

Proizvodnja 2,3-butandiola u bioreaktoru s čvrstim slojem

Cesar, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:951437>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2023.

Petra Cesar

**PROIZVODNJA
2,3-BUTANDIOLA U
BIOREAKTORU S ČVRSTIM
SLOJEM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mladena Pavlečića.

ZAHVALA

Veliko hvala svim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva, doc. dr. sc. Mariu Novaku, doc. dr. sc. Nenadu Marđetku, doc. dr. sc. Antoniji Trontel i dr. sc. Blanki Didak Ljubas na susretljivosti, savjetima i pruženoj pomoći tijekom izrade samog rada.

Posebno zahvaljujem i prof. dr.sc. Božidaru Šanteku na prenesenom teorijskom i praktičnom znanju, brojnim prijateljskim savjetima i podršci pruženoj tijekom cijelog diplomskog studija.

Veliko hvala i mojim roditeljima koji su uvijek bili moja podrška.

Ne mogu a da ne spomenem brojne prijatelje i kolege koji su mi studentski, a posebice domski život učinili ispunjenim. Hvala im na ogromnoj podršci, strpljivosti i razumijevanju pruženoj tijekom cijelog studiranja, a posebice u teškim trenucima. Kada bih krenula nabrajati pojedinačno, ova stranica mi ne bi bila dovoljna, ali znam da će se svi oni pronaći u ovoj iskrenoj zahvali.

Na kraju, zahvaljujem Bogu na strpljivosti koju mi je dao tijekom studiranja, a posebno tijekom izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA U BIOREAKTORU S ČVRSTIM SLOJEM

Petra Cesar, univ. bacc. ing. biotechn.

0058211265

Sažetak: Povećana potražnja za 2,3-butandiolom (2,3-BTD) iziskuje nove metode proizvodnje. U ovom radu provedena je biotehnološka proizvodnja 2,3-BTD-a pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742. Uzgoj u tikvicama proveden je sa i bez dodatka dodatnog izvora dušika. Prinosi u podlozi s glukozom, s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika te u onim pripremljenim od tekućih dijelova hidrolizata konoplje, bukve i jele su redom iznosili 6,1 g/L, 5 g/L, 0,17 g/L, 0,4 g/L i 0,15 g/L, a uz dodatak dodatnog izvora dušika 6,5 g/L, 5,3 g/L, 0,17 g/L, 0,45 g/L i 0,23 g/L. Time je pokazano kako dodatak dodatnog izvora dušika pozitivno utječe na proizvodnju 2,3-BTD-a. U bioreaktoru s čvrstim slojem proveden je uzgoj pri različitim visinama sloja te su prinosi pri visini stupca čvrstog sloja od 7, 10,5 i 13 cm iznosili 0,31 g/L, 0,4 g/L i 0,7 g/L. Zaključno, povećanje visine čvrstog sloja pozitivno utječe na uspješnost bioprocasa.

Ključne riječi: 2,3-butandiol, *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, bioreaktor s čvrstim slojem, hidrolizati lignoceluloznih sirovina

Rad sadrži: 49 stranica, 13 slika, 9 tablica, 40 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. Mladen Pavlečić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Antonija Trontel (predsjednica)
2. doc. dr. sc. Mladen Pavlečić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš (članica)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenska članica)

Datum obrane: 14. ožujka 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

2,3-BUTANEDIOL PRODUCTION IN FIXED-BED BIOREACTOR

Petra Cesar, univ. bacc.ing. biotechn.

0058211265

Abstract: Increasing demand for 2,3-butanediol (2,3-BTD) requires new methods of its production. In this research cultivation of bacteria *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 was carried out. Cultivation in flasks was carried out with and without addition of extra nitrogen source. Yields in medium containing just glucose, glucose and xylose and in mediums gained from liquid hydrolyzate of industrial hemp, beech and fir were: 6.1 g/L, 5 g/L, 0.17 g/L, 0.4 g/L and 0.15 g/L, and in those consisting extra nitrogen source 6.5 g/L, 5.3 g/L, 0.17 g/L, 0.45 g/L and 0.23 g/L respectively. In conclusion, addition of extra nitrogen source has positive impact on 2,3-BTD production. Cultivations in fix-bed bioreactor were carried out at a height of solid layer 7 cm, 10.5 cm and 13 cm and therefore yield amounted 0.31 g/L, 0.4 g/L and 0.7 g/L. In conclusion, increase of height of solid layer rises efficacy of bioprocess.

Keywords: 2,3-butanediol, *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, fixed-bed bioreactor, lignocellulosic materials hydrolyzate

Thesis contains: 49 pages, 13 figures, 9 tables, 40 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Mladen Pavlečić, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Antonija, Trotel, PhD, Assistant professor (president)
2. Mladen, Pavlečić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Andreja, Leboš, Associate professor (member)
4. Blaženka, Kos, Full professor (substitute)

Thesis defended: March 14th, 2023

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. 2,3-butandiol | 3 |
| 2.2. Fizikalno-kemijske karakteristike 2,3-butandiola | 3 |
| 2.3. Primjena 2,3-butandiola | 4 |
| 2.4. Biotehnološka proizvodnja 2,3-butandiola | 6 |
| 2.5. Metabolički put sinteze 2,3-butandiola | 8 |
| 2.6. Mikroorganizmi koji se koriste u proizvodnji 2,3-BTD | 10 |
| 2.7. Bakterija <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 12 |
| 2.8. Bioaktori s čvrstim slojem | 13 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. MATERIJALI | 15 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam | 15 |
| 3.1.2. Kemikalije i sirovine | 15 |
| 3.1.3. Sastav hranjive podloge | 16 |
| 3.1.3.1. Kemijski definirane podloge | 16 |
| 3.1.3.2. Kompleksne podloge | 18 |
| 3.1.4. Oprema | 18 |
| 3.1.4.1. Visokotlačni reaktor za predobradu lignoceluloznih sirovina | 18 |
| 3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) | 19 |
| 3.1.4.3. Centrifuge | 19 |
| 3.1.4.4. UV-Vis spektrofotometar | 19 |
| 3.1.4.5. Ostala oprema | 19 |
| 3.2. METODE | 20 |
| 3.2.1. Priprema čvrste podloge za održavanje radne kulture | 20 |
| 3.2.2. Priprema inokuluma za uzgoj biomase bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 | 20 |
| 3.2.3. Priprema kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 i podloge za uzgoj inokuluma | 20 |
| 3.2.4. Priprema otopine elemenata u tragovima | 21 |
| 3.2.5. Priprema kompleksnih podloga za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 u tikvicama ²² | 21 |
| 3.2.6. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 u tikvicama na tresilici | 23 |
| 3.2.7. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na kemijski definiranoj podlozi u bioreaktoru s čvrstim nosačem | 23 |
| 3.2.8. Analitičke metode | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.8.1. | Određivanje optičke gustoće | 24 |
| 3.2.8.2. | Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti | |
| 3.2.8.3. | Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase imobilizirane u eksperimentima s bioreaktorom s čvrstim slojem | 25 |
| 3.2.9. | Proračun pokazatelja uspješnosti procesa | 25 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 27 |
| 4.1. | Rezultati preliminarnog istraživanja proizvodnje 2,3-BTD-a u tikvicama na kemijski definiranim i kompleksnim podlogama sa i bez dodatka dodatnog izvora dušika | 28 |
| 4.2. | Rezultati uzgoja bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> u bioreaktoru s čvrstim slojem pri različitim visinama sloja aktivnog ugljena | 39 |
| 5. | ZAKLJUČAK | 45 |
| 6. | LITERATURA | 46 |
| 7. | PRILOZI | 1 |

1. UVOD

Današnje potrebe za energijom i dalje se većinom zadovoljavaju korištenjem fosilnih goriva. Zabrinutost vezana uz njihovu ograničenu dostupnost postaje sve veća te se postavlja pitanje do kad će njihove rezerve potrajati. Opće je prihvaćena činjenica kako je cijena fosilnih goriva dosegla održivu visinu, ali isto tako da će ona i dalje rasti. Osim ograničene dostupnosti i cijene, velik problem predstavlja i učinak stakleničkih plinova na svjetsku klimu. Izgaranje fosilnih goriva dovodi do dramatičnog porasta stakleničkih plinova u atmosferi, posebice ugljikovog dioksida (CO₂) (Dürre, 2007). S obzirom na činjenicu da je svjetska populacija u porastu te da je potrebno izbalansirati energetske potrebe i istovremeno ublažiti negativne efekte na okoliš, počelo se razmatrati korištenje nekonvencionalnih, alternativnih goriva (Prasad i sur., 2019).

Proizvodnja biogoriva iz biomase pokazala se kao jednim od najboljih opcija budući da se gotovo sav CO₂ otpušten tijekom izgaranja goriva dobivenih iz biomase može ponovno apsorbirati u biljkama i mikroorganizmima koji se ponovo mogu koristiti za proizvodnju biogoriva (Dürre, 2007). Jedno od potencijalnih alternativnih goriva je 2,3-butandiol (2,3-BTD) koji se može koristiti za dobivanje aditiva gorivu, ili kao samo gorivo, a osim toga primjenu nalazi i u drugim granama industrije (Syu, 2001).

2,3-butandiol trenutno se najvećim dijelom proizvodi kemijskom sintezom iz naftnih derivata. Međutim, zbog kontinuiranog porasta cijene goriva, kao i zbog otprije poznatog štetnog utjecaja na okoliš ovakva proizvodnja više nije održiva. U cilju ekonomičnije i ekološki prihvatljivije proizvodnje istražuje se biotehnoška proizvodnja 2,3-BTD-a. Pritom se razmatra korištenje obnovljivih sirovina poput industrijskog i poljoprivrednog otpada (Celińska i Grajek, 2009).

U sklopu ovog diplomskog rada proveden je uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* na kemijski definiranim te na tri vrste hidrolizata lignoceluloznih sirovina. U prvom dijelu istraživanja uzgoji su provedeni na različitim podlogama u tikvicama na tresilici pri 30°C i pri brzini okretaja tresilice od 50 o/min. Pritom je ispitan bakterijski rast i proizvodnja bioprodukata u osam različitih podloga: četiri kemijski definirane i šest kompleksnih podloga. Prva kompleksna podloga sadržavala je glukozu kao jedini izvor ugljika, dok je druga sadržavala glukozu i ksilozu. Ostale dvije kemijski definirane podloge pripravljene su kao prve dvije uz dodatak kvašćevog ekstrakta. Kompleksne podloge pripravljene su od tekućeg dijela hidrolizata industrijske konoplje, bukve i jele. Za kompleksne podloge su također pripravljene paralelne podloge koje su sadržavale kvašćev ekstrakt. Eksperimenti u tikvicama provedeni su u podlogama sa i bez dodatka 4 g/L kvašćevog ekstrakta kako bi se ispitao utjecaj dodatnog izvora dušika na mikrobni

rast i proizvodnju metabolita, posebice 2,3-BTD-a. U drugom dijelu istraživanja provedeni su uzgoji na kemijski definiranoj podlozi s dodanim kvašćevim ekstraktom u bioreaktoru s čvrstim slojem. Kao čvrsti sloj korišten je aktivni ugljen te je tijekom istraživanja praćen utjecaj visine aktivnog ugljena na tijek odvijanja bioprocasa budući da je on služio kao sredstvo za imobilizaciju radne kulture.

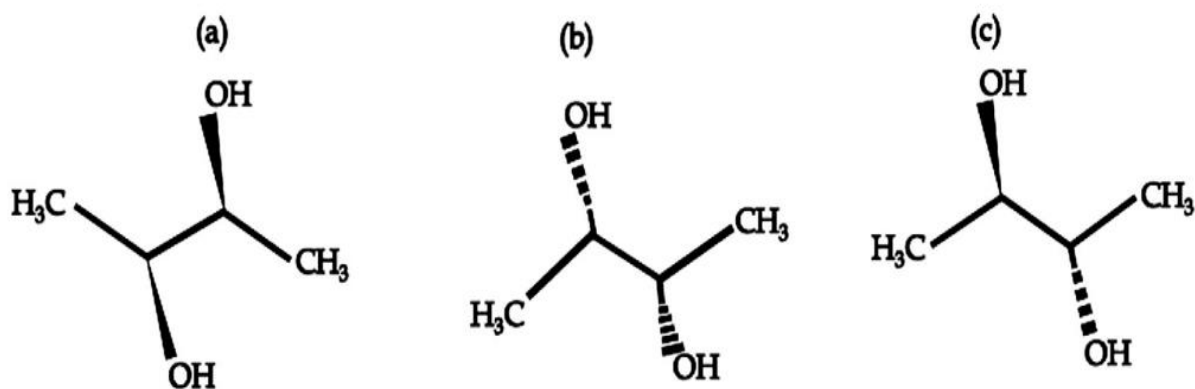
2. TEORIJSKI DIO

2.1. 2,3-butandiol

2,3-butandiol (2,3-BTD) poznat je i kao 2,3-butilen-glikol, 2,3-dihidroksibutan i dimetil-etilen glikol. To je organski spoj kemijske formule $C_4H_{10}O_2$. Pripada skupini alkohola, točnije diola zbog dviju hidroksilnih skupina vezanih na alifatski lanac (HMDB, 2022). Zbog hidroksiliranih C-2 i C-3 atoma, 2,3-BTD svrstava se u skupinu sekundarnih alkohola ili glikola (PubChem, 2022).

2.2. Fizikalno-kemijske karakteristike 2,3-butandiola

S obzirom na svoju strukturu, 2,3-BTD sadrži kiralne centre stvarajući tri stereoizomera: optički aktivne *dextro*- (L-(+)-2,3-butandiol) i *levo*- (D-(+)-2,3-butandiol) enantiomere i *meso*- formu koja je optički neaktivna (Hakizimana i sur., 2020) (slika 1).



Slika 1. Stereoizomeri 2,3-butandiola (Hakizimana i sur., 2020) (a) L-(+)-2,3-butandiol; (b) Meso-2,3-butandiol; (c) D-(+)-2,3-butandiol

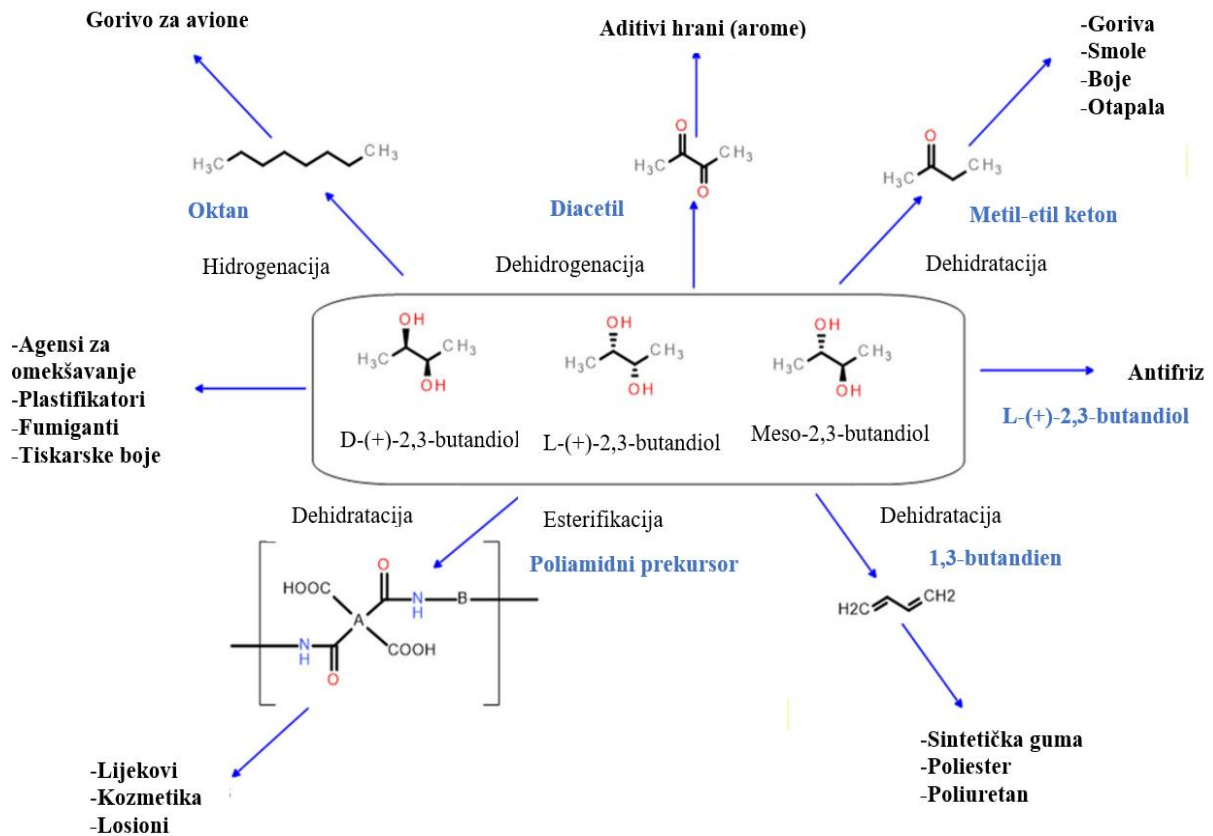
Na sobnoj temperaturi ovaj je spoj tekućina bez mirisa i boje ili u formi kristala (Syu, 2001). Topljiv je u vodi, alkoholima, niskomolekulskim ketonima i eterima, a također ga karakterizira značajna higroskopnost (HMDB, 2022). Ostala fizikalno-kemijska svojstva navedena su u tablici 1.

Tablica 1. Svojstva 2,3-butandiola (GS Caltex)

| SVOJSTVO | |
|--|--|
| Strukturna formula | $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ |
| Molekulska masa [kDa] | 90,121 |
| Točka vrelišta [°C] | 180-184 |
| Točka tališta [°C] | 18-20 |
| Točka ledišta [°C] | -60 |
| Gustoća [g/cm^3] | 0,992-1,002 |
| Viskoznost [$\text{mPa}\cdot\text{s}$] | 44-128 (na 25°C) |
| Točka zapaljenja [°C] | 85 (DIN 51758) |

2.3. Primjena 2,3-butandiola

Primjena 2,3- butandiola i njegovih derivata veoma je široka (slika 2). 2,3-BTD sastojak je parfema, fumiganata, sredstava za omekšavanje, sredstava protiv smrzavanja, plastifikatora te tiskarskih boja (Białkowska, 2016; Lal i Tabacchioni, 2009). U novije vrijeme se 2,3-BTD primjenjuje i kao ekološki prihvatljivo biljno gnojivo. Njegovim korištenjem biljke su otpornije na okolišni stres kao i na bakterijske i virusne štetnike, a osim toga 2,3-BTD djeluje i na poticanje njihovog rasta (GS Caltex).



Slika 2. Primjena 2,3-butandiola i njegovih prekursora (prema Białkowska, 2016)

2,3-BTD primjenjuje se i kao gorivo zbog svoje visoke toplinske vrijednosti. Primjerice, toplinska vrijednost 2,3-BTD-a je 27,198 J/g što je blisko drugim alternativnim gorivima kao što su etanol (26,055 J/g) i metanol (22,081 J/g) (Syu, 2010). Zbog svoje ogrjevne vrijednosti i sposobnosti povećanja oktanskog broja goriva smatra se obećavajućim tzv. drop-in gorivom, odnosno gorivom sličnih svojstava u usporedbi s konvencionalnim fosilnim gorivima (Kargbo i sur., 2021). Uz to, može se lako konvertirati do metil-etil ketona (MEK) koji je poznat kao efikasan aditiv za goriva zbog visoke topline sagorijevanja. Nakon sinteze s metil-etil-ketonom i reakcijom hidrogenacije, 2,3-BTD se može konvertirati do oktana koji se koristi za proizvodnju visokokvalitetnog goriva za avione (Białkowska, 2016).

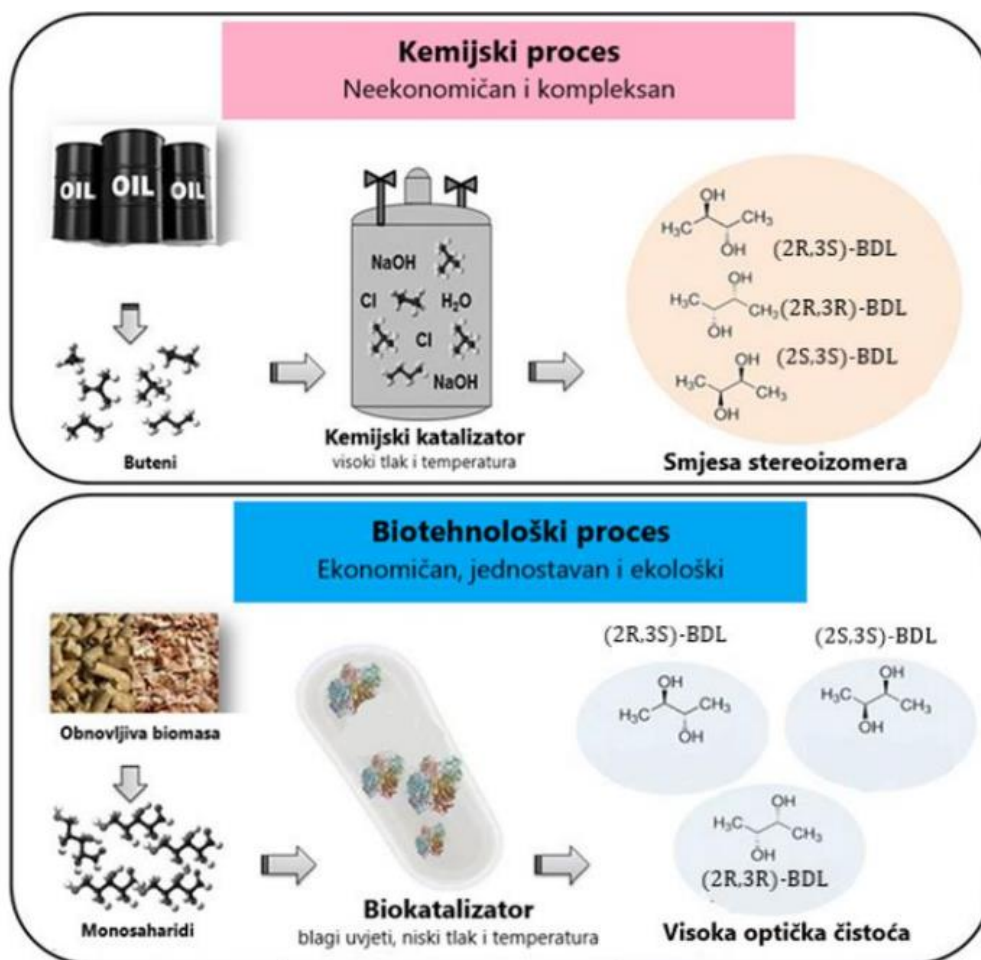
Vrlo bitan derivat 2,3-BTD-a je i 1,3-butandien od kojeg se proizvodi sintetička guma koja je za vrijeme II. svjetskog rata zbog velike potražnje dobivena i primjenom mikroorganizama. Nadalje, može se primijeniti sredstvo za aromatiziranje nakon konverzije u diacetil procesom dehidrogenacije i kao takav dodavati u prehrambene proizvode (Syu, 2010).

Trenutno se 2,3-BTD u industrijskom mjerilu uglavnom proizvodi kemijskom sintezom. Na taj se način dobiva smjesa stereoizomera pa su nakon sinteze potrebni skupi procesi izdvajanja i pročišćavanja kako bi se dobila stereospecifična forma 2,3-BTD. U zadnje su vrijeme mnoga istraživanja rasvijetlila ulogu 2,3-BTD ukazujući na različita fizikalno-kemijska svojstva i jedinstvena djelovanja pojedinog stereoizomera, posebice u visokovrijednim proizvodima farmaceutске, kozmetičke i agroindustrije (Song i sur., 2019).

Osim kemijskom sintezom, 2,3-BTD moguće je proizvesti i biotehnoškim putem korištenjem mikroorganizama što pruža jeftiniju i ekološki prihvatljiviju alternativu tradicionalnoj proizvodnji, a uz to moguće je proizvesti samo određene stereoizomere čime se izbjegavaju skupi procesi pročišćavanja (Białkowska, 2016).

2.4. Biotehnoška proizvodnja 2,3-butandiola

S obzirom na navedenu problematiku vezanu uz kemijsku sintezu 2,3-BTD sve je veći fokus na biotehnoškoj proizvodnji. Na slici 3 prikazana je razlika između konvencionalne, kemijske proizvodnje i alternativne, biotehnoške proizvodnje 2,3-BTD-a.



Slika 3. Usporedba kemijskog i biotehnoškog procesa proizvodnje 2,3-butandiola (prema Song i sur., 2019)

Biotehnoška proizvodnja 2,3-BTD postala je bolja opcija zbog mogućnosti sinteze u visokoj koncentraciji kao i zbog činjenice da visoka koncentracija ovog spoja ne djeluje toksično na sam radni mikroorganizam za razliku od npr. nekih vrsta alkohola (Ji i sur., 2011). Osim toga, u ovom tipu proizvodnje separacija 2,3-BTD-a iz prevrele podloge je mnogo jednostavnija i ekonomičnija. Razlog tome su prvenstveno niži kapitalni troškovi i niža potrošnja energije u odnosu na proizvodnju 2,3-BTD-a kemijskim putem i na proizvodnju drugih biogoriva, primjerice bioetanola i biobutanola (Mailaram i sur., 2022). Za razliku od kemijske sinteze, proizvod dobiven biotehnoškim putem je stereospecifičan pa nema potrebe za velikim brojem koraka kako bi se uklonili neželjeni stereoizomeri. Smanjenje broja koraka dovodi do manje potrošnje energije i kemikalija kao i do manje količine otpadnih produkata.

Još jedan razlog koji je bitno spomenuti jest veća katalitička sposobnost mikroorganizama pri blažim procesnim uvjetima čime se također bitno smanjuju energetske potrebe, a time i troškovi proizvodnje (Białkowska, 2016). Primjena različitih mikroorganizama omogućuje i korištenje veće sirovinske osnove u proizvodnji što uvelike utječe na troškove proizvodnje. Za razliku od prošlih desetljeća u kojima su se za sirovinu koristili škrobni i šećerni supstrati, u današnje se vrijeme pribjegava korištenju jeftinijih alternativnih sirovina, uglavnom dobivenih iz biomase. Ovi alternativni supstrati obično se dijele na lignocelulozne i nelignocelulozne. U nelignocelulozne sirovine ubrajaju se melasa i otpadci hrane dok u su lignocelulozne sirovine biljnog podrijetla (Okonkwo i sur., 2017; Ji i sur., 2011).

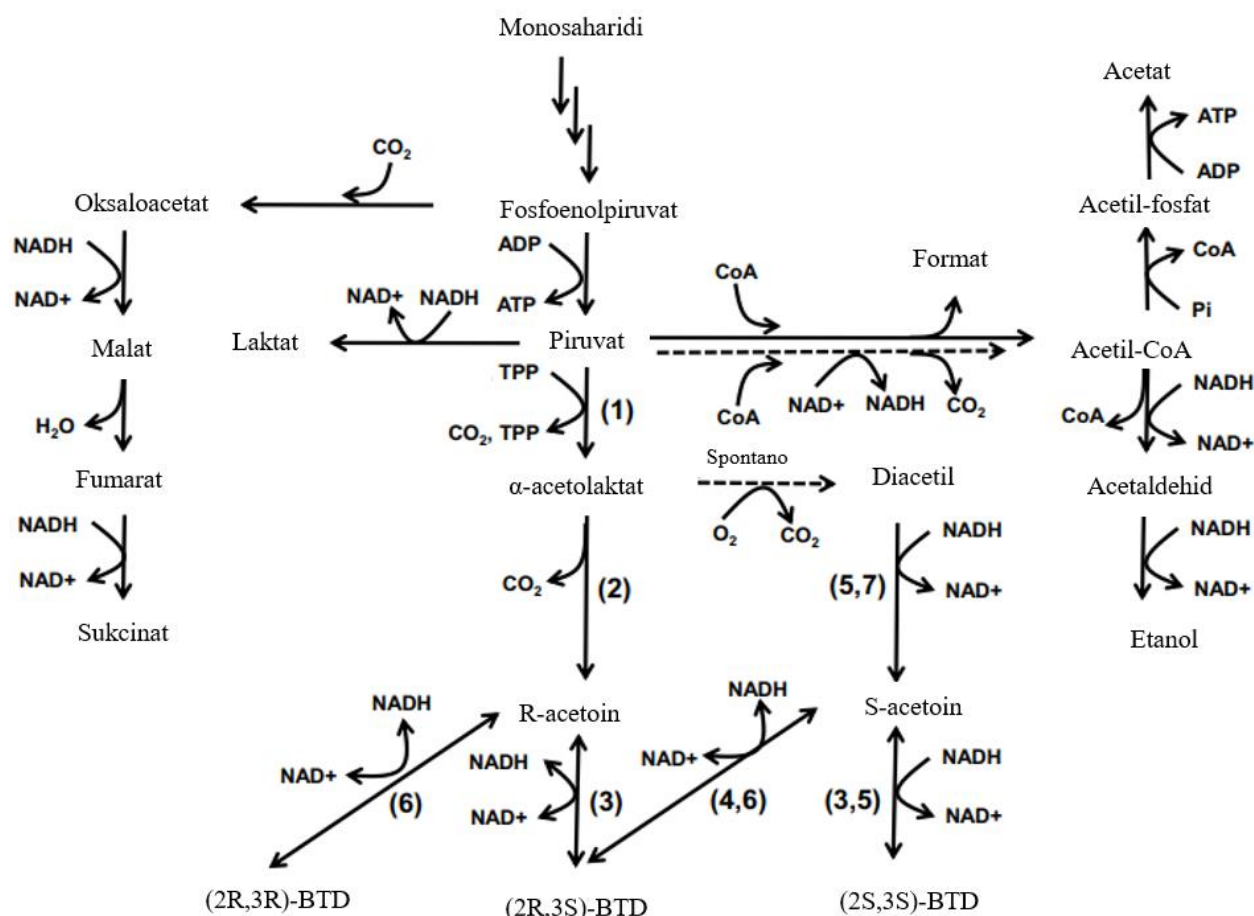
2.5. Metabolički put sinteze 2,3-butandiola

Metabolički put proizvodnje 2,3-BTD-a započinje konverzijom monosaharida do piruvata procesom glikolize pri čemu dolazi dolazi do nastajanja 2 mola NADH po 1 molu monosaharida. U anaerobnim uvjetima piruvat se dekarboksilira do α -acetolaktata u reakciji kataliziranom α -acetolaktat sintazom nakon čega slijedi još jedan korak dekarboksilacije uz pomoć enzima α -acetolaktat dekarboksilaze pri čemu nastaje R-acetoin. Opisane dvije reakcije su redoks-reakcije pri čemu se piruvat i α -acetolaktat reduciraju, a u svakom koraku se oksidira po jedan mol NADH (Białkowska, 2016; Nakashimada i sur., 1998).

Ukoliko dođe do stvaranja aerobnih uvjeta, α -acetolaktat će spontano dekarboksilirati u diacetil. Dobiveni diacetil se zatim reducira do S-acetoina butandiol dehidrogenazom ili diacetil reduktazom uz utrošak jednog mola NADH. Iz nastalih formi acetoina (R-acetoina i S-acetoina) formiraju se tri stereoisomera 2,3-BTD: (2R,3R), (2S,3S) i (2R,3S)- forme procesom oksidacije (Song i sur., 2019). Shema opisanog procesa nalazi se na slici 4.

Sumarno, iz 1 mola glukoze nastanu 2 mola piruvata iz kojih u konačnici nastaje 1 mol 2,3-BDL uz generiranje 2 mola NADH. Budući da se samo 1 mol NADH reoksidira prilikom formiranja 2,3-BTD, za oksidaciju drugog mola NADH provode se reakcije redukcije pri čemu nastaju ostali produkti kao što su etanol i laktat (Nakashimada i sur., 1998).

Istraživanja su pokazala kako različiti sojevi proizvođači 2,3-BTD-a proizvode različite stereoisomere ili smjesu stereoisomera. Svi enzimi i komponente uključene u opisani metabolički put su uglavnom sintetizirani tijekom kasne log faze i stacionarne faze pri uvjetima limitacije kisikom (Celińska i Grajek, 2009).



Slika 4. Metabolički put dobivanja 2,3-BTD (prema Song i sur., 2019)

Isprekidana crta predstavlja reakcije koje se odvijaju u anaerobnim uvjetima. Brojevi u zagradama predstavljaju ključne enzime uključene u proizvodnju 2,3, BTD. (1) , α -acetolaktat sintaza; (2) , α -acetolaktat dekarboksilaza; (3) (2R,3S)-butandiol dehidrogenaza; (4) (2R,3S)-butandiol dehidrogenaza; (5) (2R,3R)-butandiol dehidrogenaza (S-acetoin formirajuća), (6) (2R,3R)-butandiol dehidrogenaza i (7) diacetil reduktaza

Osim već prethodno opisane regulacije omjera NADH/NAD⁺, metabolički put sinteze 2,3-BTD ima i druge funkcije. Pretpostavlja se da je 2,3-BTD skladišni oblik za pohranu energije i ugljika u stanici tijekom stacionarne faze rasta mikroorganizama. Također, smatra se da je aktivacija ovog metaboličkog puta mehanizam sprječavanja intracelularnog zakiseljavanja, budući da je 2,3-BTD neutralna molekula te da je njeno formiranje inducirano sniženom pH vrijednošću unutar stanice (Song i sur., 2019). Primjerice, poznato je da je acetat induktor sva tri enzima uključena u formiranje 2,3-BTD od piruvata (Celinska i Grajek, 2009)

2.6. Mikroorganizmi koji se koriste u proizvodnji 2,3-BTD

Razni mikroorganizmi posjeduju metabolički put dobivanja 2,3-BTD (ili barem dio puta), ali najznačajniji rodovi među njima su *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Serratia*. Prinosi i efikasnost proizvodnje 2,3-BTD tijekom uzgoja pomoću ovih mikroorganizama navedeni su u tablici 2. U svrhu proizvodnje 2,3-BTD navedeni sojevi se mogu genetički modificirati, a osim ovih, homolognih domaćina, moguće su i metaboličke manipulacije u heterolognim domaćinima (Okonkwo i sur., 2017; Ji i sur., 2011).

Tablica 2. Sažeti prikaz tipa stereoizomera 2,3-BTD-a, produktivnosti i prinosa za različite mikroorganizme uz naznačen tip uzgoja i supstrat (prema Ji i sur., 2011)

| Sojevi | Tip 2,3-BTD stereoizomera | Supstrat | Tip uzgoja | Produktivnost [g/Lh] | Prinos [g/g] |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------|--------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | mezo-, L-(+)- | Glukoza | Šaržni s pritokom | 4,21 | 0,43 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | mezo-, L-(+)- | Glicerol | Šaržni s pritokom | 0,47 | 0,39 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | mezo-, L-(+)- | Jeruzalemska artičoka | Šaržni s pritokom, SSF | 1,18 | 1,81 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | mezo-, L-(+)- | Kukuruzna melasa | Šaržni s pritokom | 1,35 | 0,41 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | mezo-, L-(+)- | Hidrolizat kukuruznih oklasaka | Šaržni s pritokom | 0,59 | 0,50 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | mezo-, L-(+)- | glukoza | Šaržni s pritokom | 1,64 | 0,48 |

Tablica 2. Sažeti prikaz tipa stereoizomera 2,3-BTD-a, produktivnosti i prinosa za različite mikroorganizme uz naznačen tip uzgoja i supstrat (*prema Ji i sur., 2011*)-*nastavak*

| Sojevi | Tip 2,3-BTD stereoizomera | Supstrat | Tip uzgoja | Produktivnost [g/Lh] | Prinos [g/g] |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|--------------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | mezo-, L-(+)- | Melasa | Reciklacija stanica | 2,40 | 0,42 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | mezo-, L-(+)- | Glukoza | Šaržni | 1,74 | 0,49 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | mezo-, L-(+)- | Glukoza | Šaržni s pritokom | 5,40 | 0,49 |
| <i>Serratia marcescens</i> | mezo- | Saharoza | Šaržni s pritokom | 2,67 | 0,41 |
| <i>Serratia marcescens</i> | mezo- | Saharoza | Šaržni s pritokom | 3,49 | 0,47 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | D-(-)- | Stabljka jeruzalemske artičoke | Šaržni | 0,88 | 0,50 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | D-(-)-, mezo- | Glukoza | Šaržni | 0,33 | 0,38 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | D-(-)-, mezo- | Glukoza | U tikvici bez miješanja | 0,47 | 0,12 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | D-(-)-, mezo- | Glukoza | Šaržni | - | 0,33 |

Pri odabiru mikroorganizma producenta 2,3-BTD za industrijsku proizvodnju potrebno je obratiti pozornost na faktore kao što su sigurnost procesa, čistoća dobivenog izomera, troškovi sirovina i procesa izolacije i pročišćavanja proizvoda (downstream procesa) (Tinôco i sur., 2020). Uzevši prethodno navedene kriterije u obzir, vrste rodova *Klebsiella* te *Paenibacillus polymyxa* imaju najveći potencijal za proizvodnju 2,3-BTD u velikom mjerilu.

Prednost bakterija iz roda *Klebsiella*, točnije vrsta *Klebsiella oxytoca* i *Klebsiella pneumoniae*, očituje se u njihovoj širokoj rasprostranjenosti, sposobnosti metaboliziranja različitih izvora ugljika uključujući glukoza, manozu, galaktozu, ksilozu, arabinozu, celobiozu, laktozu, toleriranju širokog raspona pH vrijednosti podloge, koncentracije kisika i temperature (Biebl i

sur., 1998). Uglavnom proizvode meso- i -L-(+)- oblik 2,3-BTD-a pri čemu je fermentacija potpuna, uz manji udio nusprodukata u odnosu na ostale rodove bakterija (Ma i sur., 2009). Glavnu prepreku u njihovoj širokoj industrijskoj primjeni predstavlja njihova patogenost (Jeong i sur., 2019; Song i sur., 2019; Celinska i Grajek, 2009).

S druge strane, *P. polymyxa* je bakterija koja ima GRAS (Generally Regarded as Safe) status te ima sposobnost proizvodnje čistog optički aktivnog (R,R)-2,3-BD (D(-)- izomera. Iz ovih razloga *P. polymyxa* ima velik potencijal za industrijsku proizvodnju 2,3-BTD (Celinska i Grajek, 2009; Nakashimada i sur., 1998). U ovom će se radu obratiti pozornost upravo na ovu bakteriju, njene karakteristike i sposobnost proizvodnje 2,3-BTD.

2.7. Bakterija *Paenibacillus polymyxa*

Paenibacillus polymyxa (prema bivšoj taksonomiji *Bacillus polymyxa*) je gram-pozitivna, štapićasta, sporogena, neutrofilna i fakultativno anaerobna bakterija. Izolirana je iz brojnih staništa kao što su zemlja, rizosfera, biljno tkivo, fermentirana hrana i morski sedimenti (Langendries i Goormachtig, 2021).

Većinom se bakterije ove vrste nalaze u tlu, često u zajednici s biljnim korjenjem pri čemu promoviraju biljni rast pa se stoga primjenjuju u agrikulturni. Promocija rasta biljaka očituje se kroz ispuštanje fitohormona i indol-3-pirolin-5-pirolone kiseline koji prevode fosforne spojeve u one dostupne biljci, pentiladenina i drugih citokina koji potiču pupanje i listanje biljke, njenu germinaciju i reproduktivni razvoj te kroz olakšavanje fiksacije dušika. Osim toga, djeluju i na otpornost biljke prema patogenima inducirajući biljnu rezistenciju izlučujući biocidne spojeve (Jeong i sur., 2019; Grady i sur., 2016).

Neki od sekundarnih metabolita bakterije *P. polymyxa* su i antimikrobni spojevi-antibiotici i lantibiotici (antimikrobni agens koji služi za bioprezerviranje hrane) koje ova bakterija izlučuje kako bi zaštitila sebe ili organizam s kojim je u simbiozi. Do sad su otkriveni polimiksin E1 i paenibacilin koji zbog svojeg antibiotskog i lantibiotskog djelovanja pokazuju velik potencijal za primjenu u medicini i prehrambenoj industriji (Lal i Tabacchioni, 2009). Polimiksin E1 poznat je po antimikrobnim svojstvima prema gram-negativnim bakterijama. Paenibacilin pokazuje antimikrobnu aktivnost prema širokom spektru patogenih bakterija i prema onima koje uzrokuju kvarenje hrane uključujući *Bacillus* spp., *Clostridium sporogenes*, *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria* spp., *Pediococcus*

cerevisiae, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*. Osim djelovanja na širok spektar bakterija, paenibacilin pokazuje zadovoljavajuća fizikalno-kemijska svojstva (dobra topljivost u vodi, toplinska rezistencija i pH stabilnost u rangu od 2 do 9) koja omogućuju lakše rukovanje (He i sur., 2007).

Osim prethodno navedenih, razni sojevi *P. polymyxa* mogu proizvoditi i enzime poput β -1,3-glukanaza, celulaza, hitinaza, proteaza i ksilanaza, a poznato je i da sintetiziraju egzopolisaharide. Ovi spojevi pronašli su primjenu u prehrambenoj industriji, obradi otpada, kemijskim sintezama i formulaciji detergenata (Lal i Tabacchioni, 2009; Budi i sur., 2000).

2.8. Bioreaktori s čvrstim slojem

Bioreaktori s čvrstim slojem konstruirani su kao reakcijske posude punjene s nekim tipom nasutog materijala koji služi kao nosač. Pri izboru nosača potrebno je obratiti pozornost na specifičnu površinu, poroznost, hrapavost površine, veličinu pora i orijentaciju čestica nosača budući da oni utječu na katalitičku aktivnost, prijenos mase i prijenos topline, a u konačnici na pokazatelje uspješnosti bioprocasa (Afandizadeh i sur., 2001).

U biotehnološkoj proizvodnji ovakvi sustavi najčešće se koriste za mikrobne konverzije ili proizvodnju specifičnog proizvoda pomoću imobiliziranih stanica ili enzima. Pri postupku imobilizacije stanica važnu ulogu ima sposobnost mikrobne populacije da se adsorbira na površinu i stvori biofilm. Za izradu nosača najčešće se koriste jeftini i lako dostupni materijali kao što su pijesak, ilovača, staklo, kvarc i razni plastični materijali. Imobilizacija mikrobnih stanica na nosač provodi se propuštanjem medija koji sadrži željenu mikrobnu kulturu kroz ulazni tok do zasićenja nosača pri čemu je potrebno posebno obratiti pozornost na protoke kroz takve sustave kako ne bi došlo do ispiranja biomase. Imobilizirane stanice tvore biofilm i kao takve provode svoje metaboličke aktivnosti koristeći nutrijente iz hranjive podloge koja cirkulira kroz sustav. Unatoč primjeni manjih protoka dio stanica ipak završi u hranjivoj podlozi zbog ispiranja. Bitno je naglasiti i da hranjivi medij mora prolaziti kroz nosač na način da ne uzrokuje njegovo čepljenje (Singh i Prerna, 2009).

Do sad su ovakvi sustavi uspješno primijenjeni u različitim istraživanjima. Primjerice, bakterija *P. polymyxa* imobilizirana je na staklenu vunu s ciljem adsorpcije nikla i bakra iz onečišćene vode (Colak i sur., 2013). U tom istraživanju primijećeno je kako *P. polymyxa* veže metale za

peptidoglikan u svojoj staničnoj stijenci i to čak 111,52 mg/g bakra i 105 mg/g nikla pri njihovim početnim koncentracijama od 200 mg/L.

Druga vrsta istraživanja koju su proveli Modak i sur. (1999) pokazala je da se bakterijska biomasa uz pomoć egzopolisaharida uspjela vezati na rudu boksita te iz nje koristiti kalcij. Razni proizvodi metabolizma uključujući mravlju, octenu, mliječnu i sukcinatnu kiselinu, etanol, 2,3-butandiol i acetoin potaknuli su otapanje kalcija s površine stanice i njeno prevođenje u tekuću fazu. Na taj je način smanjen sadržaj kalcija s 2,8 % na 0,5 % u 88 sati uzgoja u koloni duljine 1,2 metra i promjera 48 mm u kaskadno vođenom procesu.

Nadalje, *P. polymyxa* adsorbirana na ugljen korištena je u svrhu uklanjanja sumpora i pepela uz zadovoljavajuću efikasnost od 60 %. Koncentracija sumpora smanjena je s 6,65 % na 2,6 %, a pepela s 3,3 % na 1,1 %. Pritom je pokazano kako bakterijska adsorpcija nije provedena djelovanjem elektrostatskih sila već fizikalnih koje ovise o silama između bakterije i površine vezanja (Abdel-Khalek i El-Midany, 2013).

U ovom je radu kao adsorbens korišten aktivni ugljen zbog svoje povećane površine i poroznosti u odnosu na konvencionalni ugljen. Aktivni ugljen pronašao je svoju primjenu u industriji u procesima uklanjanja, izdvajanja i modificiranja raznih komponenti iz tekućih i plinovitih faza (Heidarinejad i sur., 2020). U nekim istraživanjima koristio se za uklanjanje organskih nečistoća (trikloretilen, benzen toluen, ksilen) i teških metala iz otpadnih voda kućanstva ili industrije (Anjum i sur., 2019). Do sada nije zabilježeno niti jedno istraživanje gdje je za proizvodnju 2,3-BTD-a korišten reaktor s čvrstim slojem.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Za provedbu eksperimenata korišten je soj bakterije *Paenibacillus polymyxa* oznake DSM 742 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva. Radna kultura *Paenibacillus polymyxa* je do tad čuvana u odgovarajućoj čvrstoj podlozi u Petrijevoj zdjelici na 4°C.

3.1.2. Kemikalije i sirovine

Kemikalije korištene za provedbu eksperimentalnog dijela nabrojene su u tablici 3.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

| Kemikalija | Stupanj čistoće | Proizvođač |
|-----------------------------|------------------------|---------------------------|
| Agar | tehnički | Biolife, Italija |
| Amonijev acetat | ≥ 98% | Merck KgaA, Njemačka |
| Amonijev sulfat | ≥ 98% | Honeywell, SAD |
| Bakrov sulfat pentahidrat | 99 % | Honeywell, SAD |
| Borna kiselina | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Cinkov klorid | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Cinkov sulfat heptahidrat | 99 % | Merck KgaA, Njemačka |
| Etanol | 96 % | GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska |
| Glukoza | ≥ 99 % | Sigma-Aldrich, SAD |
| Kalijev dihidrogenfosfat | ≥ 99 % | Kemika, Hrvatska |
| Kalijev hidrogenfosfat | ≥ 98 % | Kemika, Hrvatska |
| Kobaltov klorid heksahidrat | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Ksiloz | > 98 % | Sigma-Aldrich, SAD |

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija-*nastavak*

| Kemikalija | Stupanj čistoće | Proizvođač |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Kvašćev ekstrakt | za upotrebu u biotehnologiji | Liofilchem, Italija |
| Magnezijev sulfat heptahidrat | > 99 % | LACH NER d.o.o., Češka |
| Manganov klorid dihidrat | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Mesni ekstrakt | za upotrebu u biotehnologiji | Liofilchem, Italija |
| Natrijev hidroksid | > 99 % | Merck KgaA, Njemačka |
| Natrijev molibdat dihidrat | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Natrijev tartarat dihidrat | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Octena kiselina | > 99,5 % | Avantor, SAD |
| Pepton | za upotrebu u biotehnologiji | Fischer Scientific, UK |
| Sumporna kiselina | 96 % | Merck KgaA, Njemačka |
| Željezov sulfat heptahidrat | p.a. | Kemika, Hrvatska |

3.1.3. Sastav hranjive podloge

3.1.3.1. *Kemijski definirane podloge*

Tijekom ovog istraživanja korištene su kemijski definirane podloge za održavanje radne kulture, pripremu inokuluma i uzgoje koji su provedeni u tikvicama i bioreктору s čvrstim slojem.

Sastav čvrste podloge za održavanje radne kulture prikazan je u tablici 4.

Sastav podloge za pripremu inokuluma prikazan je u tablici 5. Kao jedini izvor ugljika ova podloga je sadržavala 15 g/L glukoze.

Podloge korištene u preliminarnom istraživanju razlikovale su se prema izvoru ugljika (jedan izvor ili dva) te sadržaju dodatnog izvora dušika kako bi se ispitao utjecaj vrste supstrata i

kvašćevog ekstrakta na rast bakterijske biomase i proizvodnju metabolita. Tako su se u preliminarnom istraživanju koristile podloge u kojoj je jedini izvor ugljika bila glukoza, a u drugoj glukoza i ksiloza. Nadalje, za ispitivanje utjecaja dodatnog izvora dušika (kvašćev ekstrakt) pripremljene su i podloge kao što je navedeno prethodno, ali sa i bez dodatka kvašćevog ekstrakta. U konačnici su pripremljene četiri tikvice. Prve dvije podloge su sadržavale 15 g/L glukoze te je jedna od njih sadržavala 4 g/L kvašćevog ekstrakta, a druga nije. Također, pripremljene su i dvije podloge koje su sadržavale dva izvora ugljika: 7,5 g/L glukoze i 7,5 g/L ksiloze kod kojih je isto tako u jednu od njih dodano 4 g/L kvašćevog ekstrakta, a u drugoj nije. Sve navedene podloge sadržavale su istu količinu elemenata u tragovima koji su dodani u obliku otopine čiji je sastav prikazan u tablici 6.

Tablica 4. Kemijski sastav čvrste, kemijski definirane hranjive podloge za održavanje radne kulture *Paenibacillus polymyxa* DSM 742.

| Kemikalija | Masena koncentracija γ [g/L] |
|----------------|--------------------------------------|
| Glukoza | 1 |
| Pepton | 5 |
| Mesni ekstrakt | 3 |
| Agar | 15 |

Tablica 5. Kemijski sastav tekuće hranjive podloge i faktori rasta za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742.

| Kemikalija | Masena koncentracija γ [g/L] | |
|-------------------------------|--------------------------------------|-----|
| Glukoza | 15 | 7,5 |
| Ksiloza | 0 | 7,5 |
| Kvašćev ekstrakt | 4,0 | |
| Pepton | 5,0 | |
| Magnezijev sulfat heptahidrat | 0,2 | |
| Kalijev dihidrogenfosfat | 3,5 | |
| Kalijev hidrogenfosfat | 2,5 | |
| Amonijev acetat | 5,0 | |
| Amonijev sulfat | 4,0 | |

Tablica 6. Kemijski sastav otopine elemenata u tragovima za pripremu tekuće, kemijski definirane podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

| Tvar | ν [g/L] |
|-----------------------------|-------------|
| 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 |
| kalijev natrijev tartarat | 2,100 |

3.1.3.2. *Kompleksne podloge*

Osim kemijski definiranih, za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 korištene su i tri kompleksne podloge: hidrolizati industrijske konoplje, bukve i jele. Hidrolizati bukve i jele dobiveni su gotovi, dok je hidrolizat konoplje pripremljen dodatno za izvođenje ovog rada. Sva tri hidrolizata pripremljena su kiselinom predobradom pojedine lignocelulozne sirovine u visokotlačnom reaktoru nakon čega su profiltrirani i neutralizirani. Na kraju pripreme je dodana otopina elemenata u tragovima sastava iz tablice 6.

3.1.4. Oprema

3.1.4.1. *Visokotlačni reaktor za predobradu lignoceluloznih sirovina*

Za predobradu lignoceluloznih sirovina razrijeđenom sumpornom kiselinom korišten je visokotlačni reaktor tvrtke „Marus-ATM” (Zagreb, Hrvatska) ukupnog volumena 20 L.

3.1.4.2. *Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)*

Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, analizirani su tekući uzorci dobiveni tijekom eksperimentanog rada. Pritom je korišten UPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD. Uređaj se sastoji od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler), 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.

3.1.4.3. *Centrifuge*

Uređaj za centrifugiranje korišten je za pripremu uzoraka za kromatografsku analizu (UPLC). Za te potrebe korištena je centrifuga „CF-10“ (Witeg, Njemačka)

3.1.4.4. *UV-Vis spektrofotometar*

Za provođenje spektrofotometrijskih analiza korišten je Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS“ (Agilent Technologies, SAD). Ovim uređajem moguće je primijeniti valne duljine između 190 i 900 nm na uzorke kako bi se iz dobivene apsorbancije mogla izračunati koncentracija pojedinog spoja. U ovom istraživanju spektrofotometar je korišten za određivanje apsorbancija hranjivih podloga kao indirektnog pokazatelja rasta stanica bakterija, na valnoj duljini od 600 nm.

3.1.4.5. *Ostala oprema*

Analitička vaga Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA (Japan) korištena je za odvage kemikalija te za određivanje suhe tvari biomase, dok je za potrebe vaganja sirovina korištena tehnička vaga Tehnica ET-1211 (Tehnica Železniki, Slovenija). Za pohranu uzoraka korišten je zamrzivač tvrtke Gorenje (Hrvatska). Uzgoj u tikvicama proveden je na tresilici RM 71 (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka). Vrtložna miješalica korištena je za homogenizaciju uzoraka prije analize.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema čvrste podloge za održavanje radne kulture

Podloga za uzgoj čvrste kulture pripravljena je na način da je u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL otopljeno 0,2 g glukoze, 1 g peptona, 0,6 g mesnog ekstrakta i 3 g agara (tablica 4) u maloj količini demineralizirane vode na magnetskoj miješalici. Potom je dodan ostatak demineralizirane vode tako da je konačni volumen iznosio 200 mL. Tikvica s podlogom je začepljena vatenim čepom te sterilizirana u autoklavu na 20 min pri 121 °C. Nakon sterilizacije podloga je izlivena u Petrijeve zdjelice i ohlađena.

3.2.2. Priprema inokuluma za uzgoj biomase bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Inokulum je pripremljen na način da je dio prethodno porasle kulture s čvrste podloge u Petrijevoj zdjelici prenešen pomoću eze u epruvetu s 10 mL sterilne vode. Stanice su resuspendirane te je sadržaj epruvete prebačen u tikvicu od 100 mL koja je sadržavala 20 mL podloge pripravljene na način opisan u poglavlju 3.2.3.. Tikvica je termostetirana preko noći bez miješanja na temperaturi od 30 °C. Drugi dan je 10 mL iz te tikvice prebačeno u drugu Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL koja je sadržavala 100 mL sterilne podloge istog sastava. Tikvica je ostavljena preko noći u istim uvjetima kao i manja, prethodna tikvica. Nakon 24 sata sadržaj veće tikvice korišten je za inokulaciju podloga za preliminarni dio istraživanja.

3.2.3. Priprema kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 i podloge za uzgoj inokuluma

Za preliminarno istraživanje u tikvicama ukupno su pripravljene četiri tikvice različitog sastava čije su koncentracije prikazane u tablici 5. Prve dvije podloge pripravljene su na način da se u dvije Erlenmeyerove tikvice od 500 mL zasebno u maloj količini demineralizirane vode otopilo 3 g glukoze, 0,8 g kvašćevog ekstrakta, 1 g peptona, 0,04 g magnezijevog sulfata heptahidrata, 0,7 g kalijevog dihidrogenfosfata, 0,5 g kalijevog hidrogenfosfata, 1 g amonijevog acetata i 0,8 g amonijevog sulfata na magnetnoj miješalici. U jednu od te dvije tikvice dodan je i 1 g

kvašćevog ekstrakta. U druge dvije Erlenmeyerove tikvice od 500 mL je u svakoj od njih u maloj količini demineralizirane vode otopljeno 1,5 g glukoze, 1,5 g ksiloze, 0,8 g kvašćevog ekstrakta, 1 g peptona, 0,04 g magnezijevog sulfata heptahidrata, 0,7 g kalijevog dihidrogenfosfata, 0,5 g kalijevog hidrogenfosfata, 1 g amonijevog acetata i 0,8 g amonijevog sulfata na magnetnoj miješalici. U jednu od te dvije tikvice dodan je 1 g kvašćevog ekstrakta. Osim navedenih sastojaka, u svaku tikvicu dodano je i 3 mL/L, odnosno 0,06 mL otopine elemenata u tragovima. Sastav te otopine prikazan je u tablici 6. Nakon dodatka svih sastojaka tikvica se dopunila demineraliziranim vodom kako bi se dobila podloga određene koncentracije ukupnog volumena 200 mL. Podloge su zatim sterilizirane u autoklavu na 121 °C kroz 20 minuta, a prije korištenja one su ohlađene na sobnu temperaturu.

Podloga za uzgoj inzuluma pripremljena je u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL i od 300 mL na način da je u maloj količini demineralizirane vode otopljeno: 0,2 g glukoze, 0,08 g kvašćevog ekstrakta, 0,1 g peptona, 0,004 g magnezijevog sulfata heptahidrata, 0,07 g kalijevog dihidrogenfosfata, 0,05 g kalijevog hidrogenfosfata, 0,1 g amonijevog acetata i 0,08 g amonijevog sulfata u tikvici od 100 mL i 3 g glukoze, 0,4 g kvašćevog ekstrakta, 0,5 g peptona, 0,02 g magnezijevog sulfata pentahidrata, 0,35 g kalijevog dihidrogenfosfata, 0,25 g kalijevog hidrogenfosfata, 0,5 g amonijevog acetata i 0,4 g amonijevog sulfata. Nakon otapanja svih praškastih sastojaka u tikvicu od 300 mL još je dodano 0,3 mL otopine elemenata u tragovima. Tikvice su na zatim dopunjene demineraliziranim vodom tako da je konačni volumen u tikvici od 100 mL iznosio 20 mL, a u tikvici od 300 mL je iznosio 100 mL. Sterilizacija je provedena u autoklavu kroz 20 minuta na 121 °C.

3.2.4. Priprema otopine elemenata u tragovima

Otopina elemenata u tragovima prethodno je pripremljena te je za potrebe ovog rada ova otopina dobivena u gotovom obliku te je 50 mL izuzeto i filtrirano preko mikrobiološkog filtera (0,2 µm, Sartorius), a zatim je prebačeno u Eppendorf tubu u kojoj se čuvalo u zamrzivaču. Za potrebe pripreme neke od podloga otopina je korištena nakon što se sva otalila.

3.2.5. Priprema kompleksnih podloga za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama

Za potrebe ovog rada korištene su tri kompleksne podloge dobivene iz tekućeg dijela hidrolizata industrijske konoplje, bukve i jele. Prva dva su dobivena gotova dok je treći pripremljen netom prije korištenja za uzgoj. Sve tri dobivene su korištenjem visokotlačnog bioreaktora pri jednakim uvjetima predobrade.

U perforiranu košaru, koja je dio bioreaktorskog sustava, stavljena je određena količina lignocelulozne sirovine (885,7 g) te se zalila 1L 10 %-tnom sumpornom kiselinom. Bioreaktor je zatvoren te se sadržaj zagrijavao na temperaturu 180 °C. Zagrijavanje se provelo indirektno preko plašta pomoću termičkog ulja koje se zagrijalo u vanjskoj posudi električnim grijačima i čije se cirkuliranje u plaštu osiguralo pumpom. Vrijeme zadržavanja sadržaja pri 180 °C bilo je 10 min, a po završetku procesa predobrade bilo je potrebno sniziti tlak u sustavu regulacijom ventila za paru. Nakon toga uslijedilo je odvajanje tekućeg od krutog dijela podloge. Tekući dio podloge korišten za uzgoje u tikvicama izuzet je otvaranjem ventila na dnu bioreaktora dok čvrsti dio nije podvrgnut daljnjoj analizi. Tekući dijelovi hidrolizata industrijske konoplje, bukve i jele su profiltrirani korištenjem vakuum filtracije pomoću Büchnerovog lijevka, a potom je izvršena korekcija pH (do pH=7) dodatkom 4M otopine NaOH. Po završetku neutralizacije po 200 mL svakog od hidrolizata prebačeno je u Erlenmeyerove tikvice od 500 mL. U konačnici je pripremljeno 6 tikvica pri čemu je u pola od tih tikvica (različiti hidrolizati) dodano 0,8 g kvašćevog ekstrakta kako bi njegova koncentracija iznosila 4 g/L. Tako pripremljene podloge su sterilizirane su u autoklavu kroz 15 minuta na 121 °C. Sastav ovih hidrolizata određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Sastav tekućeg dijela hidrolizata industrijske konoplje, bukve i jele

| γ [g/L] | KONOPLJA | BUKVA | JELA |
|---------------------|----------|-------|------|
| Glukoza | 1,48 | 1,59 | 1,76 |
| Ksiloz | 3,67 | 12,70 | 8,53 |
| Octena kiselina | 0,17 | 0,37 | 0,48 |
| Laktat | 0,05 | 0 | 0,07 |
| Formijatna kiselina | 0 | 1,84 | 1,5 |
| 2,3-butandiol | 0 | 0,20 | 0,23 |

3.2.6. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama na tresilici

Bakterijska kultura uzgojena je u kemijski definiranim i kompleksnim podlogama. Tikvice koje su sadržavale 200 mL podloge, pripremljene na način opisan u poglavljima 3.2.3. i 3.2.5. inokulirane su s 20 mL inokuluma. Uzgoj na kompleksnim podlogama trajao je nešto duže (100 sati) i također vođen na temperaturi od 30°C uz konstantno miješanje na tresilici (50 o/min). Tijek odvijanja eksperimenta praćen je izuzimanjem sterilnih uzoraka iz svih tikvica svakih nekoliko sati. Tokom ovog istraživanja, osim sastava podloge, praćena je i promjena optičke gustoće uzoraka pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Volumen izuzetih uzoraka iznosio je 3 mL. Sastav svih uzoraka određen je UPLC analizom supernatanta nakon centrifugiranja svakog uzorka.

3.2.7. Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj podlozi u bioreaktoru s čvrstim nosačem

Nakon preliminarnog dijela istraživanja u tikvicama, provedeno je dodatno eksperimentalno istraživanje mogućnosti korištenja bioreaktora s čvrstim slojem u biotehnoškoj proizvodnji 2,3-BTD-a. U ovom dijelu proučavan je utjecaj visine čvrstog sloja na mogućnost imobilizacije stanica *P. polymyxa* i na dinamiku proizvodnje 2,3-BTD-a. U ovom dijelu eksperimentalnog rada korištene su tri različite visine sloja aktivnog ugljena (7 cm, 10,5 cm i 13 cm). Bioreaktor s čvrstim slojem je ustvari staklena kolona duljine 69,5 cm i promjera 5 cm u koju su najprije nasute staklene kuglice (mase 77,04 g) čija je visina iznosila 2,8 cm, na dno kolone radi sprječavanja propadanja čvrstog sloja aktivnog ugljena. Na njih je nasut aktivni ugljen (100 g,

145 g i 190 g odnosno 7 cm, 10,5 cm i 13 cm visine) te je dodatno na vrh čvrstog sloja dodan porozan čep koji je sprječavao fluidizaciju samog sloja. Kolona je termostatirana pomoću plastičnih cijevi koje su bile omotane oko kolone kroz koje je, uz pomoć peristaltičke pumpe cirkulirala termostatirana voda temperature 30 °C. Prije imobilizacije stanica radnog mikroorganizma sustav kolone i plastičnih cijevi za cirkulaciju podloge kroz bioreaktor steriliziran je upumpavanjem 1 L 10% -tne octene kiseline kroz cijevi protokom od 0,6 L/h (2 h). Po završetku kemijske sterilizacije cijeli sustav je ispran s 10 L demineralizirane sterilne vode koja je cirkulirala istim protokom kroz sustav čija je uloga bila ispiranje i uklanjanje zaostale octene kiseline i osiguravanje adekvatne pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje 2,3-BTD-a. Nakon navedenih pripremnih radnji uslijedila je imobilizacija stanica radnog mikroorganizma na čvrsti nosač (aktivni ugljen) na način da je 700 mL prethodno pripremljenog inokuluma upumpano u bioreaktor te je takva suspenzija cirkulirala kroz sustav 24 h. Drugi dan je suvišak inokuluma uklonjen iz sustava i započeto je upumpavanje svježe kemijski definirane podloge koja je uz minimalan protok (0,55 L/h) cirkulirala kroz kolonu do kraja svakog od tri eksperimenta. Minimalan protok podloge uzet je zbog sprječavanja mogućnosti ispiranja biomase s nosača čime bi se značajno smanjila efikasnost i pokazatelji uspješnosti. Tijekom odvijanja procesa praćen je izuzimanjem uzoraka iz podloge iz cijevi na donjem dijelu šprice. Uzorci su analizirani korištenjem UPLC analitike.

3.2.8. Analitičke metode

3.2.8.1. *Određivanje optičke gustoće*

Za određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom preliminarnog istraživanja u tikvicama koji su bili izuzeti prije inokulacije i tijekom fermentacije, najprije su homogenizirani na vrtložnoj miješalici, a potom prebačeni u staklenu kivetu kako bi se izmjerila optička gustoća uređajem Spektrofotometrom „Cary 100“. Uzorci su analizirani pri valnoj duljini od 600 nm.

3.2.8.2. *Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti*

Uzorci za UPLC analizu pripremljeni su na način da je 750 µL prethodno izuzetog homogeniziranog supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzoraka tijekom proizvodnje 2,3-BTD u tikvicama, prebačeno u Eppendorf kivetu te je u nju dodano 750 µL 10 %-tne otopine ZnSO₄ kako bi se dodatno istaložili proteini. Sadržaj kivete je homogeniziran pomoću vorteksa i ostavljen 20 minuta u mirovanju kako bi se proteini i nečistoće istaložili. Nakon toga su uzorci centrifugirani na 10000 o/min kroz 10 min, a zatim je 1,5 mL supernatanta razrijeđen u omjeru 1:1 s demineraliziranom vodom (4x razrjeđenje u konačnici). Razrijeđeni uzorci filtrirani su kroz mikrobiološki filter (0,2 µm, Sartorius) u staklenu vijalu za UPLC analizu. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke učinkovitosti provedena je uz protok mobilne faze 0,6 L/min, temperaturu od 60 °C pri čemu je volumen injektiranog uzorka bio 10 µL. Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su u računalnom programu za kromatografiju „OpenLAB CDS“. Pojedini sastojak uzorka za analizu detektiran je usporedbom retencijskih vremena uzorka i standarda, a koncentracija je izračunata iz jednadžbe pravca baždarnih dijagrama.

3.2.8.3. *Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase imobilizirane u eksperimentima s bioreaktorom s čvrstim slojem*

Količina biomase imobilizirane na čvrsti sloj određena je način da se od mase osušenog aktivnog ugljena na kraju eksperimenta koji je sadržavao bakterijsku biomasu (m_{po}) oduzela masa osušenog aktivnog ugljena na početku bioprocasa (m_{pr}).

$$m_{biomasa} = m_{po} - m_{pr} \quad [g] \quad [1]$$

3.2.9. Proračun pokazatelja uspješnosti procesa

Na temelju navedenih jednadžbi izračunati su pokazatelji uspješnosti proizvodnje 2,3-BTD-a:

$$Y_S = S_0 - S \quad [g/L] \quad [2]$$

$$Y_P = P - P_0 \quad [g/L] \quad [3]$$

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \text{ [g/g]} \quad [4]$$

gdje je:

S_0, P_0 - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g/L],

S, P - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g/L],

X_0 - početna koncentracija biomase [g/L],

X - konačna koncentracija biomase [g/L],

Y_S – ukupna potrošnja supstrata [g/L],

Y_P – ukupni prinos produkta [g/L],

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

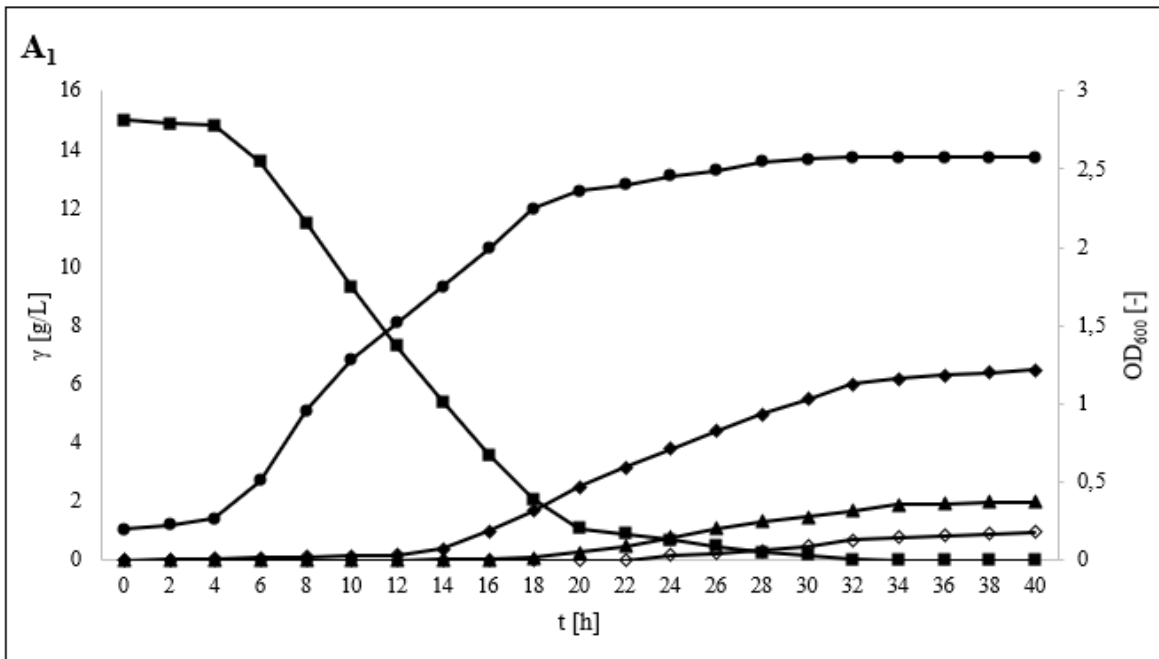
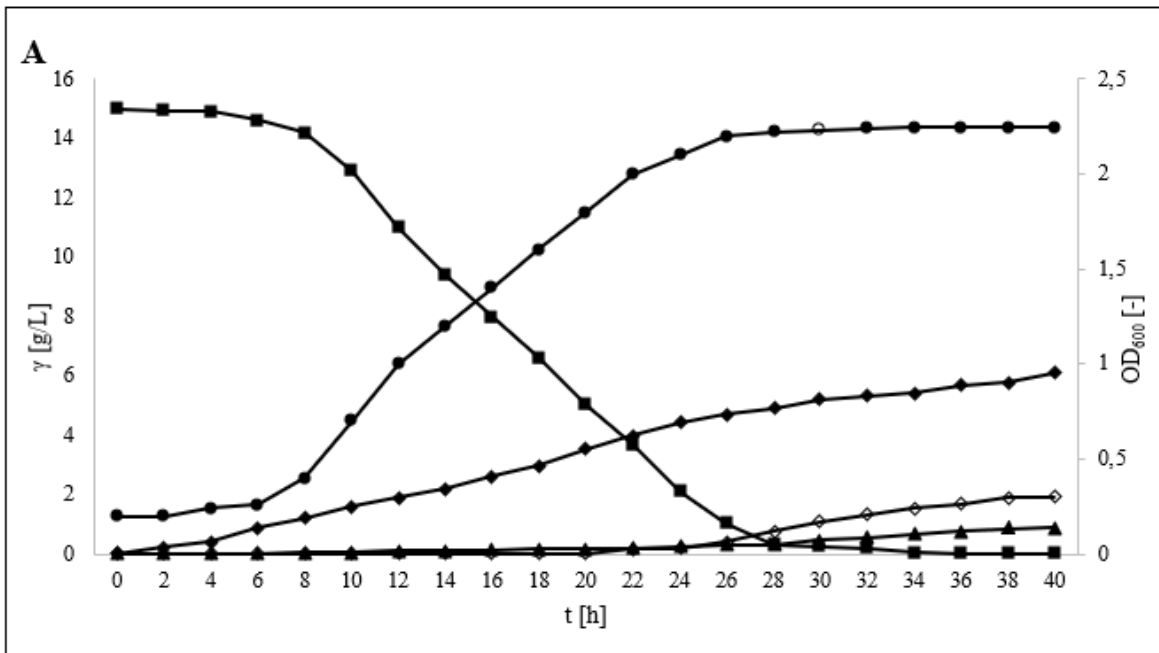
U ovom su radu su prikazani rezultati istraživanja u kojima je proučavan uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* na kemijski definiranim i kompleksnim hidrolizatima (hidrolizat industrijske konoplje, bukve i jele) sa i bez dodatka dodatnog izvora dušika (kvašćev ekstrakt) s ciljem ispitivanja mogućnosti korištenja u proizvodnji 2,3-BTD-a. Također, u ovom poglavlju bit će prikazani i rezultati dobiveni proučavanjem proizvodnje 2,3-BTD-a pomoću bakterije *P. polymyxa* u bioreaktoru s čvrstim slojem na kemijski definiranoj podlozi.

U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama.

U poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s čvrstim slojem uz promjenjivu visinu čvrstog sloja.

4.1. Rezultati preliminarnog istraživanja proizvodnje 2,3-BTD-a u tikvicama na kemijski definiranim i kompleksnim podlogama sa i bez dodatka dodatnog izvora dušika

Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 proveden je u mikroaerofilnim uvjetima u Erlenmeyerovim tikvicama na pet različitih podloga – dvije kemijski definirane i tri kompleksne podloge (hidrolizatima konoplje, bukve i jele). Podloge su se razlikovale po sadržaju fermentabilnih šećera- glukoze i ksiloze dok su elementi kao što su izvori dušika, faktori rasta, soli i elementi u tragovima bili dodani u jednakoj količini u svaku korištenu podlogu. Za svaku navedenu podlogu paralelno je proveden uzgoj sa i bez dodatka 4 g/L kvašćevog ekstrakta kako bi se ispitaio utjecaj dodatnog izvora dušika na dinamiku bioprocesa. Uzgoj u tikvicama je proveden pri temperaturi od 30 °C na tresilici pri brzini okretaja 50 o/min. Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće podloge (OD) pri 600 nm kao indirektni pokazatelj rasta biomase u hranjivoj podlozi. Također je praćena promjena koncentracije supstrata (glukoze i ksiloze) te glavnih produkata (2,3-BTD, etanola i laktata) za cijelo vrijeme trajanja eksperimenta.

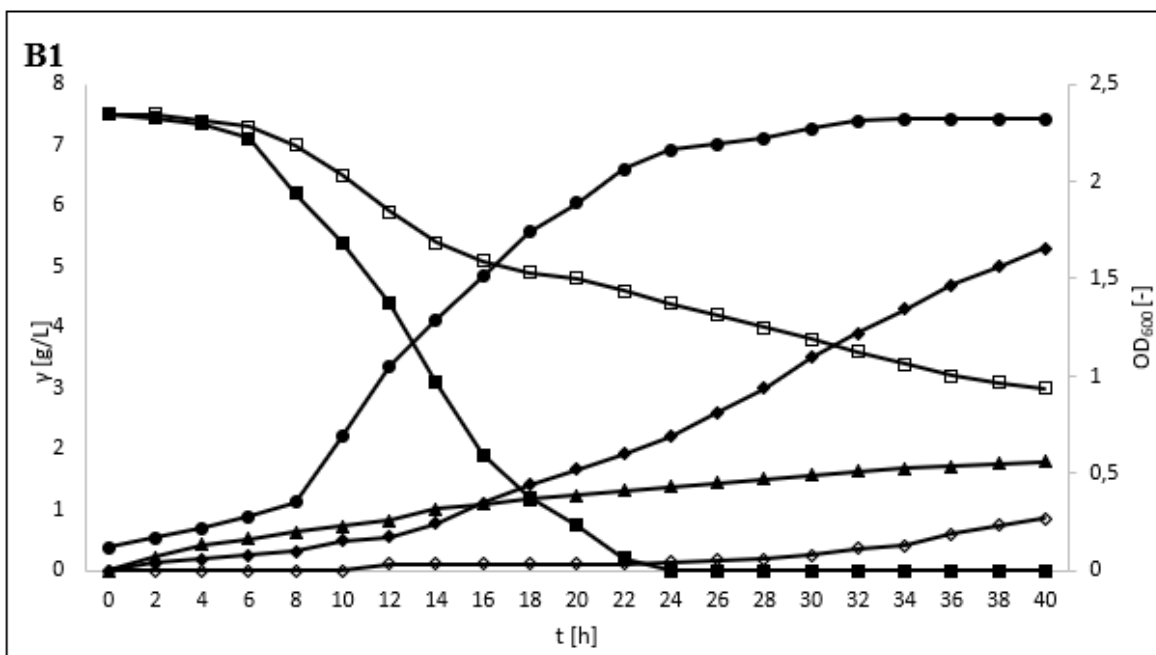
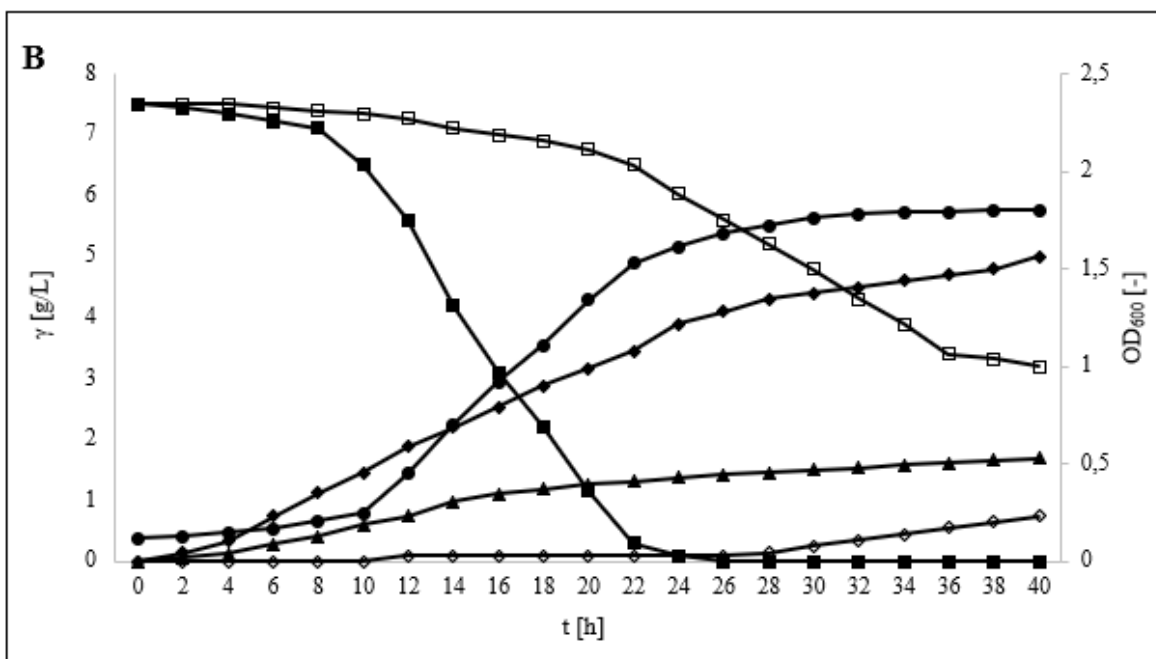


Slika 5. Ovisnost koncentracije supstrata, produkta i OD o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na: A kemijski definirano podlozi koja je sadržavala samo glukozu, A₁ – kemijski definiranoj podlozi A u koju je dodano i 4 g/L kvašćevog ekstrakta

(-■- - glukoza, -□- - ksiloza, -●- - biomasa, -◆- -2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)

U eksperimentima sa *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim podlogama (slika 5) utvrđeno je kako eksponencijalna faza rasta u slučaju kada je u podlozi korištena samo glukoza

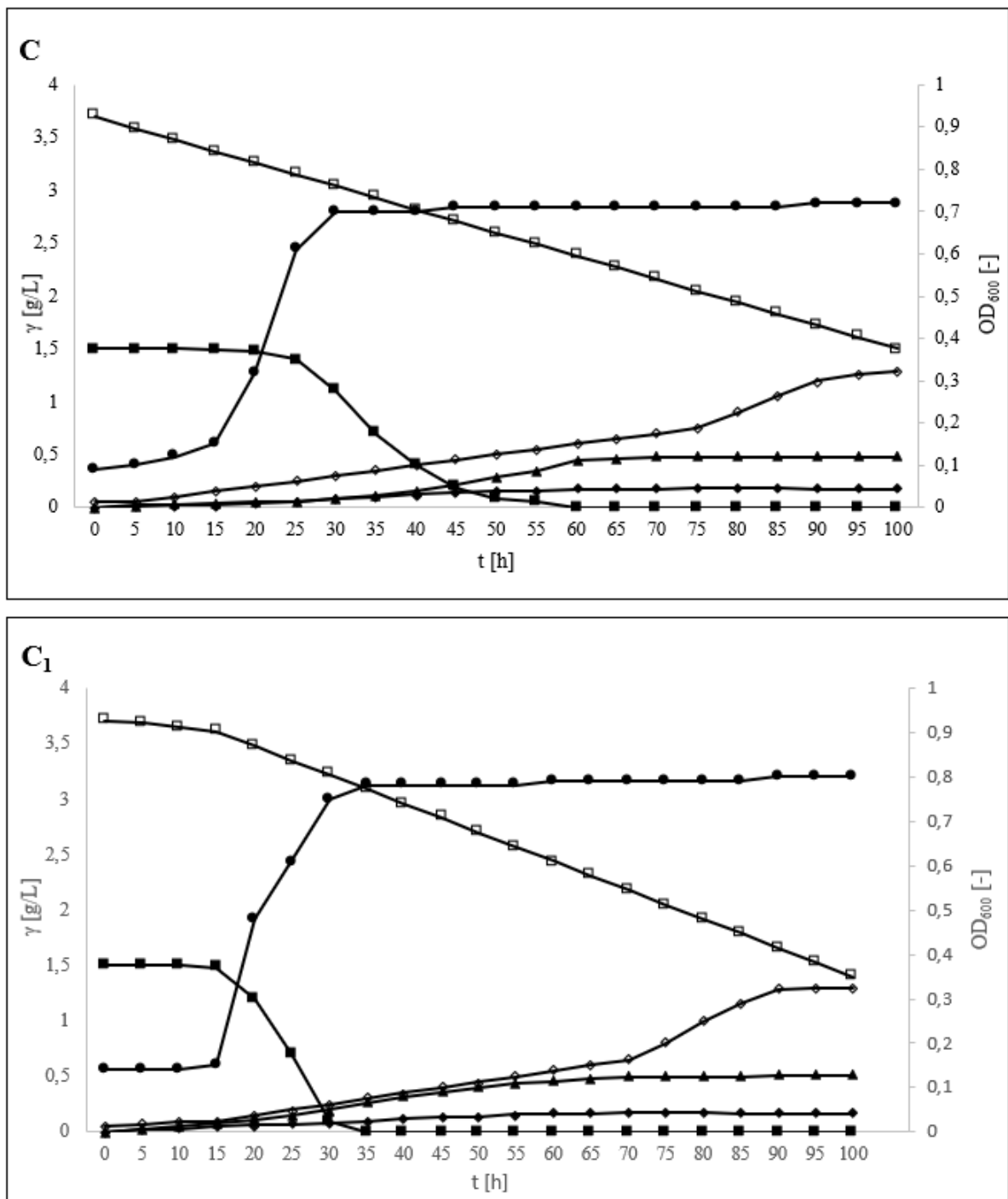
kao izvor ugljika započela nešto ranije (oko petog sata) u slučaju kada je u podlogu dodan dodatan izvor dušika. U slučaju kemijski definirane podloge bez dodatka kvašćevog ekstrakta eksponencijalna faza započinje u 8. satu. Također, u eksperimentu s dodanim kvašćevim ekstraktom uočena je veća količina proizvedene biomase (viša očitavanja OD vrijednosti) u odnosu na eksperiment u podlozi bez njegovog dodatka. Na kraju ova dva eksperimenta postignuti su slični prinosi 2,3-BTD-a, dok su se koncentracije ostalih praćenih produkata (etanola i laktata) razlikovale na kraju istraživanja. U tikvici bez dodanog izvora dušika nastalo je više mliječne kiseline, a u tikvici s dodanim kvašćevim ekstraktom više etanola. Ukupno su oba eksperimenta trajala 40 sati, a nešto brža potrošnja supstrata zabilježena je uz dodatak izvora dušika.



Slika 6. Ovisnost koncentracije supstrata, produkta i OD o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na: B - kemijski definiranoj podlozi koja je sadržavala glukozu i ksilozu kao izvore dušika, B₁ – kemijski definiranoj podlozi B u koju je dodano i 4 g/L kvašćevog ekstrakta

(-■- - glukozu, -□- - ksilozu, -●- - biomasa, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)

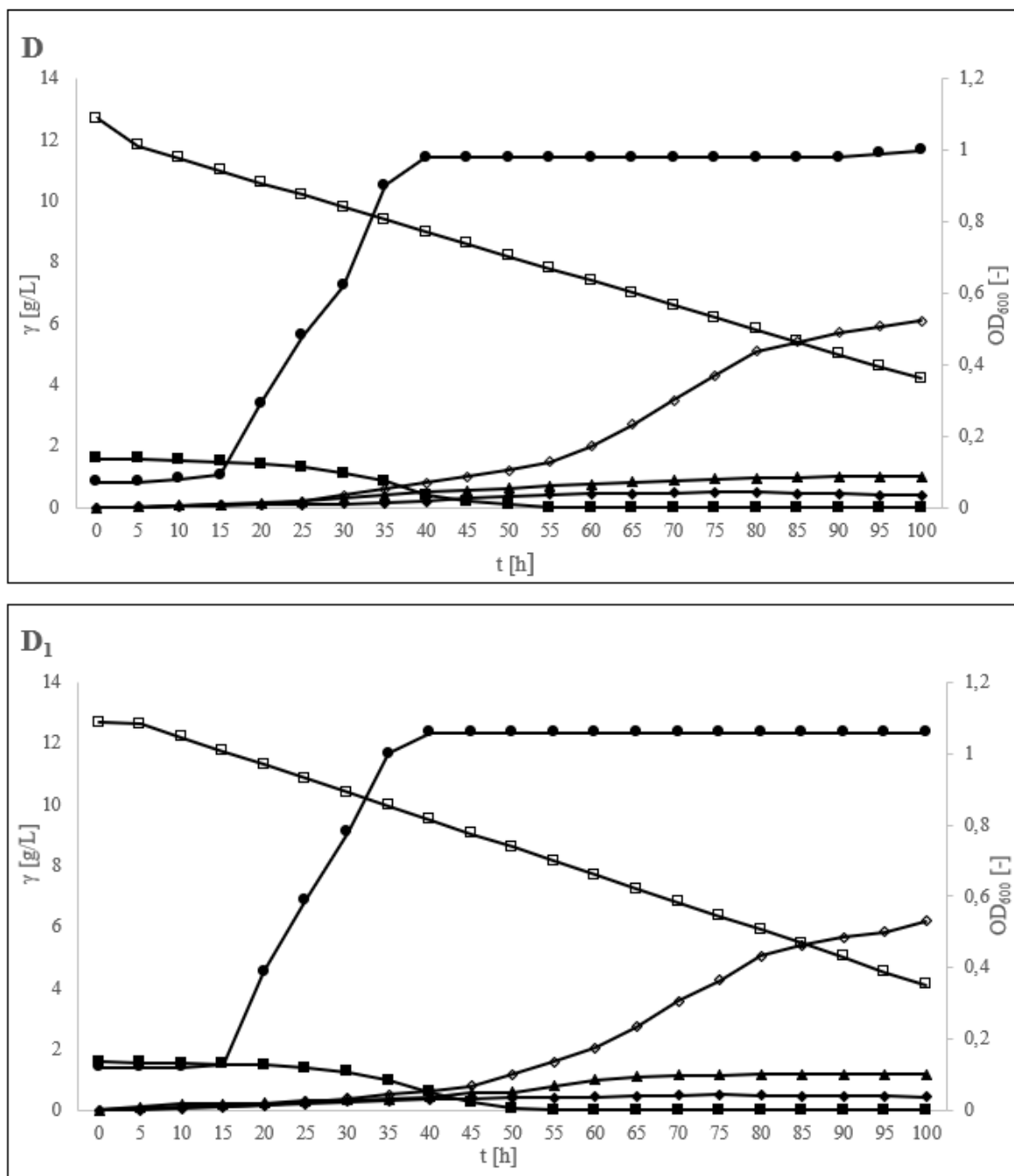
U druge dvije tikvice koje su paralelno držane na tresilici osim glukoze kao izvor ugljika dodana je i ksiloza na način da je ukupna količina izvora ugljika bila jednaka i iznosila 15 g/L. U ovim eksperimentima (slika 6) uočena je slična dinamika bioprocesa. Uočeno je da se supstrati troše redosljedno pri čemu se prvo troši glukoza, a potom ksiloza iako je blagi pad koncentracije ksiloze zabilježen od početka dok je koncentracija glukoze bila najviša. I u ovim uzgojima nešto više vrijednosti OD zabilježne su u slučaju kad je u podlogu dodan dodatak izvor dušika. Ono što je bila najveća razlika u rezultatima dobivenim u tikvicama s različitim izvorima ugljika je da su puno niži prinosi svih produkata (2,3-BTD-a , etanola i laktata) u tikvicama u kojima je uz glukozu dodana i ksiloza. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Didak Ljubas i sur. (2022).



Slika 7. Ovisnost koncentracije supstrata, produkta i OD o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na: C – podlozi koja se sastoji od tekućeg dijela hidrolizata konoplje C₁ – podlozi C u koju je dodano i 4 g/L kvašćevog ekstrakta

(-■- - glukozna, -□- - ksiloza, -●- - biomasa, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)

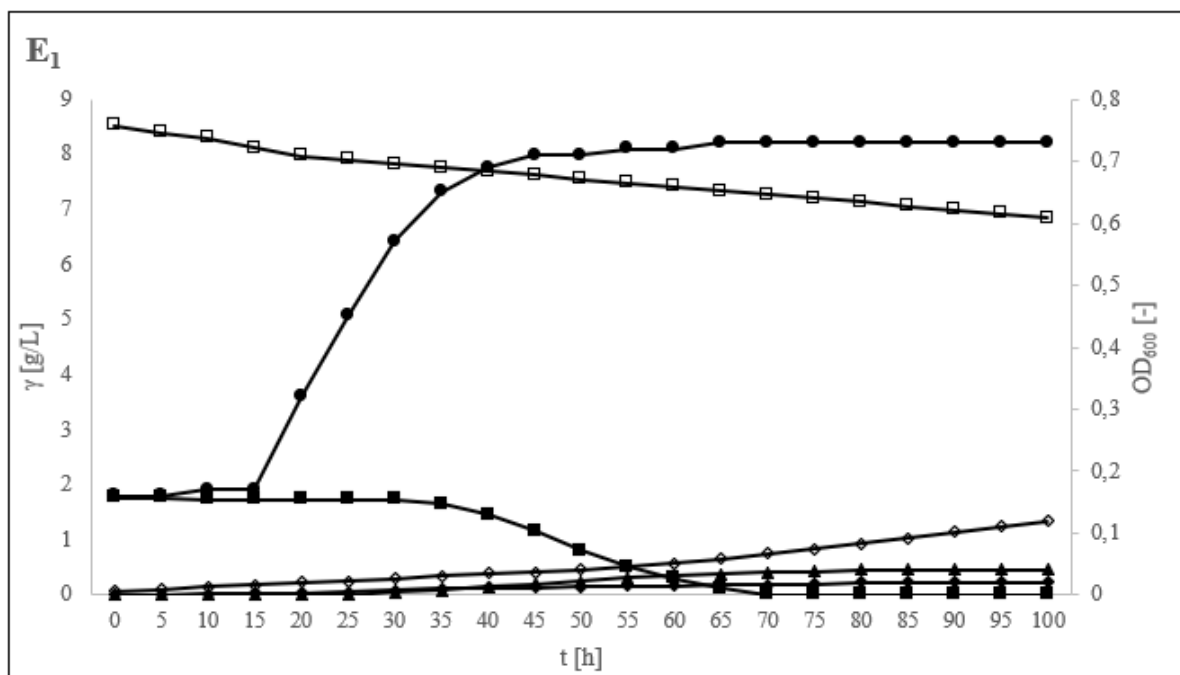
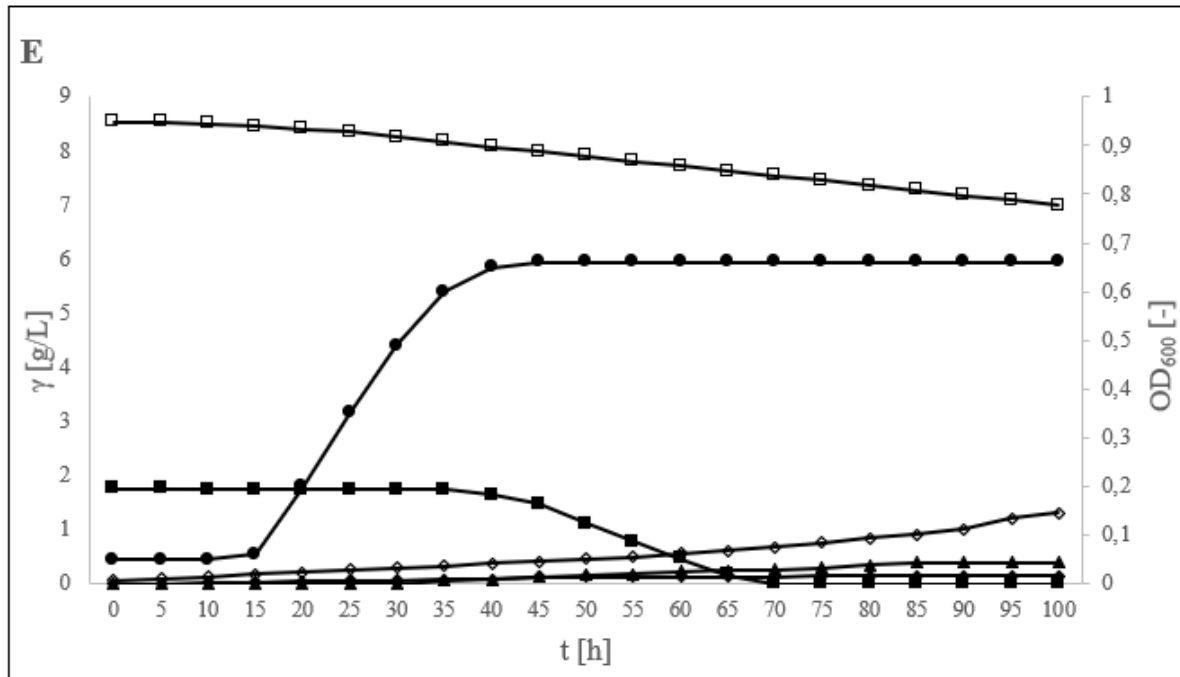
Rezultati ispitivanja mogućnosti korištenja hidrolizata konoplje u biotehnološkoj proizvodnji 2,3-BTD-a prikazani su na slici 7. Slika C prikazuje promjene koncentracije supstrata (glukoza i ksiloza) i svih detektiranih produkata (2,3-BTD, etanol i laktat). Slika C1 prikazuje rezultate na tom istom hidrolizatu uz dodatak kvašćevog ekstrakta. Generalno gledano, prilagodba bakterije (log faza) u kompleksnim podlogama traje 15 sati, dakle 5 sati dulje nego u kemijski definiranoj podlozi koja je sadržavala glukozu i ksilozu (B₁) te 9 sati dulje nego u kemijski definiranoj podlozi koja je sadržavala samo glukozu (A₁). Glukoza je u potpunosti potrošena u obje tikvice koje su sadržavale hidrolizat konoplje s tim da je fermentacija bila brža u slučaju kada je u podlogu dodan kvašćev ekstrakt. Proizvodnja 2,3-BTD, etanola i mliječe kiseline pokazuje sličan trend kao i u prethodnim eksperimentima na kemijski definiranim podlogama s tim da su postignute niže koncentracije zbog nižih koncentracija supstrata. U konačnici, u podlozi C potrošeno je 59,46 % ksiloze (3,7 g/L-1,5 g/L), u podlozi C₁ potrošeno je 62,16 % ksiloze (3,7 g/L-1,4 g/L).



Slika 8. Ovisnost koncentracije supstrata, produkta i OD o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na: D – podlozi koja se sastoji od tekućeg dijela hidrolizata bukve D₁ - podlozi D u koju je dodano i 4 g/L kvašćevog ekstrakta

(-■- - glukoza, -□- - ksiloza, -●- - biomasa, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)

U slučaju kada je kao podloga korišten hidrolizat bukve (slika 8) ostvareni su slični rezultati što se tiče količine proizvedenih produkata na kraju eksperimenta u usporedbi sa eksperimentom na hidrolizatu industrijske konoplje. Rezultati su slični i onima kada je korištena kemijski definirana podloga koja je sadržavala glukozu i ksilozu. Hidrolizat bukve sadrži malo više početne koncentracije glukoze i značajno veće koncentracije ksiloze koja se trošila gotovo od početka fermentacije što je vrlo vjerojatno posljedica niske koncentracije glukoze (Didak Ljubas i sur., 2022). Promjena optičke gustoće kao indirektnog pokazatelja rasta biomase bila je nešto veća u odnosu na eksperimente sa hidrolizatom konoplje, ali značajnije lošiji u usporedbi s istraživanjem provedenim na kemijski definiranim podlogama na temelju čega se može zaključiti da koncentracija glukoze utječe na prinos biomase i 2,3-BTD-a. Također, bitno je napomenuti da neki spojevi koji nastaju kao nusprodukti tijekom kiseline predobrade (mravlja kiselina, octena kiselina, furfural) također mogu utjecati na rast mikroorganizma i njegovu aktivnost čime se mogu objasniti lošiji rezultati ostvareni na kompleksnim podlogama.



Slika 9. Ovisnost koncentracije supstrata, produkta i OD o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na: E - podlozi koja se sastoji od tekućeg dijela hidrolizata jele E₁ -podlozi E u koju je dodano i 4 g/L kvašćevog ekstrakta

(-■- - glukoza, -□- - ksiloza, -●- - biomasa, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)

U zadnja dva eksperimenta provedena u tikvicama, kao podloga je korišten hidrolizat jele (slika 9). Sastav hidrolizata jele sličan je sastavu hidrolizata bukve pri čemu hidrolizat jele sadrži nešto manje ksiloze. I u ovom eksperimentu zabilježene su niže vrijednosti promjena optičke gustoće u usporedbi s rezultatima koji su dobiveni na kemijski definiranoj podlozi. Dodatak kvašćevog ekstrakta u podlogu malo je ubrzao potrošnju glukoze koja je u konačnici sva potrošena kao i u svim eksperimentima u tikvici dok je najviše zaostalo ksiloze koja nije preferencijalni izvor ugljika. Ukupno gledano u svim hidrolizatima korišteni za ispitivanje mogućnosti u proizvodnji 2,3-BTD-a pomoću bakterije *P. polymyxa* ostvareni su značajno lošiji rezultati koji se prvenstveno očituju u prinosu biomase, a zatim i 2,3-BTD-a. Koncentracije produkata su bile dosta niske, a najbrža potrošnja glukoze je zabilježena kad je korišten hidrolizat konoplje kao podloga uz dodatak kvašćevog ekstrakta. Pokazatelji uspješnosti ovog dijela istraživanja prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Prikaz parametara uspješnosti za uzgoje u podlogama A-E₁

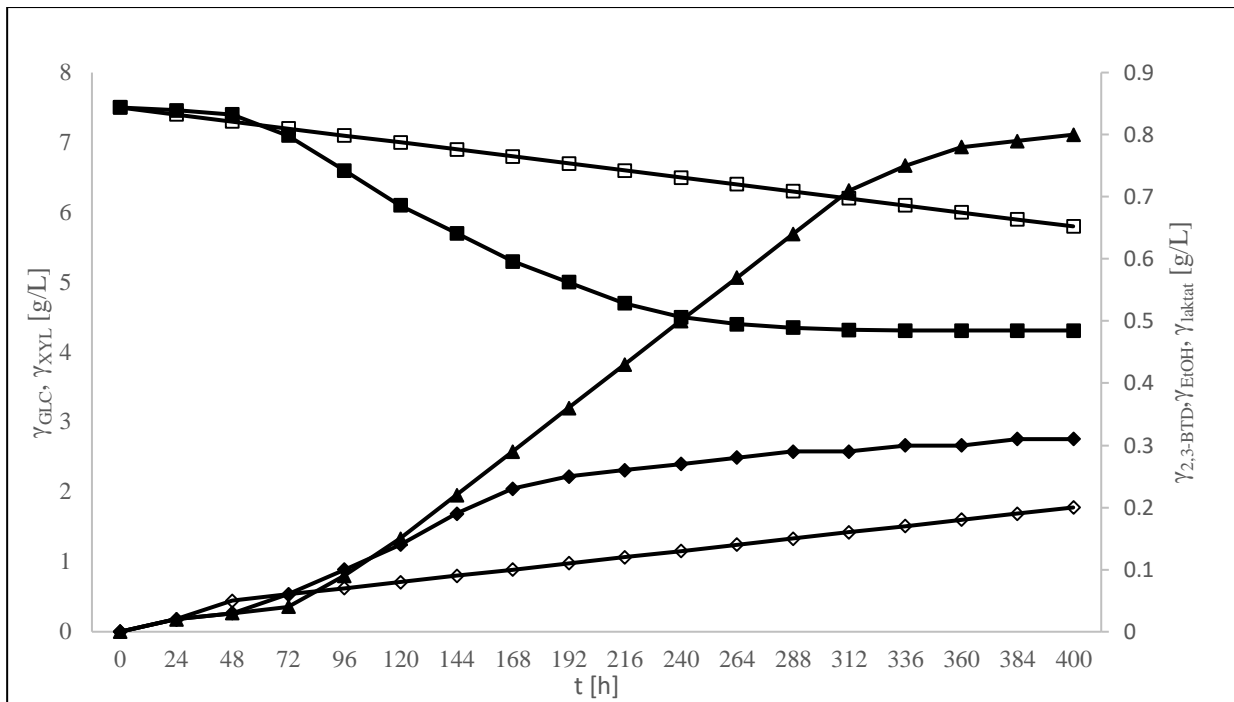
| | Y_{2,3-BTD} [g/L] | Y_{EtOH} [g/L] | Y_{Laktat} [g/L] | Y_{2,3-BTD/glu+ksi} [g/g] | Pr_{2,3-BTD} [g/Lh] |
|----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---|---------------------------------------|
| A | 6,1 | 1,93 | 0,89 | 0,407 | 0,153 |
| A₁ | 6,5 | 2 | 0,98 | 0,433 | 0,163 |
| B | 5 | 1,7 | 0,75 | 0,424 | 0,125 |
| B₁ | 5,3 | 1,8 | 0,85 | 0,442 | 0,133 |
| C | 0,17 | 0,48 | 1,29 | 0,046 | 0,002 |
| C₁ | 0,17 | 0,51 | 1,3 | 0,045 | 0,002 |
| D | 0,4 | 1 | 6,1 | 0,04 | 0,004 |

Tablica 8. Prikaz parametara uspješnosti za uzgoje u podlogama A-E₁-*nastavak*

| | | | | | |
|----------------------|------|------|------|-------|-------|
| D₁ | 0,45 | 1,18 | 6,2 | 0,044 | 0,005 |
| E | 0,15 | 0,4 | 1,32 | 0,046 | 0,002 |
| E₁ | 0,23 | 0,46 | 1,35 | 0,067 | 0,002 |

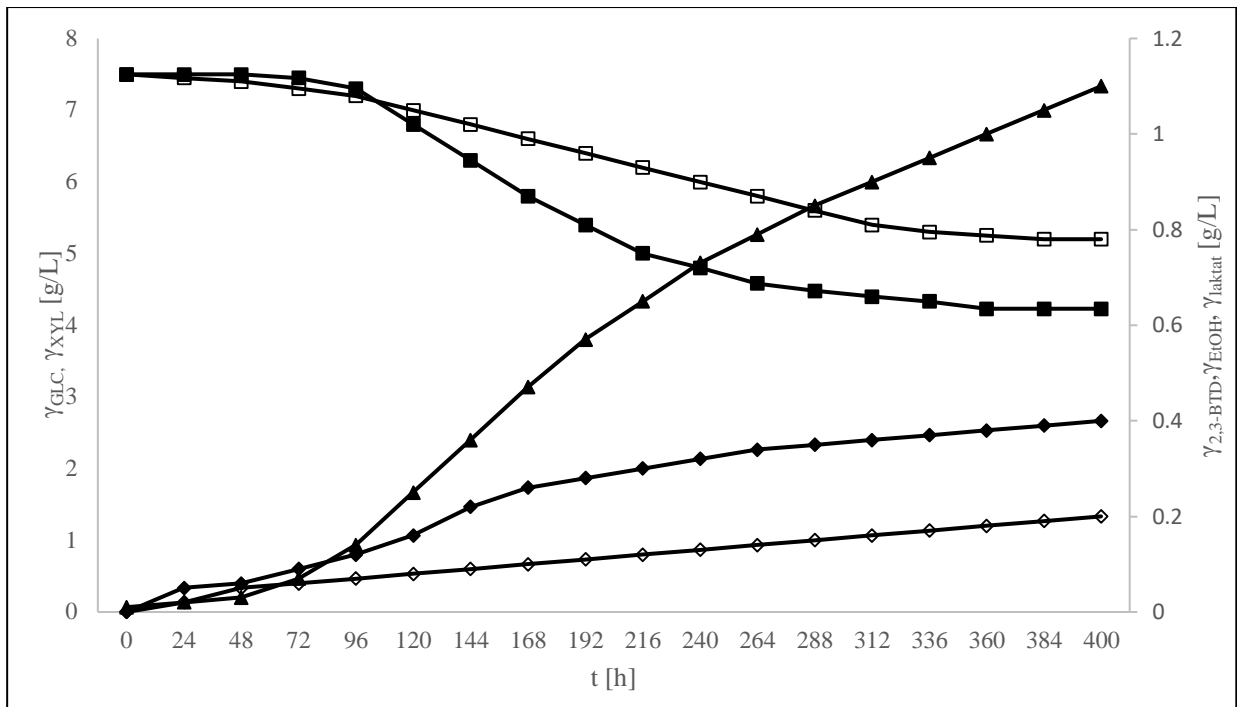
4.2.Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* u bioreaktoru s čvrstim slojem pri različitim visinama sloja aktivnog ugljena

Nakon preliminarnog istraživanja na kemijski definiranim i kompleksnim podlogama odlučeno je da će se upravo podloga B₁ koristiti u daljnjem istraživanju. Drugi dio ovog diplomskog rada bio je baziran na proučavanju mogućnosti korištenja bioreaktora s čvrstim slojem u proizvodnji 2,3-BTD-a korištenjem aktivnog ugljena kao nosača za radni mikroorganizam. Optimalna temperatura proizvodnje regulirana je preko silikonskog crijeva omotanog oko kolone kroz koju je cirkulirala termostatorirana voda. Nakon početne imobilizacije i upumpavanja čiste podloge ona je kontinuirano kružila sustavom, a njenu cirkulaciju je osiguravala peristaltička pumpa. Uzgoji su provedeni na kemijski definiranim podlogama koje su sadržavale 7,5 g/L glukoze i 7,5 g/L ksiloze zbog toga što se pokušavalo simulirati približne sastave hidrolizata lignoceluloznih sirovina koje bi eventualno mogli primjenjivati u biotehnološkoj proizvodnji 2,3-BTD-a. Jedini promjenjivi parametar bila je visina nosača, odnosno količina aktivnog ugljena koji je služio kao imobilizacijsko sredstvo za proizvodni mikroorganizam. Rezultati uzgoja prikazani su na slikama 10-12.



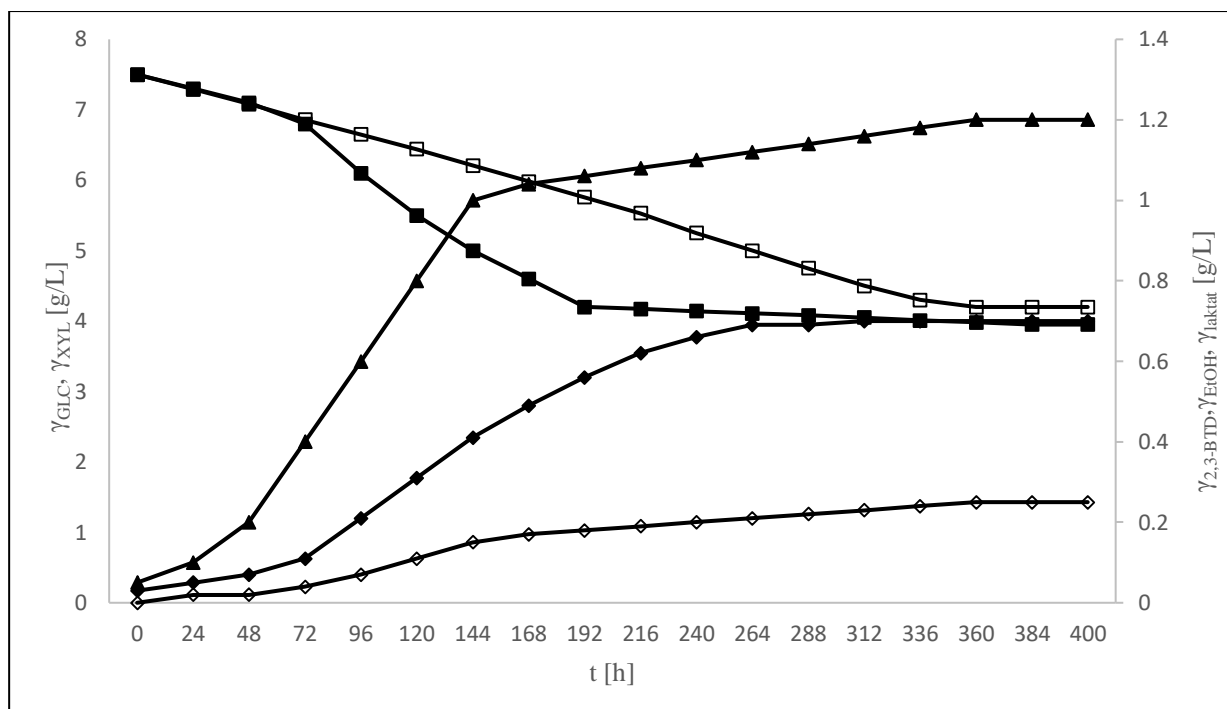
Slika 10. Prikaz promjene koncentracije supstrata i produkata o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* u koloni s 7 cm visine nasutih granula aktivnog ugljena

(-■- - glukoza, -□- - ksiloza, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)



Slika 11. Prikaz promjene koncentracije supstrata i produkata o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* u koloni s 10,5 cm visine nasutih granula aktivnog ugljena

(-■- - glukoza, -□- - ksiloza, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)



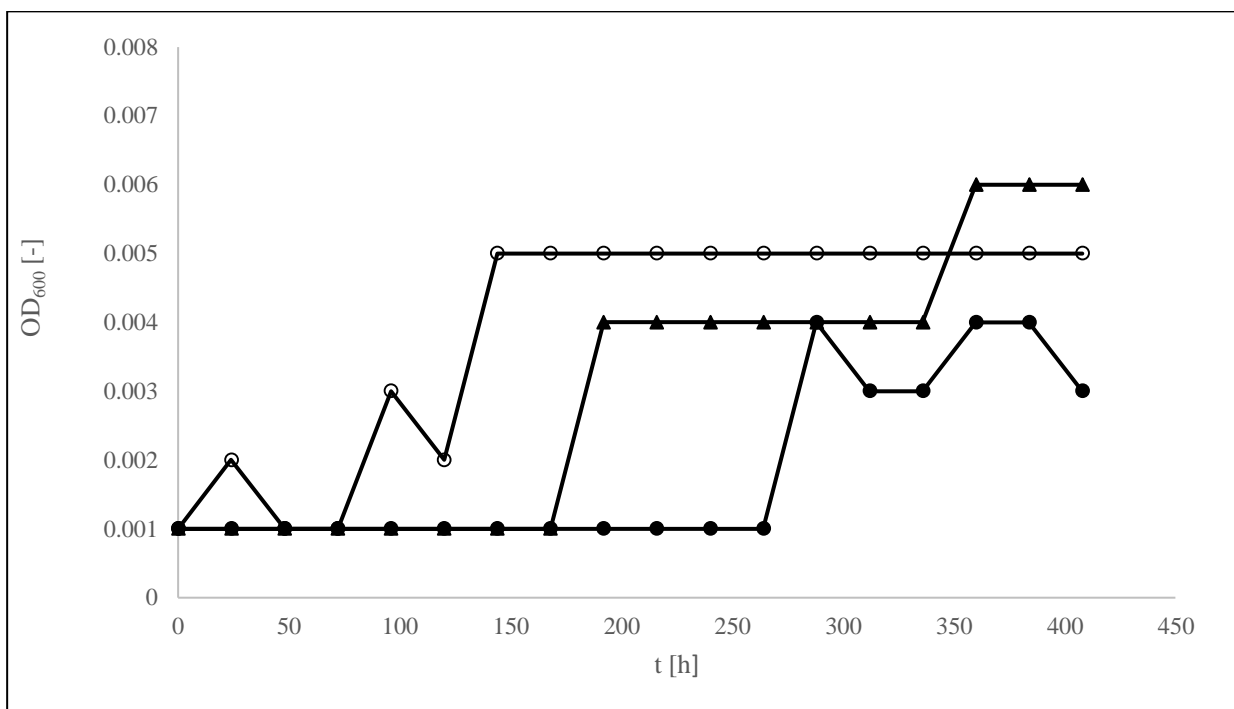
Slika 12. Prikaz promjene koncentracije supstrata i produkata o vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* u koloni s 13 cm visine nasutih granula aktivnog ugljena

(-■- - glukoza, -□- - ksiloza, -◆- - 2,3-BTD, -▲- - etanol, -◇- - laktat)

U prva dva eksperimenta u kojima je korišteno 100 g, 145 g i 190 g aktivnog ugljena može se vidjeti relativno dugo trajanje lag faze proizvodnog mikroorganizma. S obzirom na činjenicu da je na manjoj količini aktivnog ugljena moguće imobilizirati manju količinu biomase u usporedbi sa zadnjim eksperimentom u kojem je korištena najveća količina imobilizacijskog sredstva, potrošnja prisutnih šećera je bila spora. Glukoza je preferencijalni izvor ugljika i najprije se troši s time da je u sva tri eksperimenta uočena blaga, ali konstantna potrošnja ksiloze. S obzirom na činjenicu da je ksiloza manja molekula od glukoze (Roli i sur., 2016), moguće je da je do nekih stanica koje su se zatekle dublje u zrcima aktivnog ugljena ksiloza lakše difundirala u odnosu na glukozu. Važno je napomenuti da, s obzirom na nisku brzini strujanja (laminarno strujanje) fluida kroz kolonu i oko granula aktivnog ugljena, postojali su značajni otpori prijenosu mase čime se može objasniti relativno dugo trajanje bioprocesa. Iz rezultata prikazanih na slikama 10, 11 i 12 jasno je vidljivo da je brzina potrošnje oba supstrata najveća u slučaju kada je visina aktivnog ugljena u bioreaktoru s čvrstim slojem bila najviša što je u direktnoj korelaciji s količinom imobilizirane biomase. Iako je u posljednjem eksperimentu bilo imobilizirano najviše biomase (0, 89 g), na slici 12 može se vidjeti da je potrošnja glukoze stala nakon 200-tog sata dok se potrošnja ksiloze nastavila do 340-tog sata što je vrlo slično kao u prethodna dva

eksperimenta. Ova pojava mogla bi se i činjenicom da je ksiloza kao manja molekula lakše difundirala do dubljih slojeva aktivnog ugljena u kojima je bila imobilizirana biomasa. Osim toga, moguće je i da je dio biomase koja je bila bliže površinskom sloju isprano ili je došlo do njenog odumiranja. Što se tiče koncentracija proizvedenog 2,3- BTD-a, najniža koncentracija na kraju uzgoja je zabilježena u prvom slučaju dok je u druga dva slučaja zabilježena nešto viša koncentracija slična rezultatima dobivenim u preliminarnom istraživanju.

Tijekom bakterijskog uzgoja u koloni s različitim visinama sloja aktivnog ugljena mjerena je optička gustoća, međutim OD vrijednost je za vrijeme cijelog uzgoja varirala između 0,01 i 0,06 (slika 13) na temelju čega se može zaključiti da se većina bakterijske biomase zadržavala na nosaču, aktivnom ugljenu. Još jedan dokaz prisustva imobilizirane biomase je potrošnja supstrata i sinteza produkta koji su zabilježeni i u preliminarnom dijelu istraživanja. U tablici 9 prikazani su pokazatelji uspješnosti bioprocesa tijekom navedenih uzgoja u bioreaktoru s čvrstim slojem.



Slika 13. Prikaz promjene optičke gustoće tijekom uzgoja u bioreaktoru s čvrstim nosačem

-●-: uzgoj u bioreaktoru pri visini sloja aktivnog ugljena od 7 cm, -○-: uzgoj u bioreaktoru pri visini sloja aktivnog ugljena od 10,5 cm, -▲-: uzgoj u bioreaktoru pri visini sloja aktivnog ugljena od 13 cm

Tablica 9. Prikaz pokazatelja uspješnosti nakon uzgoja *P. polymyxa* DSM 724 u bioreaktoru s nosačem uz promjenu visine sloja nosača od 7, 10,5 i 13 cm.

| | VISINA STUPCA AKTIVNOG UGLJENA | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------|--------|
| | 7 cm | 10,5cm | 13 cm |
| $Y_{2,3\text{-BTD}}$ [g/L] | 0,31 | 0,4 | 0,7 |
| Y_{EtOH} [g/L] | 0,8 | 1,1 | 1,2 |
| Y_{laktat} [g/L] | 0,2 | 0,2 | 0,25 |
| $Y_{2,3\text{-BTD,glu+ksi}}$ [g/g] | 0,063 | 0,072 | 0,102 |
| $Pr_{2,3\text{-BTD}}$ [g/Lh] [g/Lh] | 0,0005 | 0,0007 | 0,0012 |
| m_{biomasa} [g] | 0,11 | 0,55 | 0,89 |

5. ZAKLJUČAK

1. Usporedbom kemijski definiranih podloga koje su sadržavale glukozu kao jedini izvor ugljika i onih koje su sadržavale glukozu i ksilozu primijećeni su sniženi prinosi bioprodukata: 18 % manje 2,3-BTD-a , 8,8 % manje EtOH i 17 % manje laktata proizvedeno je u podlogama koje su sadržavale glukozu i ksilozu.
2. Bakterija *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 fermentira glukozu i ksilozu do 2,3-butandiola, etanola i mliječne kiseline u svim tikvicama u kemijski definiranim i kompleksnim podlogama, ali uz značajno niže prinose 2,3-BTD-a u kompleksnim podlogama koje su bile pripremljene od tekućih dijelova hidrolizata.
3. Dodatak kvašćevog ekstrakta u kemijski definirane podloge tijekom uzgoja u tikvicama uzrokuje veći prinos biomase kao i njenih bioprodukata. U kemijski definiranim podlogama s dodatkom kvašćevog ekstrakta proizvedeno je 6,3 % više 2,3-BTD-a, 4,7 % više EtOH i 11,7 % više laktata u odnosu na podloge istog sastava, ali bez dodatka kvašćevog ekstrakta.
4. Uzgojem *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s čvrstim slojem se povećanjem sloja povećava i prinos 2,3-BTD-a. Pri visinama sloja od 7 cm, 10,5 cm i 13 cm prinos 2,3-BTD-a je iznosio 0,31 g/L, 0,4 g/L i 0,7g/L uz koeficijente konverzije 0,063 g/g, 0,072 g/g i 0,102 g/g uz vrijednosti produktivnosti od 0,0005 g/Lh, 0,0007 g/Lh i 0,0012 g/Lh.
5. Bioreaktor s čvrstim slojem može se koristiti u proizvodnji 2,3-BTD-a uz aktivni ugljen kao imobilizator biomase, ali je proces potrebno optimizirati.

6. LITERATURA

Abdel-Khalek MA, El-Midany AA (2013) Adsorption of *Paenibacillus polymyxa* and its impact on coal cleaning. *Fuel Process Technol* **113**, 52-56. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2013.03.016>

Afandizadeh, S, Foumeny EA (2001) Design of packed bed reactors: guides to catalyst shape, size, and loading selection. *Appl Therm Eng* **21**, 669-682. [https://doi.org/10.1016/S1359-4311\(00\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S1359-4311(00)00072-7)

Anjum H, Johari K, Gnanasundaram N, Appusamy A, Thanabalan M (2019) Impact of surface modification on adsorptive removal of BTX onto activated carbon. *J Mol Liq* **280**, 238-251

Białkowska, AM (2016) Strategies for efficient and economical 2, 3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol* **32**, 1-14. . doi: 10.1007/s11274-016-2161-x.

Biebl H, Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD (1998) Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 24-29. doi: 10.1007/s002530051251

Budi SW, Van Tuinen D, Arnould C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi, S (2000) Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Appl Soil Ecol* **15**, 191-199. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00095-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00095-0)

Çolak F, Olgun A, Atar N, Yazıcıoğlu, D (2013) Heavy metal resistances and biosorptive behaviors of *Paenibacillus polymyxa*: batch and column studies. *J Ind Eng Chem*, **19**, 863-869. doi: 10.1016/j.jiec.2012.11.001

Celińska E, Grajek W (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol-current state and prospects. *Biotechnol Adv.* **27(6)**, 715-725. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.002.

Didak Ljubas B, Novak M, Trontel A, Rajković A, Kelemen Z, Marđetko N i sur. (2022) Production of Different Biochemicals by *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 From Pretreated Brewers' Spent Grains. *Front Microbiol.* **4**;13:812457. 10.3389/fmicb.2022.812457

Dürre P (2007) Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol J: Healthcare Nutrition Technology* **2**, 1525-1534. <https://doi.org/10.1002/biot.200700168>

- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan, ZC (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Factories* **15**, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Hakizimana O, Matabaro E, Lee BH (2020) The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnol Rep*, **25**, doi:10.1016/j.btre.2019.e00397
- Häßler T, Schieder D, Pfaller R, Faulstich M, Sieber, V (2012) Enhanced fed-batch fermentation of 2, 3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresour technol* **124**, 237-244. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.047
- Heidarinejad Z, Dehghani MH, Heidari M, Javedan G, Ali I, Sillanpää, M. (2020) Methods for preparation and activation of activated carbon: a review. *Environ. Chem Lett* , 393-415. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00955-0>
- He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE (2007). Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *AEM* **73**, 168-178. doi: 10.1128/AEM.02023-06
- Jeong H, Choi SK, Ryu CM, Park SH (2019) Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Front Microbiol.* **10**, doi: 10.3389/fmicb.2019.00467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00467>
- Kargbo, H, Harris, JS, Phan, AN (2021). “Drop-in” fuel production from biomass: Critical review on techno-economic feasibility and sustainability. *Renew Sust Energ Rev* **135**, 110168. doi:10.1016/j.rser.2020.110168
- Lal S, Tabacchioni S (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J Microbiol* **49**, 2-10. doi: 10.1007/s12088-009-0008-y
- Langendries S, Goormachtig S (2021) *Paenibacillus polymyxa* , a Jack of all trades. *Environ Microbiol* **23**, 5659-5669. doi:10.1111/1462-2920.15450
- Ma C, Wang A, Qin J, Li L, Ai X, Jiang T, Xu P (2009) Enhanced 2, 3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 49-57. doi: 10.1007/s00253-008-1732-7

Mailaram, S, Narisetty, V, Ranade, VV, Kumar, V, Maity, SK (2022). Techno-Economic Analysis for the Production of 2, 3-Butanediol from Brewers' Spent Grain Using Pinch Technology. *Ind Eng Chem Res* **61**, 2195-2205. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c04410>

Modak JM, Vasan SS, Natarajan KA (1999) Calcium removal from bauxite using *Paenibacillus polymyxa*. *Mining Metall Explor* **16**, 6-12. <https://doi.org/10.1007/BF03403228>

Nakashimada Y, Kanai K, Nishio N (1998) Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2, 3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnol Lett* **20**, 1133-1138. <https://doi.org/10.1023/A:1005324403186>

National Center for Biotechnology Information (2022) PubChem Compound Summary for CID 262, 2,3-Butanediol. Retrieved December 27, 2022 Iz https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanediol.

Okonkwo C, Ujor V, Mishra P, Ezeji T, (2017). Process development for enhanced 2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Fermen* **3**, 18. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020018>

Prasad RK, Chatterjee S, Mazumder PB, Gupta SK, Sharma S, Vairale MG, Gupta DK (2019) Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. *Chemosph* **231**, 588-606. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.142

Roli NFM, Yussof HW, Seman MNA, Saufi SM, Mohammad AW (2016) Separating xylose from glucose using spiral wound nanofiltration membrane: effect of cross-flow parameters on sugar rejection. *IOP Conf Ser: Mat Sci Eng* **162**. doi:10.1088/1757-899X/162/1/012035

Singh SP, Prerna P. (2009) *Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors*. *Renew Sust Energ Rev* **13**, 1569–1575. doi:10.1016/j.rser.2008.08.006

Song CW, Park JM, Chung SC, Lee SY, Song H (2019) Microbial production of 2, 3-butanediol for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechn* **46**, 1583-1601. doi: 10.1007/s10295-019-02231-0

Syu MJ (2001) Biological production of 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnology* **55**, 10-18. doi: 10.1007/s002530000486

Tinoco D, Borschive, S, Coutinho PL, Freire DM (2021) Technological development of the bio-based 2, 3-butanediol process. *Biofuels, Bioprod Biorefin* **15**, 357-376. doi: 10.1007/s00449-022-02761-5

GS Caltex. 2022., Dostupno na: [https://www.gscaltex.com/downloadfile/2,3-ButaneDiol\(en\).pdf](https://www.gscaltex.com/downloadfile/2,3-ButaneDiol(en).pdf)
[pristupljeno 20. lipnja 2022.]

HMDB. 2022., Dostupno na: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003156> [pristupljeno 29. lipnja 2022.]

Merck. Dostupno na: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/23-Butanediol,MDA_CHEM-818801?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
[pristupljeno 21. lipnja 2022.]

7. PRILOZI

Prilog 7.1. Popis kratica uz navedene oznake, veličine i jedinice

| Oznaka veličine | Veličina | Jedinica |
|------------------------------|--|----------|
| GLC | Glukoza | - |
| XYL | Ksiloza | - |
| 2,3-BTD | 2,3-butandiol | - |
| EtOH | Etanol | - |
| OD | Optička gustoća | - |
| X | Biomasa | - |
| t | Vrijeme uzgoja | h |
| γ | Masena koncentracija | g/L |
| γ_{glukoza} | Masena koncentracija glukoze | g/L |
| γ_{ksiloza} | Masena koncentracija ksiloze | g/L |
| ΔS_{GLC} | Potrošnja glukoze | g/L |
| ΔS_{XYL} | Potrošnja ksiloze | g/L |
| $Y_{2,3\text{-BDL}}$ | Prinos 2,3-butandiola | g/L |
| Y_{Laktat} | Prinos mliječne kiseline | g/L |
| Y_{EtOH} | Prinos etanola | g/L |
| $Y_{2,3\text{-BDL/GLC+XYL}}$ | Koeficijent konverzije glukoze i ksiloze u 2,3-butandiol | g/g |
| $Pr_{2,3\text{-BDL}}$ | Produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola | g/Lh |

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja PETRA CESAR izjavljujem da je ovaj diplomski 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