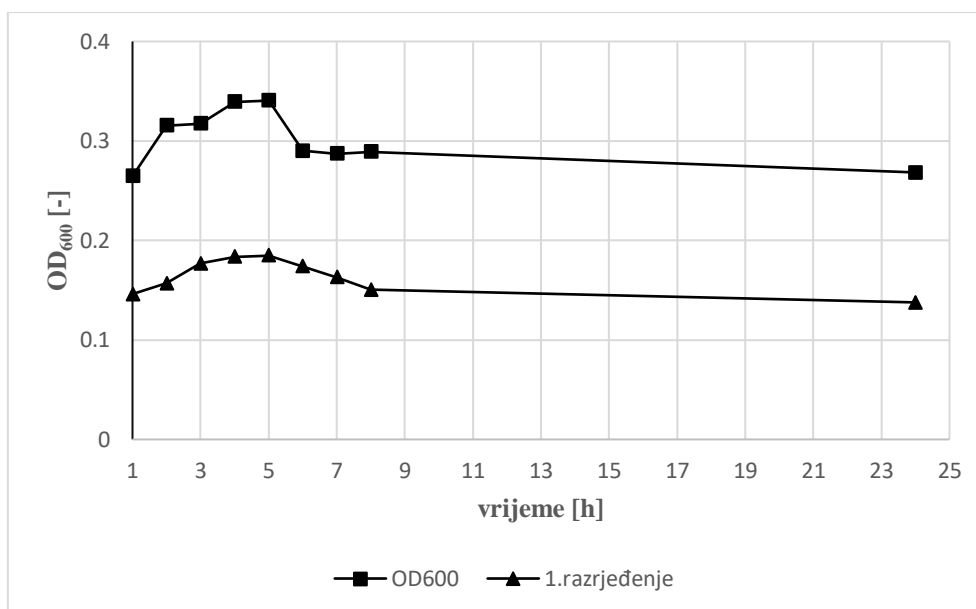
Slika 7. Promjena specifične enzimске aktivnosti [U/mg] na: A) CMC, B) Arabinoksilanu, C) Fruktози, D) Celbiozi, E) Mikrokrystalnoj celulozi, tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u kiselom mediju

Na slici 6. i 7. prikazana je različita specifična enzimska aktivnost [U/mg] u ovisnosti o vremenu. Ispitivana je ksilanazna, endoglukanazna i egzoglukanazna aktivnost enzima u lužnatim podlogama na slici 6., a na slici 7. u kiselim podlogama. Kod uzgoja u lužnatim podlogama enzimska aktivnost opada uglavnom na svim podlogama od prvog do 8. sata mjerenja. Kod CMC imamo najveću početnu aktivnost od 2,1 U/mg, arabinoksilan je sljedeći sa 1,6 U/mg, a ostale podloge imaju početne vrijednosti manje od 1 U/mg, fruktoza čak 0,1 U/mg i niže. Vidimo značajano niske vrijednosti za sve podloge u 7. satu uzgoja, isti slučaj i u kiseloj podlozi. Nakon početnog pada se vrijednosti ustaljuju na vrijednosti 0,3 U/mg i niže. Na fruktozi i celobiozi imamo odskakanja od tog trenda, naime u 4. satu uzgoja kada nam je kao supstrat korištena mikrokristalna celuloza imamo nagli porast enzimске aktivnosti i nakon 5. sata ponovni pad. Fruktoza kao podloga u bazičnom uzgoju se pokazala najlošija, njene vrijednosti enzimске aktivnosti tijekom cijelog uzgoja ne prelaze 0,3 U/mg. U podlozi sa niskom pH vrijednosti je suprotan slučaj, fruktoza i celobioza su se pokazale kao najbolje podloga sa maksimalnim aktivnostima većim od početne, što ukazuje na proizvodnju lignocelulotičkih enzima. Kod fruktoze se ksilanazna aktivnosti diže od 1,4 U/mg početne do 1,8 U/mg maksimalne aktivnosti u 5. satu proizvodnje. Kod ostalih enzima nema konkretnog rasta. Na celobiozi kao podlozi vidimo blagi rast aktivnosti enzima za razgradnju sva tri supstrata, iako vrijednosti ne prelaze 1 U/mg. Kod ostalih podloga također možemo zamijetiti rast u aktivnosti, a maksimalne vrijednosti uglavnom ne prelaze 0,7 U/mg. U svim slučajevima se vidi rast do 9. sata uzgoja, nakon toga se vrijednosti ustaljuju ili počinju padati, osim u slučaju fruktoze gdje se zamjećuje pad prema 9. satu uzgoja, te ponovni rast od 9. do 25. sata uzgoja. Enzimska aktivnost egzoglukanaza i endoglukanaza je u svim slučajevima manja od ksilanazne, na svim podlogama izuzev fruktoze i celobioze iznosi manje od 0,4 U/mg. U istraživanju (Walia i ostali 2013.) utvrđeno je da aktivnost ksilanaze jako ovisi o temperaturi uzgoja i pH. Ovo ponašanje bakterijske biomase može se pripisati uobičajenom odgovoru mezofilnih organizama kada se metaboličke aktivnosti uspore ispod i iznad optimalnih i rezultira denaturacijom određenih bitnih enzima uključenih u različite metaboličke puteve. Proizvodnja ksilanaze pri alkalnim pH vrijednostima zabilježena je za alkalotolerantne *Bacillus sp.*, u ovom istraživanju *Paenibacillus polymyxa* najveću enzimsku aktivnost pokazuje u podlogama koje su imale pH vrijednosti između 6,5 i 7,5. Proizvodnja ksilanaze na drugim pH razinama može biti posljedica njezine prilagodljivosti različitim pH medijima. U ranije spomenutom istraživanju (poglavlje 4.1.) (Gastelum-Arellanez, Paredes-López i Olalde, 2014.) pomoću soja *P. polymyxa* BEb-40 dobiveno je više od 70 % maksimalne aktivnosti endoglukanaze u kiselim uvjetima uzgoja bakterijske biomase. Zimografijom je detektirano

najmanje 14 proteinskih vrpci s endoglukanaznom aktivnošću u soju *P. polymyxa* BEb-40. Ovo istraživanje pokazuje da postoji potencijal bakterije *P. polymyxa* da pri niskim pH vrijednostima i visokim temperaturama proizvede endoglukanaze.

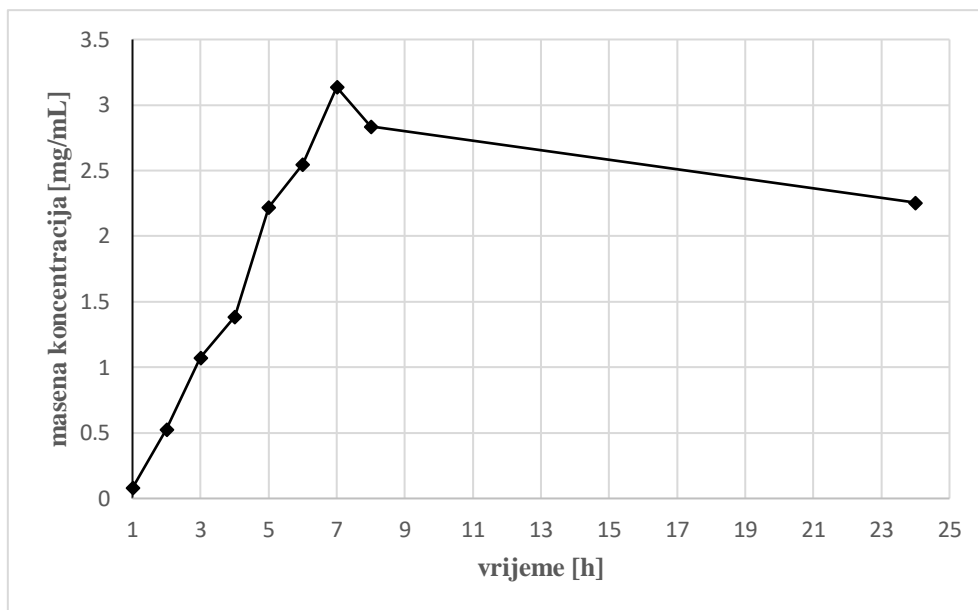
### 5.3. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na fruktozi kao izvoru ugljika

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6. S obzirom na rezultate proizvodnje lignocelulotičkih enzima na različitim izvorima ugljika, za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru korištena je fruktoza kao izvor ugljika.



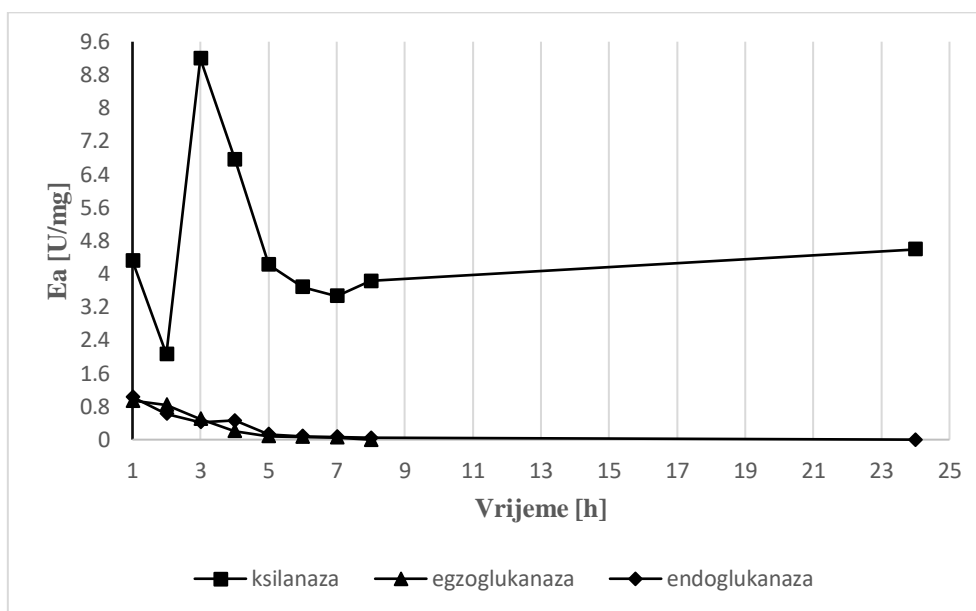
**Slika 8.** Promjena OD<sub>600</sub> [-] tijekom uzgoja *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom na fruktozi kao izvoru ugljika

Na slici 8. vidimo promjenu optičke gustoće tijekom 24 sata uzgoja mjerenu na 600 nm za kulturu i prvo razrjeđenje bakterijske biomase. Biomasa eksponencijalno raste do 5. sata uzgoja, nakon čega počinje opadati i u 8. satu uzgoja ulazi u stacionarnu fazu. Pri uzgoju u kiselim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama optička gustoća na fruktozi kao izvoru ugljika pratila je isti trend rasta, ali nije prelazila vrijednosti 0,2. U bioreaktoru primjećujemo malo veći porast biomase s vrijednostima iznad 0,3.



**Slika 9.** Promjena masene koncentracije ukupnih proteina tijekom uzgoja *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru

Slika 9. prikazuje koncentracije ukupnih proteina određene metodom po Bradfordu (poglavlje 3.2.1.). Koncentracija proteina tijekom uzgoja povećava se gotovo linearno do 7. sata uzgoja nakon čega počinje padati. Koncentracije ukupnih proteina rastu od skoro 0 mg/mL u prvom satu uzgoja do maksimalnih 3,2 mg/mL u 7. satu uzgoja, pad se odvija polagano i nakon 24 sata uzgoja koncentracija proteina iznosi 2,3 mg/mL. To upućuje na zaključak da, iako rast i razmnožavanje bakterijske biomase ulazi u stacionarnu fazu i polagano opada (Slika 8.), bakterija i dalje proizvodi proteine tj. enzime.



**Slika 10.** Promjena specifične enzimске aktivnosti [U/mg] tijekom uzgoja *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s miješalom

Slika 10. prikazuje promjenu enzimске aktivnosti [U/mg] u ovisnosti o vremenu. Ispitivana je aktivnost ksilanaza, egzoglukanaza i endoglukanaza u podlozi sa niskom pH vrijednošću i fruktozom kao izvorom ugljika. DNSA metodom su mjerene količine oslobođenih šećera, u ovom slučaju glukoze i ksiloze i prevedene u enzimsku aktivnost (poglavlje 3.2.2). Za razliku od uzgoja u Erlenmeyer tikvicama u bioreaktoru s podlogom koja je sadržavala fruktozu ne vidimo značajan rast enzimске aktivnosti za glukanaze. Enzimska aktivnost ksilanaza ima značajan rast do 3. sata uzgoja, nakon čega pada do 9. sata uzgoja. Od 9. do 24. sata uzgoja ulazi uglavnom se enzimska aktivnost ustalila u rangu od 4 do 4,8 U/mg. Za glukanaze aktivnost pada od 1. sata uzgoja i vrijednosti 0,8 U/mg do vrijednosti manjih od 0,1 U/mg. Iako je rast bakterijske biomase bolji i koncentracije proteina više kod uzgoja u bioreaktoru, uzgoj u tikvicama pokazao je bolje rezultate enzimске aktivnosti. Istraživanje (Gastelum-Arellanez, Paredes-López i Olalde, 2014.) referirano u ranijim poglavljima pokazuje odstupanja soja *P. polymyxa* BEb-40 od drugih srodnih celulotičkih bakterija. Na primjer, tri endoglukanaze koje proizvodi *Paenibacillus campinasensis* BL11 pokazale su maksimalnu aktivnost pri pH 7,5 i 37 °C, a rekombinantni enzim od 35 kDa iz istog soja pri pH 7,0 i 60 °C (Ko i ostali 2007). Drugi slučajevi su pročišćena endoglukanaza od 148 kDa koju luči *Paenibacillus sp.* B39 i od 58,6 kDa dobivena iz *Paenibacillus barcinocensis*, koje imaju optimalne uvjete pri pH 6,5/60 °C, odnosno pH 6,0/65 °C (Asha i ostali 2012). Rekombinantna endoglukanaza Endo5A iz *Paenibacillus sp.* MTCC 5639 i enzim Cel5A iz *Paenibacillus xylanilyticus* imaju optimalnu



hidrolizu pri pH 7,0/50 °C i pH 6,0/40 °C (Andlar i ostali 2018). Rezultati dobiveni u ovom radu su također mješoviti, uzgojem u tikvicama dobili smo veće enzimске aktivnosti pri nižim pH vrijednostima i slabiji rast bakterijske biomase, a povećanjem mjerila na bioreaktor ti rezultati nisu reflektirani. Potrebno je provesti daljnju optimizaciju procesa u bioreaktoru tj. prilagoditi uvijete uzgoja radi postizanja boljih rezultata. U bioreaktoru s miješalom, za razliku od tikvica, bolja je aeracija i otapa se veća količina kisika što pogoduje proizvodnji proteolitičkih enzima. Tu činjenicu potkrepljuju rezultati na slikama 9. i 10., gdje se može vidjeti da ukupna količina proteina raste, proizvodnja ksilanaza je slaba, a egzo- i endoglukanaza gotovo nikakva.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja provedenog u ovom radu može se zaključiti:

1. Uzgojem bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u podlogama s različitim izvorima ugljika u kiselim i lužnatim podlogama utvrđeno je da pri pH vrijednosti 6,79 bakterijska biomasa pokazuje rast na svim podlogama osim mikrokristalne celuloze, pri čemu je najbolji rezultat postignut je u lužnatoj podlozi koja je sadržavala 1% celobioze ili fruktoze kao izvor ugljika.
2. Analizom proizvodnje lignocelulotičkih enzima u kiselim i lužnatim podlogama dolazimo do zaključka da je najbolja proizvodnja kiseloj podlozi sa celobiozom i fruktozom kao izvorom ugljika sa maksimalnim specifičnim enzimskim aktivnostima ksilanaza od 0,7 U/mg. Egzoglukanaze na fruktozi dosežu vrijednost od 1,8 U/mg, a na celobiozi 0,9 U/mg. Maksimalne aktivnosti endoglukanaza su 1,5 U/mg na fruktozi i 0,95 na celobiozi.
3. Uzgoj u bioreaktoru proveden je na fruktozi kao izvoru ugljika pri pH podloge od 4,23. U usporedbi sa uzgojima u tikvici, u većem mjerilu postignuti su nešto lošiji rezultati enzimске aktivnosti što dovodi do zaključka da je proces potrebno dodatno optimirati.
4. Bakterija *Penibacillus polymyxa* DSM 742 proizvodi lignocelulolitičke enzime, ali njihova aktivnost ovisi o uvjetima uzgoja (pH vrijednost, temperatura, aeracija) i supstratu koji se koristi kao izvor ugljika.

## 6. POPIS LITERATURE

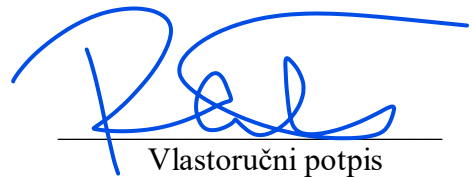
- Aftab, Nauman, Irfana Iqbal, Fatima Riaz, Ahmet Karadag, i Meisam Tabatabaei (2019) Different Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Use in Biofuel Production. IntechOpen, <https://doi.org/10.5772/intechopen.84995>.
- Amin, Farrukh Raza, Habiba Khalid, Han Zhang, Sajid u Rahman, Ruihong Zhang, Guangqing Liu, i Chang Chen (2017) Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* **72**, <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>.
- Andlar, Martina, Tonči Rezić, Nenad Marđetko, Daniel Kracher, Roland Ludwig, i Božidar Šantek (2018) „Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation“. *Engineering in Life Sciences* **18** (11), 768–78. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>.
- Asha, Balachandrababu Malini, Masilamani Revathi, Amit Yadav, i Natarajan Sakthivel (2012) Purification and Characterization of a Thermophilic Cellulase from a Novel Cellulolytic Strain, *Paenibacillus Barcinonensis* **22** (11), 1501–9. <https://doi.org/10.4014/jmb.1202.02013>.
- Baruah, Julie, Bikash Kar Nath, Ritika Sharma, Sachin Kumar, Ramesh Chandra Deka, Deben Chandra Baruah, i Eeshan Kalita (2018) Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Frontiers in Energy Research* **6**. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2018.00141>.
- Bradford, Marion M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1), 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Gastelum-Arellanez, Argel, Octavio Paredes-López, i Víctor Olalde-Portugal (2014) Extracellular Endoglucanase Activity from *Paenibacillus Polymyxa* BEb-40: Production, Optimization and Enzymatic Characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30** (11), 2953–65. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1723-z>.
- Georgiadou, Daphne N., Pavlos Avramidis, Efstathia Ioannou, i Dimitris G. Hatzinikolaou (2021) Microbial bioprospecting for lignocellulose degradation at a unique Greek environment. *Heliyon* **7** (6), e07122. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07122>.
- Grady, Elliot Nicholas, Jacqueline MacDonald, Linda Liu, Alex Richman, i Ze-Chun Yuan (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories* **15** (1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>.
- Hakizimana, Olivier, Emmanuel Matabaro, i Byong H. Lee (2020) The Current Strategies and Parameters for the Enhanced Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)* **25**, e00397. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00397>.
- Isikgor, Furkan H., i Remzi Becer (2015) Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for the Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polymer Chemistry* **6** (25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>.
- Jeong, Haeyoung, Soo-Keun Choi, Choong-Min Ryu, i Seung-Hwan Park (2019) Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Frontiers in Microbiology* **10**. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00467>.
- Jørgensen, Henning, Jan Kristensen, i Claus Felby (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefining* **1**, 119–34. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>.
- Ko, Chun-Han, Wen-Luen Chen, Chung-Hong Tsai, Wann-Neng Jane, Chia-Chen Liu, i Jenn Tu (2007) *Paenibacillus campinasensis* BL11: A wood material-utilizing bacterial strain

- isolated from black liquor. *Bioresource Technology* **98** (14), 2727–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.034>.
- Kucharska, Karolina, Piotr Rybarczyk, Iwona Hołowacz, Rafał Łukajtis, Marta Glinka, i Marian Kamiński (2018) Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules* **23** (11), 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>.
- Kumar, Parveen, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, i Pieter Stroeve (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48** (8), 3713–29. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>.
- Kumla, Jaturong, Nakin Suwannarach, Kanaporn Sujarit, Watsana Penkhrue, Pattana Kakumyan, Kritsana Jatuwong, Santhiti Vadthanarat, i Saisamorn Lumyong (2020) Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. *Molecules* **25** (12), 2811. <https://doi.org/10.3390/molecules25122811>.
- Lal, Sadhana, i Silvia Tabacchioni (2009) Ecology and Biotechnological Potential of *Paenibacillus Polymyxa*: A Minireview. *Indian Journal of Microbiology* **49** (1), 2–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>.
- Langendries, Sarah, i Sofie Goormachtig (2021) *Paenibacillus Polymyxa*, a Jack of All Trades. *Environmental Microbiology* **23** (10), 5659–69. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15450>.
- Li, Yangyang, Weiyang Song, Xuyue Han, Yachan Wang, Shengqi Rao, Quan Zhang, Jingwen Zhou, Jianghua Li, Song Liu, i Guocheng Du (2022) Recent progress in key lignocellulosic enzymes: Enzyme discovery, molecular modifications, production, and enzymatic biomass saccharification. *Bioresource Technology* **363**, 127986. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127986>.
- Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **31** (3), 426–28. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Pandey, Abhay K., Martin J. Barbetti, i Jay Ram Lamichhane (2023) *Paenibacillus polymyxa*. *Trends in Microbiology* **31** (6), 657–59. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.11.010>.
- Patowary, Rupshikha, i Hemen Deka (2020) Poglavlje 17 - *Paenibacillus*, *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, uredio N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, i A. Sankaranarayanan, 339–61. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00017-4>.
- Pérez, Juana, José Muñoz-Dorado, Teresa de la Rubia, i J. Martínez (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **5**, 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>.
- Raza, W., W. Yang, i Q-R. Shen (2008) *Paenibacillus Polymyxa*: Antibiotics, Hydrolytic Enzymes and Hazard Assessment. *Journal of Plant Pathology* **90** (3): 419–30.
- Saritha, M., Anju Arora, i Lata (2012) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian Journal of Microbiology* **52** (2), 122–30. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0199-x>.
- Sharma, Hem Kanta, Chunbao Xu, i Wensheng Qin (2019) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization* **10**. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>.
- Sindhu, Raveendran, Parameswaran Binod, i Ashok Pandey (2016) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass – An Overview. *Bioresource Technology* **199**, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>.

- Singhvi, Mamata, Smita Zinjarde, i Beom-Soo Kim (2022) Sustainable Strategies for the Conversion of Lignocellulosic Materials into Biohydrogen: Challenges and Solutions toward Carbon Neutrality. *Energies* **15** (23): 8987. <https://doi.org/10.3390/en15238987>.
- Smith, Micholas Dean (2019) An Abbreviated Historical and Structural Introduction to Lignocellulose. *American Chemical Society* **1338**, 1–15. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1338.ch001>.
- Taherzadeh, Mohammad J., i Keikhosro Karimi (2008) Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **9** (9), 1621–51. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>.
- Walia, Abhishek, Preeti Mehta, Anjali Chauhan, i C. K. Shirkot (2013) Production of Alkalophilic Xylanases by *Paenibacillus Polymyxa* CKWX1 Isolated from Decomposing Wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* **83** (2), 215–23. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0122-1>.
- Wu, Zengyou, Kun Peng, Yin Zhang, Mei Wang, Cheng Yong, i sur. (2022) Lignocellulose Dissociation with Biological Pretreatment towards the Biochemical Platform: A Review. *Materials Today Bio* **16**, 100445. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100445>.
- Zeng, Guoming, Sijie He, Yan Li, Da Sun, Haonan Li, i sur. (2021) Pretreatment technology of lignocellulose. *E3S Web of Conferences* **271**, 04010. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127104010>.

## Izjava o izvornosti

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



Vlastoručni potpis