

# Proizvodnja 2,3-butandiola u bioreaktoru s čvrstim slojem u uvjetima povećane inicijalne koncentracije octene kiseline

---

**Galović, Anita**

**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:159:586446>

*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

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Anita Galović

**PROIZVODNJA 2,3-BUTANDIOLA  
U BIOREAKTORU S ČVRSTIM  
SLOJEM U UVJETIMA  
POVEĆANE INICIJALNE  
KONCENTRACIJE OCTENE  
KISELINE**

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 izv. prof. dr. sc. Mladena Pavlečića.

*Veliko hvala mom mentoru izv. prof. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na uloženom vremenu, strpljenju i pruženoj pomoći tijekom izrade ovog rada. Bez Vaše susretljivosti i truda danas ne bih branila svoj diplomski rad.*

*Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel, izv. prof. dr. sc. Mariju Novaku i dr. sc. Nenadu Marđetku te svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade rada, ali i cijelog studiranja. Veliko hvala gospodinu Igoru Livadi na pomoći i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela.*

*Najljepše hvala voditelju studija prof. dr. sc. Božidaru Šanteku za svo preneseno teorijsko i praktično znanje te za razumijevanje, susretljivost i brižan odnos prema studentima.*

*Hvala mojoj divnoj obitelji na neizmjerne podršci koju su mi pružili tijekom studiranja. Hvala mojim roditeljima koji su uvijek bili puni razumijevanja i nesebičnosti te mojoj sestri koja je uvijek bila tu za mene u najtežim trenucima.*

*Hvala mojim kolegama i kolegicama koji su mi uvelike pomogli sa svladavanjem gradiva i koji su uvijek bili spremni pomoći.*

*Hvala mojim prijateljima koji su me uvijek podržavali i imali riječ utjehe u najtežim trenucima.*

# 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 U UVJETIMA POVEĆANE INICIJALNE KONCENTRACIJE OCTENE KISELINE

Anita Galović, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058213319

**Sažetak:** 2,3-butandiol (2,3-BTD) je organska molekula koja se zbog svojih svojstava može koristiti kao gorivo ili aditiv gorivu, a nema štetnih učinaka na okoliš poput fosilnih goriva. Može se proizvesti kemijskom sintezom ili uz pomoć određenih vrsta mikroorganizama. U ovom radu proučavana je mogućnost biotehnološke proizvodnje 2,3-BTD-a pomoću bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim hranjivim podlogama uz povećanu inicijalnu koncentraciju octene kiseline (10 g/L, 12 g/L i 15 g/L) te je praćen njen utjecaj na prinos 2,3-BTD-a. Nakon preliminarnog dijela istraživanja u tikvicama, u drugom dijelu izrade ovog diplomskog rada, proučavana je mogućnost proizvodnje 2,3-BTD-a uz pomoć navedenog mikroorganizma u bioreaktoru s čvrstim slojem pri čemu su kao nosač/sredstvo za imobilizaciju stanica korišteni aktivni ugljen te bukove strugotine. U tikvicama su ostvareni prinosi redom iznosili 0,4888 g/L, 0,2433 g/L i 0,1617 g/L što pokazuje negativan utjecaj povećanja koncentracije octene kiseline na prinos 2,3-BTD-a u ovom slučaju. Što se tiče eksperimenata u bioreaktoru s čvrstim slojem, najveći prinos postignut je na bukovim strugotinama gdje je inicijalna koncentracija octene kiseline iznosila 15 g/L i on je iznosio 2,9368 g/L. Najmanji prinos, s druge strane, dobiven je u eksperimentu s 10 g/L octene kiseline na aktivnom ugljenu te je iznosio 0,6154 g/L. Međutim, u odnosu na rezultate ostvarene u preliminarnom istraživanju, ovdje nije uočen negativan utjecaj povećane inicijalne koncentracije octene kiseline i maksimalne koncentracije 2,3-BTD-a ostvarene u eksperimentima. Na temelju rezultata ovog diplomskog rada može se zaključiti da se oba imobilizacijska sredstva mogu koristiti u biotehnološkoj proizvodnji 2,3-BTD-a te da su se, u smislu ostvarivanja boljih pokazatelja uspješnosti, bukove strugotine pokazale kao bolje imobilizacijsko sredstvo.

**Ključne riječi:** 2,3-butandiol, *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, octena kiselina, bioreaktor s čvrstim slojem

**Rad sadrži:** 44 stranice, 19 slika, 9 tablica, 21 literaturni navod, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Mladen Pavlečić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Mladen Pavlečić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

**Datum obrane:** 21. prosinca 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

PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL IN A FIXED-BED BIOREACTOR UNDER CONDITIONS OF INCREASED INITIAL ACETIC ACID CONCENTRATION

*Anita Galović*, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058213319

**Abstract:** 2,3-butanediol (2,3-BTD) is an organic molecule that, due to its properties, can be used as a fuel or a fuel additive, and has no harmful effects on the environment like fossil fuels. It can be produced by chemical synthesis or by using different types of microorganism. In this paper, the possibility of biotechnological production of 2,3-BTD using the bacterium *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 on chemically defined nutrient media with an increased initial concentration of acetic acid (10 g/L, 12 g/L and 15 g/L) and its influence on the yield of 2,3-BTD was studied. After preliminary part of the research in the flasks, in the second part of this thesis, the possibility of producing 2,3-BTD with the mentioned microorganism in a fixed-bed bioreactor was studied, where activated carbon and beech shavings were used as a carrier for cell immobilization. In the flasks, the yields were 0.4888 g/L, 0.2433 g/L and 0.1617 g/L, which shows the negative impact of increasing concentration of acetic acid on the yield of 2,3-BTD. Regarding the experiments in the fixed bed bioreactor, the highest yield was achieved on beech shavings where the initial concentration of acetic acid was 15 g/L and it was 2.9368 g/L. The lowest yield, on the other hand, was obtained in the experiment with 10 g/L acetic acid on activated carbon and was 0.6154 g/L. However, unlike the results achieved in the preliminary research, no negative influence of the increased initial concentration of acetic acid on the maximum concentration of 2,3-BTD achieved in the experiments was observed. Based on the results of this thesis, it can be concluded that both immobilization agents can be used in the biotechnological production of 2,3-BTD and that, in terms of achieving better performance indicators, beech shavings proved to be a better immobilization agent.

**Keywords:** 2,3-butanediol, *Paenibacillus polymyxa* DSM 742, acetic acid, fixed-bed bioreactor

**Thesis contains:** 44 pages, 25 figures, 9 tables, 22 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, Associate professor

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** December 21<sup>st</sup>, 2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	3
2.2. 2,3-BUTANDIOL .....	3
2.3. METABOLIČKI PUT SINTEZE 2,3-BUTANDIOLA.....	7
2.4. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA BIOTEHNOLOŠKU PROIZVODNJU 2,3-BUTANDIOLA .....	10
2.5. BIOREAKTOR S ČVRSTIM SLOJEM.....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>13</b>
3.1. MATERIJALI .....	13
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	13
3.1.2. Kemikalije i sirovine .....	13
3.1.3. Sastav hranjive podloge .....	14
3.1.3.1. <i>Kemijski definirane podloge</i> .....	14
3.1.4. Oprema.....	16
3.1.4.1. <i>Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)</i> ...	16
3.1.4.2. <i>Centrifuge</i> .....	16
3.1.4.3. <i>UV-Vis spektrofotometar</i> .....	16
3.1.4.4. <i>Ostala oprema</i> .....	17
3.2. METODE .....	17
3.2.1. Priprema čvrste podloge za održavanje radne kulture .....	17
3.2.2. Priprema otopine elemenata u tragovima.....	17
3.2.3. Priprema kemijski definirane hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 i podloge za uzgoj inokuluma .....	18
3.2.4. Priprema inokuluma za uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742.....	18
3.2.5. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 u tikvicama na tresilici .....	19
3.2.6. Uzgoj bakterije <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 742 na kemijski definiranoj podlozi u bioreктору s čvrstim nosačem.....	19
3.2.7. Analitičke metode .....	20
3.2.7.1. <i>Određivanje optičke gustoće</i> .....	20
3.2.7.2. <i>Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke             djelotvornosti</i> .....	21
3.2.7.3. <i>Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase imobilizirane u             eksperimentima s bioreaktorom s čvrstim slojem</i> .....	21
3.2.8. Proračun pokazatelja uspješnosti procesa .....	21



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
4.1. REZULTATI PRELIMINARNOG ISTRAŽIVANJA PROIZVODNJE 2,3-BTD-A U TIKVICAMA NA KEMIJSKI DEFINIRANIM PODLOGAMA KOD RAZLIČIH POČETNIH KONCENTRACIJA OCTENE KISELINE .....	24
4.2. REZULTATI UZGOJA BAKTERIJE <i>Paenibacillus Polymyxa</i> U BIOREAKTORU S ČVRSTIM SLOJEM PRI RAZLIČITIM INICIJALNIM KONCENTRACIJAMA OCTENE KISELINE I RAZLIČITIM IMOBILIZACIJSKIM SREDSTVIMA .....	32
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>39</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>41</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>44</b>

# 1. UVOD

S obzirom da su, s jedne strane, potrebe čovječanstva za energijom sve veće, a s druge strane rezerve fosilnih goriva sve su manje i njihova cijena visoka, uz dodatnu činjenicu da njihovo korištenje ima štetan učinak na okoliš zbog emisije stakleničkih plinova, sve se više razmatraju opcije proizvodnje nekonvencionalnih goriva (Ji i sur., 2011). Jedna takva vrsta kemikalije je 2,3-butandiol, koji se može koristiti kao gorivo, aditiv gorivu, ali može imati i niz drugih primjena (Maina i sur., 2021).

2,3-butandiol se trenutno proizvodi kemijskom sintezom iz naftnih derivata, no zbog visoke cijene proizvodnje i loših učinaka na okoliš istražuje se mikrobna proizvodnja iz obnovljivih izvora. No, s obzirom da mikrobna proizvodnja daje niske prinose, sve više pažnje se usmjerava razvoju strategija kako poboljšati pokazatelje uspješnosti bioprocasa. Da bi industrijska proizvodnja bila isplativa potrebno je omogućiti korištenje jeftine i lako dostupne sirovine kao što su npr. otpad prehrambene industrije i industrije biogoriva, odnosno lignocelulozne i necelulozne sirovine (Ji i sur., 2011). Što se tiče proizvodnog mikroorganizma, u proizvodnji 2,3-butandiola najčešće se koristi gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, neutrofilna, sporulirajuća, štapićasta bakterija *Paenibacillus polymyxa*. Može metabolizirati različite supstrate i proizvesti niz važnih bioaktivnih tvari te se može koristiti kao biognojivo (Langendries i Goormachtig, 2021; Daud i sur., 2019).

Tijekom izrade ovog diplomskog rada, u preliminarnom dijelu istraživanja, proučavan je uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranim hranjivim podlogama, u tikvicama s različitim početnim koncentracijama octene kiseline. Svi uzgoji provedeni u tikvicama na tresilici pri 30 °C i pri brzini okretaja tresilice od 125 o/min pri čemu je glavni izvor ugljika u podlogama bila glukoza. Ispitivan je rast bakterijske biomase te proizvodnja 2,3-BTD-a s tri različite početne koncentracije octene kiseline (10, 12 i 15 g/L) s ciljem utvrđivanja utjecaja na proizvodnju 2,3-butandiola. U drugom dijelu istraživanja proučavan je utjecaj različite početne koncentracije octene kiseline na proizvodnju 2,3-BTD-a u bioreaktoru s čvrstim slojem pri čemu su kao sredstvo za imobilizaciju bakterijskih stanica korišteni aktivni ugljen i bukove strugotine. U sklopu ovog dijela istraživanja provedena su četiri eksperimenta u kojima su korištene kemijski definirane hranjive podloge, s različitim početnim koncentracijama octene kiseline (10 i 15 g/L). Rezultati istraživanja pokazali su da je aktivni ugljen bolje vezao biomasu

odnosno pokazao se kao bolje imobilizacijsko sredstvo u odnosu na bukove strugotine, no s druge strane viši prinos 2,3-butandiola je postignut u eksperimentima s bukovim strugotinama. Prinosi 2,3-BTD-a su nešto niži kod niže inicijalne koncentracije octene kiseline (10 g/L) te iznose 0,6154 g/L za aktivni ugljen te 1,0502 g/L za bukove strugotine. Kod inicijalne koncentracije octene kiseline od 15 g/L, prinos za aktivni ugljen iznosi 1,6667 g/L, a za bukove strugotine 2,9368 g/L.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. *Paenibacillus polymyxa*

*Paenibacillus* je rod bakterija koji se vrlo često može pronaći u mikrobiomu tla, rizosferi i biljnom tkivu. Isto tako, može biti prisutna i u fermentiranoj hrani te morskim sedimentima. *Paenibacillus polymyxa* je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, neutrofilna, sporulirajuća, štapičasta bakterija s peritrihalnim flagelama (Langendries i Goormachtig, 2021). Može rasti na različitim supstratima te proizvoditi niz važnih bioaktivnih tvari i sekundarnih metabolita (Daud i sur., 2019), a između raznih tehnoloških primjena može se koristiti i kao biognojivo (Langendries i Goormachtig, 2021). Naime, ova vrsta može i poticati rast biljaka na način da veže atmosferski dušik, otapa fosfate i proizvodi fitohormone te na taj način potiče njihov rast. Pokazalo se da *P. polymyxa* može i proizvoditi razne korisne bioaktivne tvari poput antibiotika (polimiksin) te antifungicidnih spojeva (fusaricidin) koji inhibiraju rast patogena (Daud i sur., 2019; Padda i sur., 2017).

Nadalje, neki sojevi pokazali su se i kao dobri proizvođači enzima koji mogu razgraditi staničnu stijenku biljaka (celulaze, kitinaze, ksilanaze, proteaze,  $\beta$ -1,3-glukanaze i  $\beta$ -glukozidaze). Neki od ovih enzima pronašli su primjenu u prehrambenoj industriji, kožarskoj industriji, gospodarenju otpadom, kemijskoj sintezi i u proizvodnji detergenata, a mikrobnim egzopolisaharidima mogu se koristiti u uklanjanju metalnih iona iz otpadnih tokova te u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Langendries i Goormachtig, 2021). Od ostale važnije industrijske primjene ove bakterije bitno je spomenuti proizvodnju optički aktivnog 2,3-butandiola (Langendries i Goormachtig, 2021).

### 2.2. 2,3-BUTANDIOL

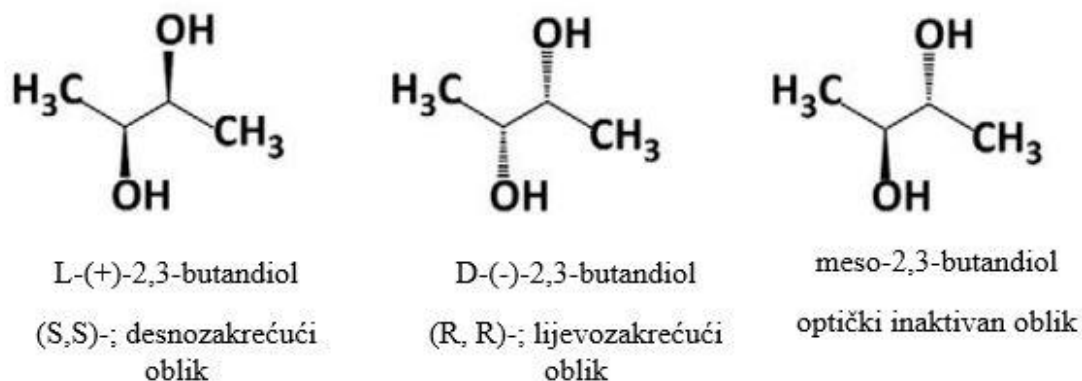
2,3-butandiol (2,3-BTD) je poznat i pod nazivima 2,3-dihidroksibutan, dimetil-etilen glikol i 2,3-butilen-glikol. Ima dvije hidroksilne skupine vezane na alifatski lanac pa pripada skupini alkohola, odnosno diola. S obzirom da ima hidroksilnu skupinu vezanu na drugom i trećem ugljikovom atomu, pripada skupini sekundarnih alkohola ili glikola (Tinôco i sur., 2021). Kemijska formula je  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , a molekulska masa iznosi 90,12 Da. Ima visoku točku vrelišta koja je 180-184 °C, a točka ledišta mu je -60 °C. Pojavljuje se u obliku tekućine bez boje i mirisa ili u kristaliničnom obliku (Syu, 2001). Fizikalno-kemijska svojstva 2,3-BTD-

a prikazana su u tablici 1 (Tinôco i sur., 2021).

**Tablica 1.** Fizikalno-kemijska svojstva 2,3-BTD-a (prema Tinôco i sur., 2021)

Svojstvo	Opis
Opća klasifikacija	Bez boje i mirisa, velika viskoznost
Molekulska formula	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
Molekulska masa [g mol <sup>-1</sup> ]	90,12
Temperatura tališta [° C]	-60 ( <i>levo</i> i <i>dextro</i> ), 33-34,5 ( <i>meso</i> )
Temperatura vrelišta [° C]	177-182
Toplina izgaranja [kJ g <sup>-1</sup> ]	27,2
Oktanski broj	Visok
Biorazgradivost	Da

Postoje 3 stereoizomera 2,3-butandiola, a to su dekstro- [L-(+)-] i levo-[D-(-)-] oblici koji su optički aktivni i optički neaktivan -mezo oblik (Song i sur., 2019; Ji i sur., 2011; Syu, 2001), a čije su strukturne formule prikazane na slici 1. Koji će se stereoizomer proizvesti, ovisi o korištenom mikroorganizmu, a najčešće nastane mješavina dvaju stereoizomera (Ji i sur., 2011). *P. polymyxa* može proizvesti čisti (R,R)-2,3-BD (D-(-)-) izomer (Ji i sur., 2011; Syu, 2001).



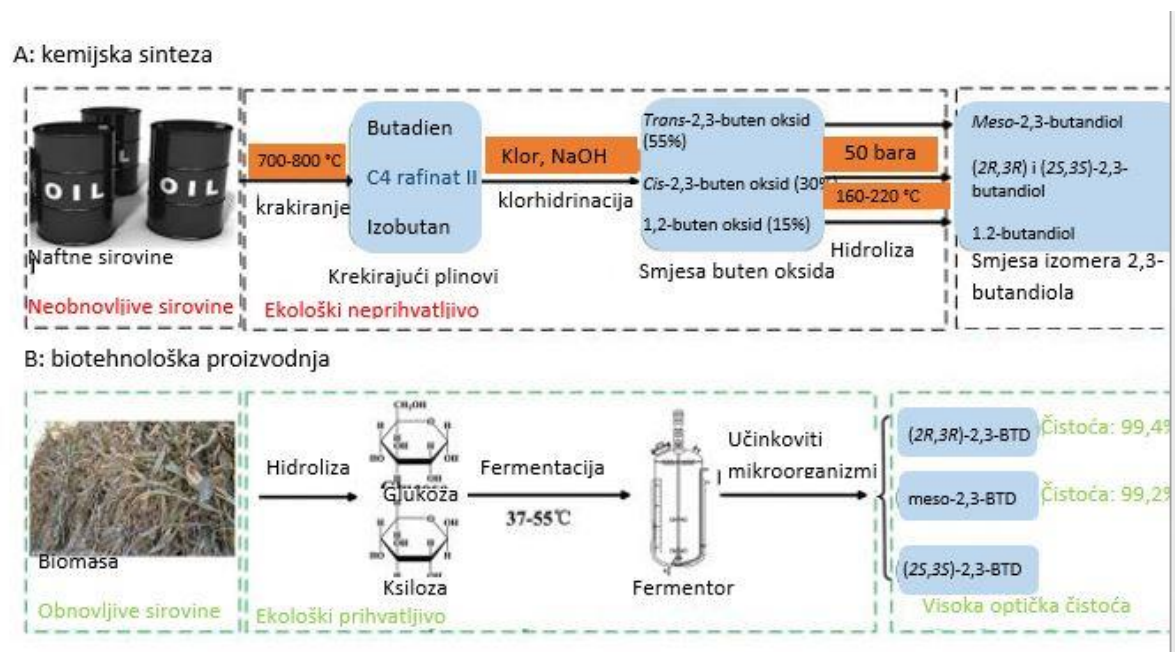
**Slika 1.** Stereoizomeri 2,3-butandiola (prema Ji i sur., 2011)

2,3-butandiol ima vrlo visoku ogrjevnu vrijednost i sposobnost povećanja oktanskog broja. Može se pretvoriti u metil-etil keton (MEK) koji je učinkovit aditiv za tekuće gorivo. Nakon

kombinacije s MEK-om i reakcije hidrogenacije, 2,3-butandiol se prevodi u oktan koji se koristi kao visokokvalitetno zrakoplovno gorivo. U industrijskom mjerilu se proizvodi kemijskim metodama (Białkowska, 2016).

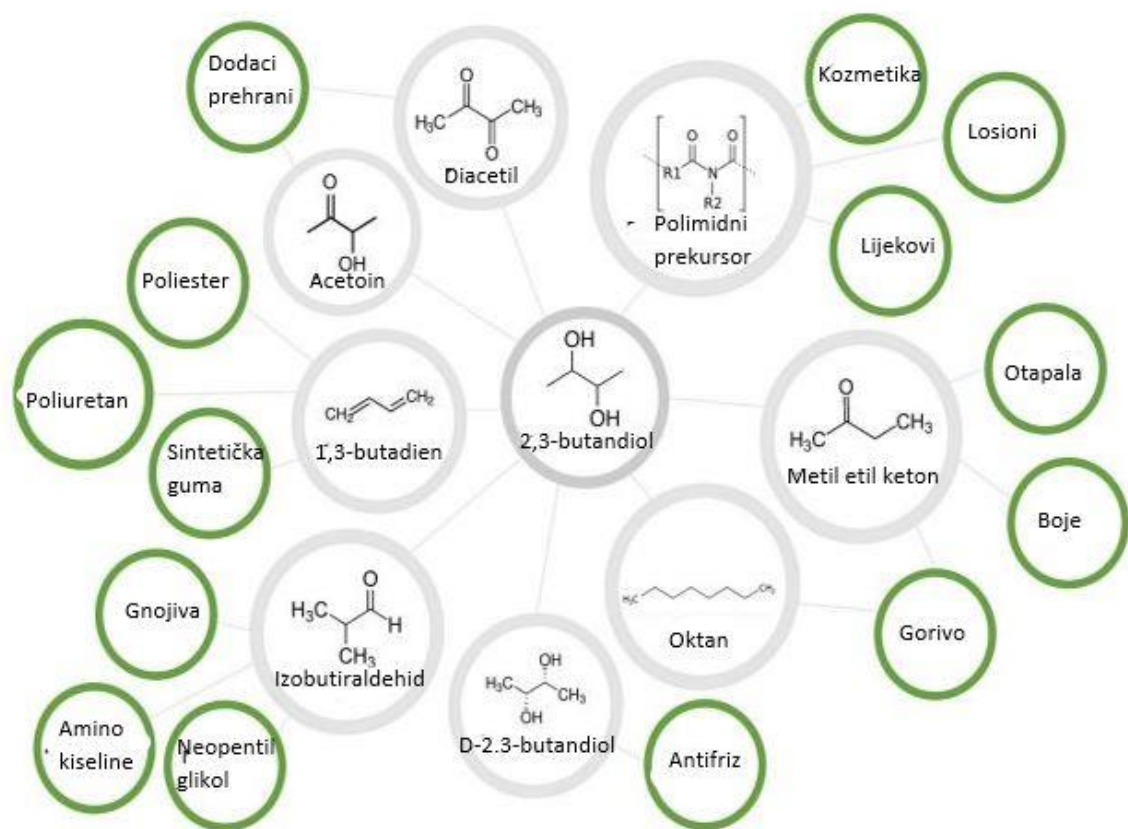
Industrijska proizvodnja 2,3-butandiola uključuje pirolizu diacetata pri čemu su glavna sirovina za proizvodnju buteni dobiveni iz "crack" plinova. Ovaj proces rezultira u konačnici nastankom smjese buten oksida sljedećeg sastava: 55 % *trans*-2,3-buten oksida, 30 % *cis*-2,3-buten oksida i 15 % 1,2-buten oksid. Dodatnom hidrolizom smjese pri 50 bara i 160-220 °C ( $\Delta H = -42$  kJ/mol) nastaje smjesa 2,3-butandiol izomera koji se mogu odvojiti frakcioniranjem u vakuumu. Iz *trans*-2-butena preko *trans*-2,3-buten oksida nastaje meso-2,3-butandiol, a iz *cis*-2-butena preko *cis*-2,3-buten oksida nastaje racemična smjesa L-2,3-butandiola i D-2,3-butandiola. Visoka potrošnja energije i skupi katalizatori čine ovaj proces vrlo skupim pa nema široku primjenu u industriji (Maina i sur., 2021).

Što se tiče mikrobne proizvodnje, u usporedbi s prethodno navedenom kemijskom, ona je jeftinija i bolja za okoliš (slika 2). Također, iscrpljivanje rezervi fosilnih goriva i težnja ka smanjenju emisija CO<sub>2</sub>, dodatni su razlozi za razvoj ekološki prihvatljivih metoda za proizvodnju kemikalija (Ge i sur., 2016). Problem mikrobne proizvodnje su niski prinosi, a to se pokušava riješiti primjenom nekoliko strategija. Odabir učinkovitih mikroorganizama, korištenje isplativih supstrata te genetske modifikacije mikroorganizama neke su od mogućnosti. U slučaju korištenja tehnika genetičkog inženjerstva, moguće je dobivanje rekombinantne DNA s ciljem overekspresije gena uključenih u biosintezu diola i supresiju gena kompetitivnih puteva s ciljem smanjenja neželjenih proizvoda kao što su: etanol, laktat, acetat i acetoin (Białkowska, 2016). Dakle, potrebno je povećati prinos 2,3-butandiola uz smanjenje proizvodnje nusproizvoda (etanol, acetin, laktat i octena kiselina) jer oni inhibiraju proizvodnju 2,3-butandiola, smanjuju prinos te povećavaju troškove pročišćavanja proizvoda (Ji i sur., 2011). Cijela priča oko proizvodnje 2,3-BTD-a u većem mjerilu može biti dodatno potaknuta biorafinerijskim pristupom gdje se onda u takvim postrojenjima iz obnovljivih izvora mogu dobiti energija, gorivo i ostale kemikalije (Ji i sur., 2011).



**Slika 2.** Usporedba kemijske sinteze i biotehnološke proizvodnje 2,3-butandiola (prema Ge i sur., 2016)

Osim samog 2,3-BTD-a, primjenu su pronašli i neki od njegovih derivata (slika 3) (Langendries i Goormachtig 2021; Ji i sur., 2011).



**Slika 3.** Derivati 2,3-butandiola i njihova primjena (prema Maina i sur., 2021)

### 2.3. METABOLIČKI PUT SINTEZE 2,3-BUTANDIOLA

Iako mnogo mikroorganizama može akumulirati 2,3-butandiol, samo je nekoliko onih koji to mogu u značajnim koncentracijama, a to su bakterije iz rodova *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* i *Serratia* (Ji i sur., 2011).

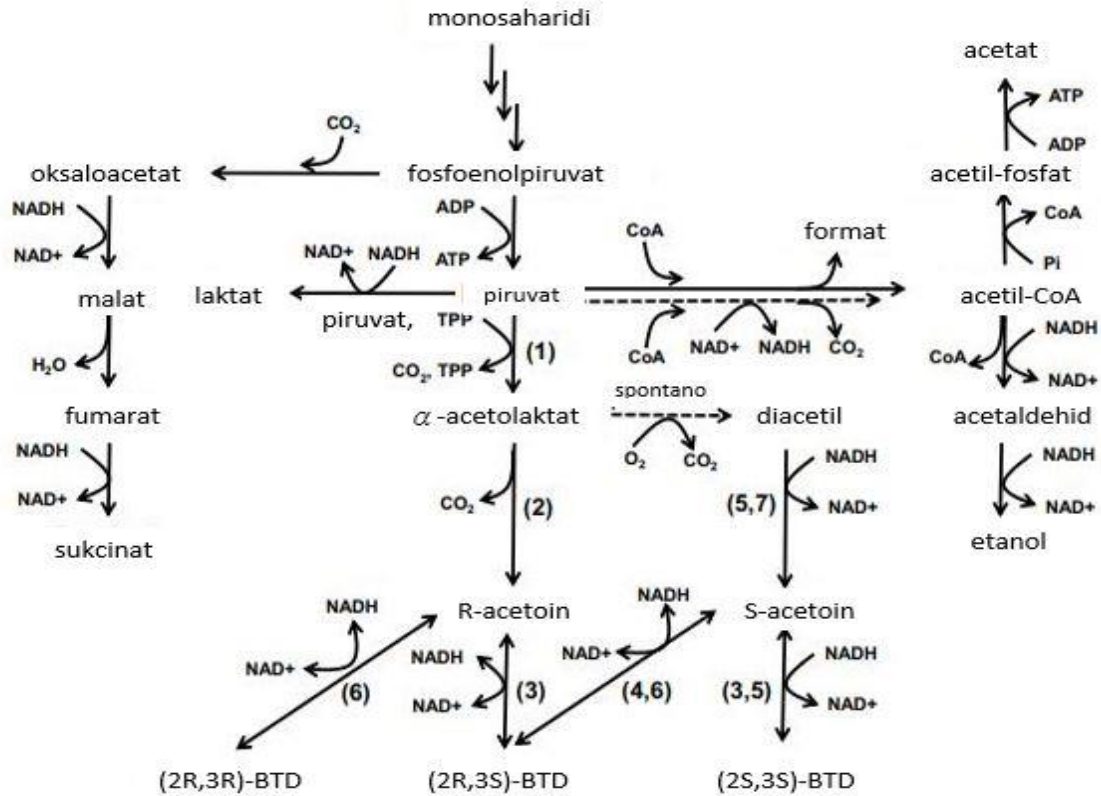
Navedena bakterija *Paenibacillus polymyxa*, koja također proizvodi 2,3-BTD, zanimljiva je i zbog činjenice da može koristiti i pentoze i heksoze za njegovu proizvodnju (Ji i sur., 2011). Ključan intermedijer u proizvodnji 2,3-butandiola je piruvat koji se u slučaju kada je izvor ugljika heksoza, dobiva glikolizom, a u slučaju pentoza kombinacijom pentozafosfatnog puta i glikolize. Nadalje, od ostalih glavnih produkata metabolizma bitni su za spomenuti: acetat, format, sukcinat, laktat, etanol i acetoin.  $\alpha$ -acetolaktat sintaza (ALS, EC 4.1.3.18),  $\alpha$ -acetolaktat dekarboksilaza (ALDC, EC 4.1.1.5) i 2,3-BD dehidrogenaza (BDH, EC 1.1.1.76) koji su ključni enzimi u proizvodnji 2,3-butandiola. Optimalna pH vrijednost za aktivnost enzima ALS je 6, a reakcija se provodi u 2 stupnja. U prvom stupnju molekula piruvata stvara kompleks s



molekulom tiamin pirofosfata (TPP) te nastaje acetil-TPP, dok u drugom stupnju acetil-TPP kondenzira s drugom molekulom piruvata i nastaje  $\alpha$ -acetolaktat (Ji i sur., 2011).

U aerobnim uvjetima se enzim ALS nepovratno i brzo inaktivira i prestaje proizvodnja 2,3-butandiola. U slučaju kada uvjeti nisu potpuno aerobni, aktivni su enzimi laktat dehidrogenaza (EC 1.1.1.27), piruvat-format liaza (EC 2.3.1.54) i ALS te nastaju laktat, formijat i 2,3-butandiol. Formijat se može dalje prevesti u ugljični dioksid i vodik djelovanjem enzima format-vodik liaza koja je inhibirana u aerobnim uvjetima i u prisutnosti nitrata u anaerobnim uvjetima (Ji i sur., 2011).

Piruvat nastao u glikolizi se dekarboksilacijom prevodi u  $\alpha$ -acetolaktat, a tu reakciju katalizira enzim  $\alpha$ -acetolaktat sintaza.  $\alpha$ -acetolaktat dekarboksilaza potom katalizira reakciju konverzije  $\alpha$ -acetolaktata u R-acetoin, u anaerobnim uvjetima. Kao posljedica nestabilnosti u aerobnim uvjetima nastaju i male koncentracije diacetila u spontanijama. Diacetil se reducira u S-acetoin pomoću enzima butandiol dehidrogenaze ili diacetil reduktaze uz utrošak jednog ekvivalenta NADH-a. Iz R- i S-acetoina nastaju 3 tipa stereoizomera, a što je određeno stereospecifičnim terminacijskim enzimima butandiol dehidrogenazom i acetoin reduktazom. Pretvorba acetoina u 2,3-butandiol je reverzibilna. Metabolički put sinteze 2,3-BTD-a prikazan je na slici 4 (Song i sur., 2019).



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

U tablici 2 prikazani su neki od mikroorganizama koji imaju mogućnost proizvodnje 2,3-butandiola (Celińska i Grajek, 2009).

**Tablica 2.** Mikroorganizmi producenti 2,3-butandiola i izomeri koje proizvode (Celińska i Grajek, 2009)

Mikroorganizam	L(+)-	D(-)-	meso-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+
<i>E. aerogenes</i>	+	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	+	+

## 2.4. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA BIOTEHNOLOŠKU PROIZVODNJU 2,3-BUTANDIOLA

Neki od bitnijih parametara uzgoja koji utječu na proizvodnju 2,3-butandiola i nusprodukata su početna koncentracija glukoze, aeracija, pH podloge te izvor ugljika (Song i sur., 2019; Syu, 2001). Dziewulski i sur. (1986) pokazali su u svojem istraživanju da je tokom šaržnog uzgoja s odgovarajućom aeracijom povećana proizvodnja 2,3-BTD-a, a u uvjetima niske koncentracije kisika u podlozi ne dolazi do njegove proizvodnje, nego se glavina izvora ugljika prevodi u druge produkte metabolizma (Häbler i sur., 2012; Dziewulski i sur., 1986). Pokazalo se da se pojačanom aeracijom potiče proizvodnja 2,3-BTD-a na način da se povećava sinteza njegova prekursora acetoina (Häbler i sur., 2012). U konačnici, omjer proizvedenog acetoina i 2,3-BTD-a i nusproizvoda poput etanola, acetata i laktata uvelike ovisi o dostupnosti kisika. Nadalje, pH vrijednost podloge također je važan parametar tokom fermentacije koji utječe na sastav biomase i na metabolizam stanica. S obzirom da je *P. polymyxa* neutrofil, optimalna vrijednost podloge za njenu kultivaciju kreće se u rasponu između 6 i 8 pH jedinica. pH vrijednosti podloge iznad 6,3-6,5 pogoduju nastanku organskih kiselina te se smanjuje proizvodnja 2,3-BTD-a. S druge strane, pri kiselom pH se smanjuje proizvodnja organskih kiselina za 10 puta, a povećava proizvodnja diola za 3,7 puta (Garg i Jaim, 1995). Inače, proizvodnja 2,3-butandiola ima važno fiziološko značenje za mikroorganizme. Osim što se pomoću njegove sinteze regulira unutarstanični omjer NADH/NAD<sup>+</sup>, 2,3-BTD može poslužiti i kao rezervni izvor energije za samu stanicu u slučaju nepovoljnih uvjeta, a ujedno i sprječava prekomjerno zakiseljavanje citosola (Song i sur., 2019; Ji i sur., 2011). Octena kiselina, kao jedan od mogućih produkata metabolizma bakterije *Paenibacillus polymyxa*, također može pozitivno utjecati na proizvodnju 2,3-BTD-a na način da djeluje kao induktor tri enzima koji sudjeluju u pretvorbi piruvata u 2,3-butandiol. Ovdje je bitno napomenuti da pri tome pH vrijednost podloge ima velik utjecaj pri čemu viša pH vrijednost utječe na veći udio disociranog oblika kiseline pri čemu disocirana forma pozitivno utječe na sintezu enzima ALS-a i time povećanje učinkovitosti konverzije piruvata u 2,3-butandiol (Ji i sur., 2011; Syu, 2001). Također, u nekim se istraživanjima pokazalo da prekomjerna količina octene kiseline u podlozi može negativno utjecati na rast stanica, a time i na samu proizvodnju 2,3-BTD-a (Celińska i Grajek, 2009).

Što se tiče optimalne temperature za proizvodnju 2,3-BTD-a, ona se kreće između 30 i 35 °C, a ovisi o bakterijskom soju (Celinska i Grajek, 2009; Garg i Jain, 1995).

Dodatan faktor koji može utjecati na rast stanica i proizvodnju su vrsta supstrata i njegova koncentracija. Naime, u biotehnološkoj proizvodnji sve se češće koriste obnovljivi izvori međutim problem je kod korištenja, npr. hidrolizata drva, količina inhibitora koji se nalaze u podlozi kao posljedica predtretmana same sirovine te se koncentracije supstrata u tom slučaju kreću u rasponu od 5-10 % m/V. U kemijski definiranim hranjivim podlogama, s druge strane, ako je izvor ugljika glukoza, pokazalo se da njihova inicijalna koncentracija može biti i do 150 g/L bez nekog značajnijeg negativnog utjecaja na proizvodnju (Celinska i Grajek, 2009).

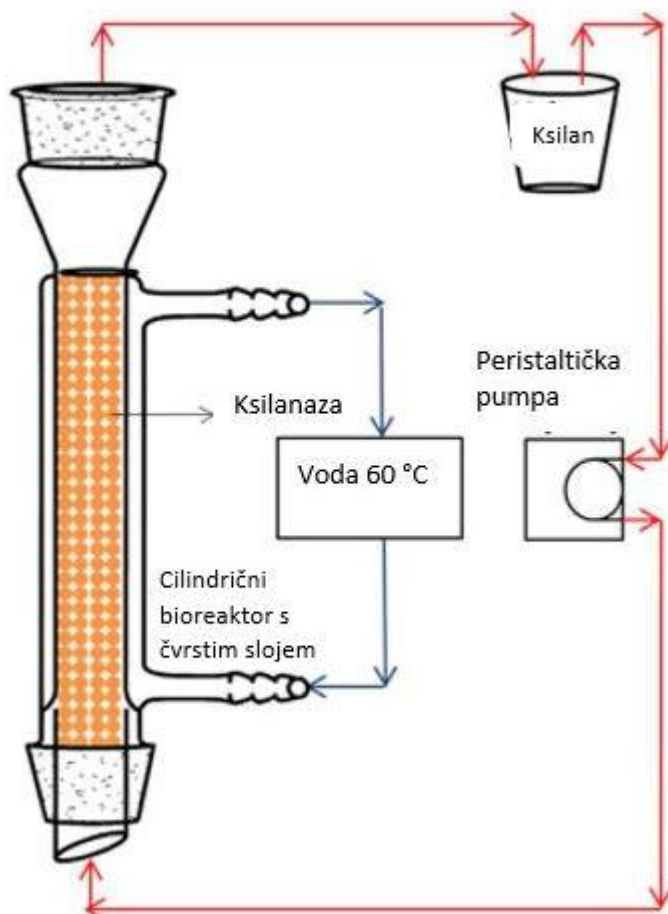
## **2.5. BIOREAKTOR S ČVRSTIM SLOJEM**

Bioreaktor s čvrstim slojem podrazumijeva bioreaktor oblika cijevi ili cilindra koji je ispunjen potpornim materijalom na koji se imobiliziraju stanice (slika 5) (Riitonen i sur., 2013). Važni čimbenici koji utječu na aktivnost imobiliziranih stanica su kemijski sastav, dodirna površina te fizikalna svojstva nosača (Jüntgen, 1986). Kod ove vrste bioreaktora u biti dolazi do stvaranja biofilma koji je vezan za površinu imobilizacijskog sredstva te stanice ne cirkuliraju slobodno kroz takav sustav. Što se tiče uvođenja same podloge i načina njenog strujanja, postoje tri načina, a to su da se podloga uvodi s donje ili gornje strane bioreaktora te također postoji opcija da se u takvom sustavu vrši tzv. recikliranje biomase, što omogućuje regeneraciju biofilma biomase u slučaju njenog ispiranja ili odumiranja.

Sredstva za imobilizaciju koja se koriste u ovakvim sustavima moraju imati određena svojstva a to znači da moraju biti kemijski inertni, moraju posjedovati određena mehanička svojstva (otpornost na habanje, tvrdoću, tlačnu čvrstoću, pokazivati otpor tečenju u čvrstom sloju), zatim moraju pokazivati stabilnost u reakcijskim uvjetima, imati određenu poroznost (prosječna veličina pora, distribucija radijusa pora) i veliku specifičnu površinu (Jüntgen, 1986).

Bioreaktori s čvrstim slojem imaju vrlo široku primjenu u industriji (Atmakidis i Kenig, 2014) pri čemu se kontinuirani bioreaktor s čvrstim slojem najčešće koristi za imobilizaciju enzima i mikrobnih stanica (Riitonen i sur., 2013). Osim navedenog, mogu se koristiti i u proizvodnji kemikalija te za uklanjanje štetnih ili otrovnih kemikalija iz plinova ili tekućina (Atmakidis i Kenig, 2014). Velika prednost ovakvih sustava jest niska cijena izgradnje i održavanja. Također, u ovakvim sustavima moguće je ostvariti dobar kontakt između supstrata i katalizatora (ili mikrobnih stanica) što pozitivno utječe na visoku stopu konverzije i pokazatelje uspješnosti. S obzirom da se u ovakvim sustavima radi s nižim protocima podloge neki od nedostataka su

otežana kontrola temperature te posljedično pojava temperaturnog gradijenta kroz visinu čvrstog sloja (Catalano i sur., 2023). Ponekad, zbog gustoće pakiranja nosača, pretjeranog rasta stanica ili viška hranjivih tvari može doći začepljenja i posljedično porasta tlaka u sustavu te je zbog toga vrlo važno točno procijeniti vremena zadržavanja, prijenos mase i topline kako bi se dobio optimalan dizajn (Atmakidis i Kenig, 2014).



**Slika 5.** Primjer bioreaktora s čvrstim slojem (prema Sen i sur., 2017)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

U svim provedenim eksperimenta 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 koje su korištene za provedbu eksperimentalnog dijela su nabrojane u tablici.

**Tablica 3.** Popis korištenih kemikalija

<b>Kemikalija</b>	<b>Stupanj čistoće</b>	<b>Proizvođač</b>
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
Kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
Magnezijev sulfat heptahidrat	> 99 %	LACH NER d.o.o., Češka

**Tablica 3.** Popis korištenih kemikalija-nastavak

<b>Kemikalija</b>	<b>Stupanj čistoće</b>	<b>Proizvođač</b>
Magnezijev klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
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
Sumporna kiselina	96%	Merck KgaA, Njemačka
Tripton	za upotrebu u biotehnologiji	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 isključivo kemijski definirane podloge koje su se koristile za pripremu podloga za održavanje radne kulture, pripremu inokoluma i uzgoje koji su provedeni u tikvicama i bioreктору s čvrstim slojem.

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

Sastav podloge za pripremu inokuluma je prikazan u tablici 5. Kao izvor ugljika korištena je glukoza u koncentraciji 15 g/L.

Podloge koje su korištene u preliminarnom istraživanju su se razlikovale prema početnoj koncentraciji octene kiseline (10, 12 i 15 g/L) s ciljem ispitivanja njenog utjecaja na rast bakterijske biomase i proizvodnju 2,3-BTD-a. Osim izvora ugljika i octene kiseline sve podloge su sadržavale jednaku koncentraciju otopine elemenata u tragovima čiji je sastav naveden u tablici 6. Što se tiče eksperimenata u bioreктору s čvrstim slojem podloge koje su korištene u tim eksperimentima samo su se razlikovale u početnim koncentracijama octene kiseline (10 i 15 g/L) te sredstvu koje se koristilo za imobilizaciju bakterijske biomase (bukove strugotine ili aktivni ugljen).

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

<b>Kemikalija</b>	<b>Masena koncentracija <math>\gamma</math> [g/L]</b>
Glukoza	1
Tripton	5
Mesni ekstrakt	3
Agar	15

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

<b>Kemikalija</b>	<b>Masena koncentracija <math>\gamma</math> [g/L]</b>		
Glukoza	15,00		
Octena kiselina	10,00	12,00	15,00
Kvašćev ekstrakt	4,00		
Tripton	5,00		
Magnezijev sulfat heptahidrat	0,20		
Kalijev dihidrogenfosfat	3,50		
Kalijev hidrogenfosfat	2,50		
Amonijev acetat	5,00		
Amonijev sulfat	4,00		

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

<b>Tvar</b>	<b><math>\gamma</math> [g/L]</b>
Željezov sulfat heptahidrat	2,500
Natrijev molibdat dihidrat	2,100
Manganov (II) klorid	1,800
Kobaltov klorid heksahidrat	0,075
Bakrov sulfat pentahidrat	0,031



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

<b>Tvar</b>	<b><math>\gamma</math> [g/L]</b>
Borna kiselina	0,258
Natrijev molibdat dihidrat	0,023
Cinkov klorid	0,021

#### 3.1.4. Oprema

##### 3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Uzorci koji su dobiveni tijekom eksperimentalnog rada su analizirani tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti. Korišten je UPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD. Sastavni dijelovi uređaja su: crpka (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivač (G7129B 1290 Vialsampler), pećnica, analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalni program za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka je iznosio 10  $\mu$ L, a protok mobilne faze 0,6 mL/min.

##### 3.1.4.2. Centrifuge

Tijekom pripreme uzoraka za kromatografsku analizu (UPLC) je korištena centrifuga „CF-10“ (Witeg, Njemačka).

##### 3.1.4.3. UV-Vis spektrofotometar

U ovom istraživanju je korišten Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent, Technologies, SAD). Određivana je optička gustoća uzoraka hranjivih podloga pri 600 nm kao indirektni pokazatelj rasta bakterijske biomase.

#### 3.1.4.4. Ostala oprema

Za vaganje kemikalija i određivanje suhe tvari biomase je korištena analitička vaga Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA (Japan). Za vaganje sirovina je korištena tehnička vaga Tehnica ET-1211 (Tehntnica Železniki, Slovenija). Zamrzivač tvrtke Gorenje (Slovenija) je korišten za pohranu uzoraka. Uzgoj u tikvicama je proveden na tresilici RM 71 (B. Braun Biotechn International, Sartorius group, Njemačka).

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema čvrste podloge za održavanje radne kulture

Čvrsta podloga za održavanje radne kulture pripravljena je na način da je u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL dodana mala količina demineralizirane vode te je otopljeno 0,2 g glukoze, 1 g triptona, 0,6 g mesnog ekstrakta i 3 g agara na magnetskoj miješalici (tablica 4). Zatim je u tikvicu dodana demineralizirana voda tako da je konačni volumen iznosio 200 mL. Tikvica u kojoj je podloga je začepljena vatenim čepom i sterilizirana u autoklavu pri 121 °C 20 minuta. Nakon završetka sterilizacije, podloga je izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se ohladi.

#### 3.2.2. Priprema otopine elemenata u tragovima

Otopina elemenata u tragovima je pripravljena na način da su u maloj količini demineralizirane vode na magnetnoj miješalici otopljeni sljedeći sastojci: 1,25 g željezovog sulfata heptahidrata, 1,05 g natrijevog molibdata dihidrata, 0,9 g manganovog (II) klorid tetrahidrata, 0,0375 g kobaltovog klorid heksahidrata, 0,0155 g bakrovog sulfata pentahidrata, 0,129 g borne kiseline, 0,0115 g natrijevog molibdata dihidrata i 0,0105 g cinkovog klorida. Potom je dodano demineralizirane vode tako da je konačni volumen otopine iznosio 500 mL. Izuzeto je 50 mL otopine i filtrirano preko mikrobiološkog filtera (0,2 µm, Sartorius) i potom prebačeno u Eppendorf kivetu i čuvano u zamrzivaču. Za potrebe pripreme podloga otopina elemenata u tragovima je korištena nakon što je prethodno bila otopljena.

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

Podloga za uzgoj inokuluma je pripremljena na način da su u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL u maloj količini demineralizirane vode na magnetnoj miješalici otopljeni sljedeći sastojci: 0,3 g glukoze, 0,08 g kvašćevog ekstrakta, 1 g triptona, 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. Tikvica je nadopunjena vodom tako da je konačni volumen iznosio 20 mL. U Erlenmeyerovoj tikvici od 300 mL u maloj količini demineralizirane vode na magnetnoj miješalici su otopljeni sljedeći sastojci: 1,5 g glukoze, 0,4 g kvašćevog ekstrakta, 0,5 g triptona, 0,02 g magnezijevog sulfata heptahidrata, 0,35 g kalijevog dihidrogenfosfata, 0,25 g kalijevog hidrogenfosfata, 0,5 g amonijevog acetata i 0,4 g amonijevog sulfata. Tikvica je nadopunjena vodom tako da je konačni volumen iznosio 100 mL. Tikvice su začepljene vatenim čepom i stavljene na sterilizaciju u autoklav na 121 °C kroz 20 minuta. Nakon što su tikvice ohlađene na sobnu temperaturu dodana je otopina elemenata u tragovima u koncentraciji 3 mL/L, odnosno u tikvicu od 100 mL je dodano 60 µL otopine, a u tikvicu od 300 mL je dodano 300 µL otopine.

Za preliminarni dio istraživanja pripremljene su tri tikvice istog sastava čije su koncentracije navedene u tablici 5. Zasebno je u tri Erlenmeyerove tikvice od 500 mL u maloj količini demineralizirane vode na magnetnoj miješalici otopljeno 3 g glukoze, 0,8 g kvašćevog ekstrakta, 1 g triptona, 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. Zatim su tikvice dopunjene demineraliziranom vodom tako da je ukupni volumen iznosio 200 mL. Tikvice su začepljene vatenim čepom i sterilizirane u autoklavu na 121 °C kroz 20 minuta. Nakon sterilizacije su tikvice ohlađene na sobnu temperaturu te je u svaku tikvicu dodano 3 mL/L, tj. 0,06 mL otopine elemenata u tragovima. Nakon inokulacije koncentracije octene kiseline podešene su na vrijednosti od 10, 12 i 15 g/L.

### 3.2.4. Priprema inokuluma za uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742

Kultura s čvrste podloge u Petrijevoj zdjelici je prenesena pomoću eze u epruvetu s 10 mL

sterilne vode te su stanice resuspendirane. Potom je sadržaj epruvete prebačen u tikvicu od 100 mL koja je sadržavala 20 mL podloge koja je pripravljena na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3.. Tikvica je ostavljena na tresilici na 30 °C preko noći. Idući dan je 10 mL iz te tikvice prebačeno u Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL koja je sadržavala 100 mL sterilne hranjive podloge istog sastava. Tikvica je ostavljena preko noći na tresilici na 30 °C. Nakon 24 h je sadržaj te veće tikvice korišten za inokulaciju podloge za preliminarni dio istraživanja.

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

Tri tikvice koje su sadržavale 200 mL podloge pripravljene na način opisan u poglavlju 3.2.3. inokulirane su s 20 mL prethodno pripravljenog inokuluma. Tikvice su potom stavljene na tresilicu (125 o/min) na 30 °C. Svaka dva sata su izuzimani sterilni uzorci iz svih tikvica s ciljem praćenja eksperimenta pri čemu je volumen izuzetih uzoraka iznosio 3 mL. Tijekom ovog istraživanja je praćena promjena optičke gustoće uzoraka pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Sastav svih uzoraka je određen UPLC analizom.

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

Nakon završenog preliminarnog dijela provedeno je eksperimentalno istraživanje mogućnosti korištenja bioreaktora s čvrstim slojem u biotehnoškoj proizvodnji 2,3-BTD-a. U ovom dijelu proučavan je utjecaj različite početne koncentracije octene kiseline na dinamiku proizvodnje 2,3-BTD-a te mogućnost korištenja različitih sredstava za imobilizaciju (bukove strugotine i aktivni ugljen) bakterijskih stanica *P. polymyxa*. Bioreaktor s čvrstim slojem je staklena kolona duljine 69,5 cm i promjera 5 cm. Kako bi se spriječilo propadanje čvrstog sloja aktivnog ugljena, odnosno bukovih strugotina, u kolonu su nasute staklene kuglice (mase 77,004 g) čija je visina 2,8 cm. Na kuglice su potom bili nasuti aktivni ugljen (257 g), odnosno bukove strugotine (59,2 g) te je na vrh čvrstog sloja stavljen porozan čep kako ne bi došlo do formiranja fluidiziranog sloja. Regulacija temperature u bioreaktoru omogućena je korištenjem gumenog crijeva koje je bilo omotano po cijeloj površini s vanjske strane staklene kolone kroz koje je cirkulirala termostatirana voda temperature 30 °C uz pomoć peristaltičke pumpe. Prije same imobilizacije stanica radnog mikroorganizma provedena je kemijska sterilizacija sustava na način da je kroz

kolonu i plastične cijevi za cirkulaciju podloge upumpana 1 L (u eksperimentima s aktivnim ugljenom), odnosno 1,2 L (u eksperimentima s bukovim strugotinama) 10 %-tne octene kiseline protokom 0,6 L/h tokom 2 sata. Nakon provedene kemijske sterilizacije, cijeli sustav je dodatno ispran s 10 L demineralizirane sterilne vode pri protoku od 2,17 L/h. Na ovaj način osiguralo se ispiranje zaostale octene kiseline i osiguravanje adekvatne pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje 2,3-BTD-a. Nakon kemijske sterilizacije pristupilo se procesu imobilizacije stanica radnog mikroorganizma na čvrsti nosač na način da je 700 mL (aktivni ugljen), odnosno 1000 mL (bukove strugotine) prethodno pripremljenog inokuluma cirkuliralo kroz kolonu i čvrsti sloj tokom 24 sata, te je drugi dan suvišak inokuluma uklonjen iz sustava. Nakon uspješne imobilizacije u sustav je dodano 700 mL (aktivni ugljen), odnosno 1000 mL svježije hranjive podloge koja je sadržavala određenu koncentraciju octene kiseline (10 ili 15 g/L). Brzina protoka podloge je namještena na najmanju moguću vrijednost (0,55 L/h) da bi se spriječilo eventualno ispiranje biomase. Ukupno su provedena četiri eksperimenta; dva s bukovim strugotinama i dva s aktivnim ugljenom kod različitih početnih koncentracija octene kiseline. Tijekom sva četiri eksperimenta je praćen uzimanjem uzoraka iz bioreaktora na posebnom mjestu za uzorkovanje pri čemu su uzorci izuzimani svakih par dana. U svim uzorcima određivana je pH vrijednost, zatim optička gustoća pri 600 nm te su svi uzorci analizirani korištenjem UPLC analitike. Također, u ovom dijelu istraživanja određivana je količina imobilizirane biomase na način da se određivala masa čvrstog sloja prije i nakon završenog eksperimenta kako bi se mogla usporediti uspješnost i sposobnost zadržavanja bakterijske biomase.

### 3.2.7. Analitičke metode

#### 3.2.7.1. *Određivanje optičke gustoće*

Za određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom preliminarnog istraživanja u tikvicama i uzoraka iz uzgoja u bioreaktoru s čvrstim slojem, najprije je provedena homogenizacija uzoraka na vrtložnoj miješalici, a nakon toga su uzorci prebačeni u kvarcne kivete te im je mjerena optička gustoća uređajem Spektrofotometrom „Carry 100“. Mjerena je optička gustoća uzoraka pri 600 nm.

### 3.2.7.2. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti

Uzorci dobiveni tijekom uzgoja u tikvicama i bioreктору su homogenizirani na vrtložnoj miješalici te je izuzeto 750  $\mu\text{L}$  svakog uzorka u Eppendorf kivetu. U kivete je dodano 750  $\mu\text{L}$  10 %-tne  $\text{ZnSO}_4$  otopine i ostavljeno 10 minuta u mirovanju kako bi se istaložili proteini i nečistoće. Nakon toga je provedeno njihovo centrifugiranje pri 10 000 o/min tokom 10 minuta. Nakon ovog dijela pripreme uzoraka, supernatant je dodatno filtriran kroz mikrobiološki filter (0,2  $\mu\text{m}$ , Sartorius) u staklenu vijalu za UPLC analizu. Protok mobilne faze tijekom analize uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti je iznosio 0,6 mL/min. Temperatura u koloni iznosila je 75  $^{\circ}\text{C}$ , a volumen injektiranog uzorka 10  $\mu\text{L}$ . Za obradu rezultata dobivenih kromatografskom analizom je korišten računalni program „OpenLAB CDS“. Svaki sastojak u uzorku je detektiran usporedbom retencijskih vremena uzorka i standarda. Iz jednadžbe pravca baždarnih dijagrama je izračunata koncentracija svakog sastojka.

### 3.2.7.3. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase imobilizirane u eksperimentima s bioreaktorom s čvrstim slojem

Količina biomase koja se imobilizirala na čvrsti sloj (aktivni ugljen, odnosno bukva) je određena na način da je masa osušenog aktivnog ugljena, odnosno bukve na početku procesa ( $m_{pr}$ ) oduzeta od mase osušenog aktivnog ugljena, tj. bukve na kraju procesa ( $m_{po}$ ).

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

### 3.2.8. Proračun pokazatelja uspješnosti procesa

Slijedeće jednadžbe su korištene kako bi se izračunali pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje 2,3-BTD-a:

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

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

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

$$Pr = \frac{Y_{2,3-BTD}}{t_u} [g/Lh] \quad [5]$$

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],

$Pr$  –produktivnost [g/Lh]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati istraživanja u kojima je proveden uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama na kemijski definiranim podlogama s različitim početnim koncentracijama octene kiseline s ciljem ispitivanja njenog utjecaja na dinamiku proizvodnje 2,3-BTD-a. Također, u drugom dijelu ovog poglavlja prikazani su i rezultati istraživanja u kojima je proveden uzgoj bakterije *P. polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s čvrstim slojem na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi također kod različitih početnih koncentracija octene kiseline gdje su kao sredstvo za imobilizaciju proizvodnog mikroorganizma korišteni aktivni ugljen odnosno bukove strugotine kako bi se moglo zaključiti koji je od njih dvoje pogodniji nosač u slučaju proizvodnje 2,3-BTD-a.

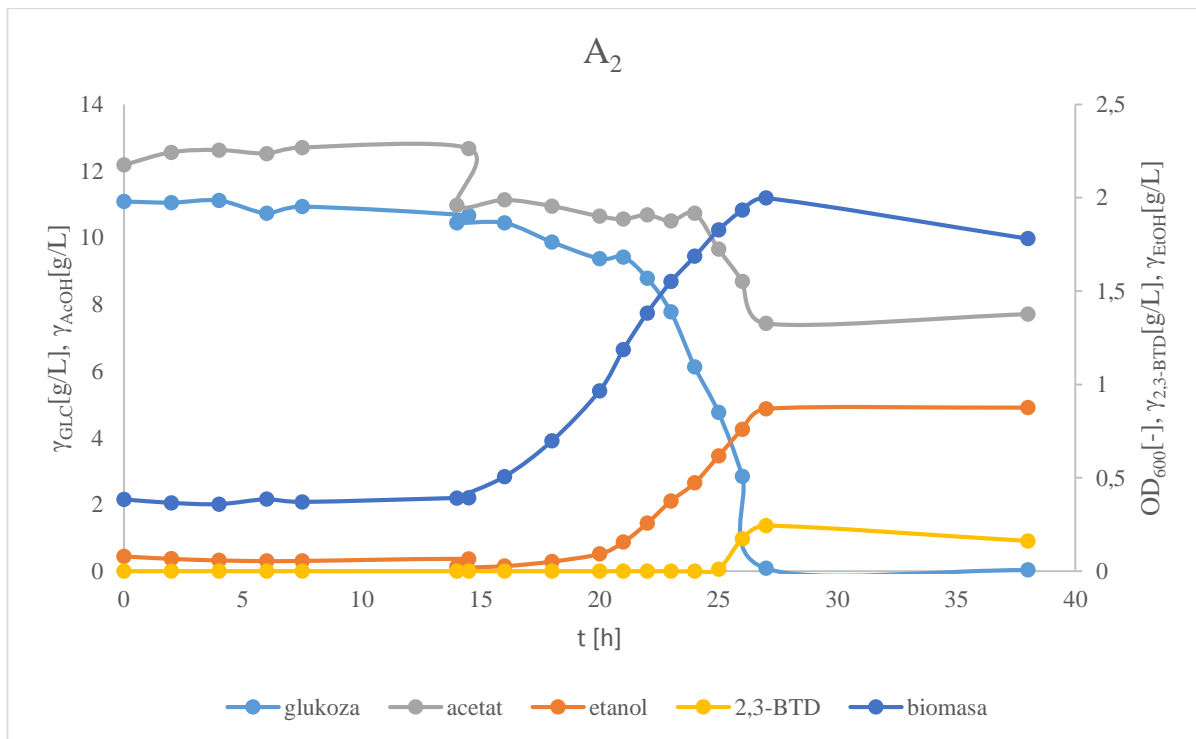
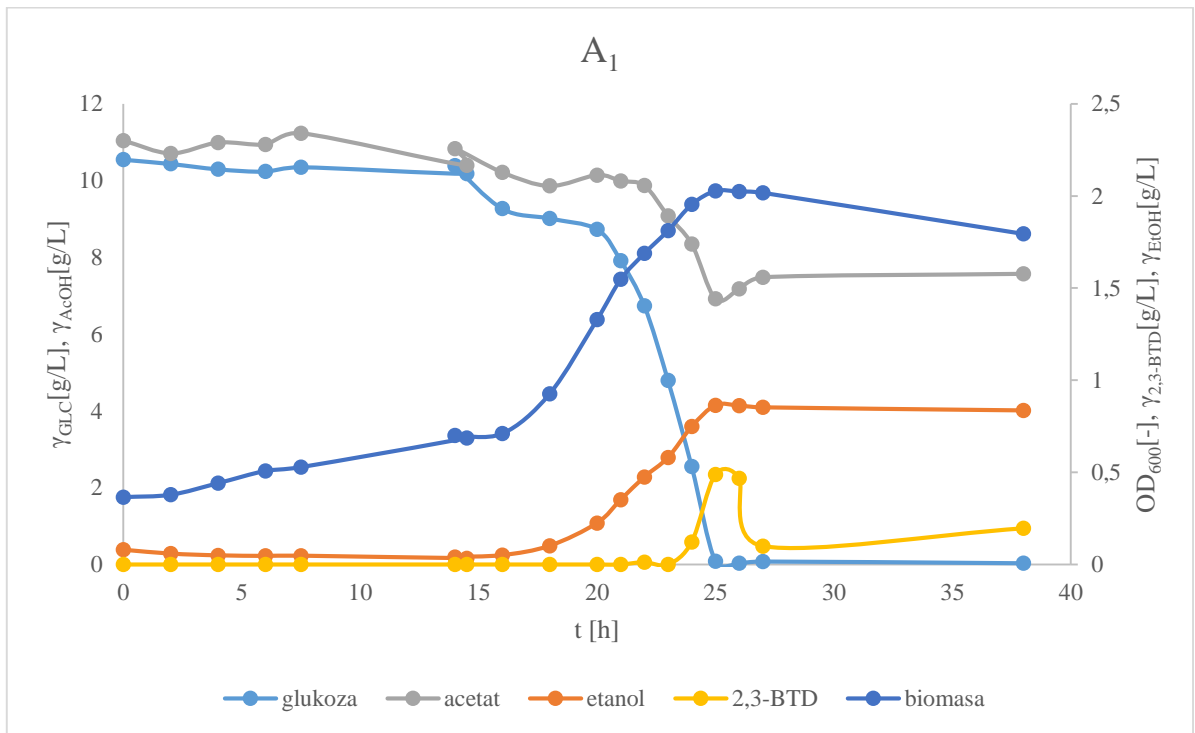
Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama su prikazani u poglavlju 4.1.

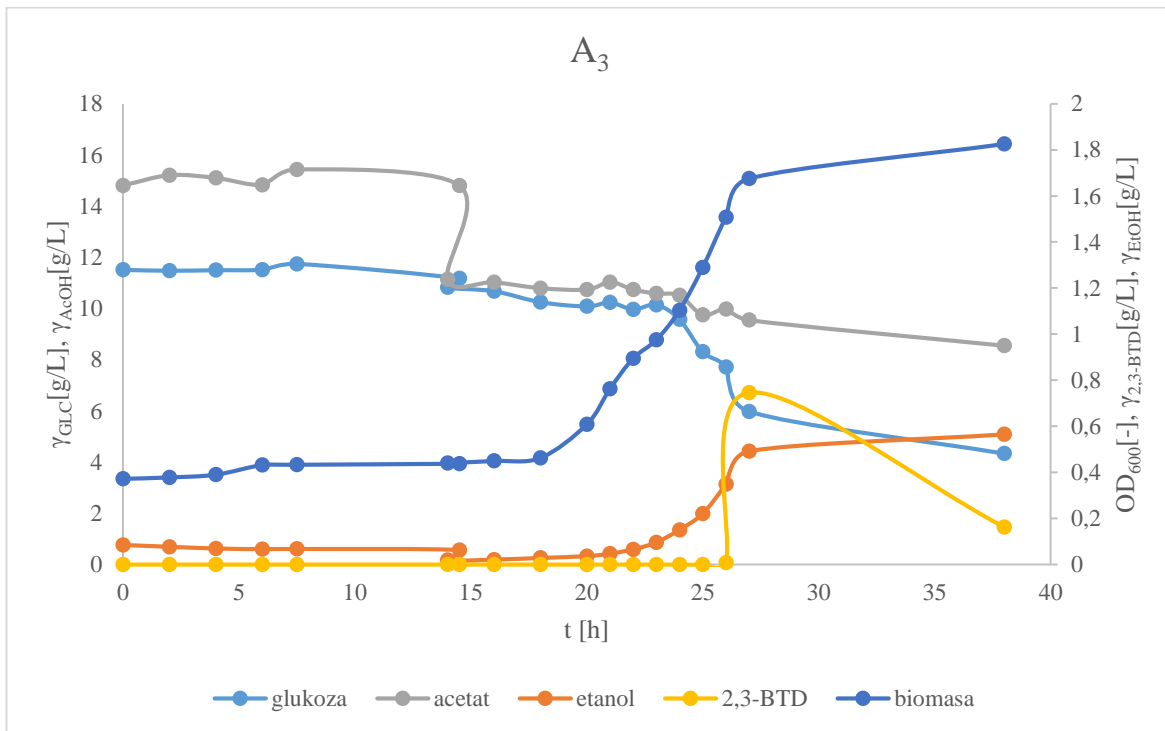
Rezultati uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u bioreaktoru s čvrstim slojem s različitim nosačima te s različitim inicijalnim koncentracijama octene kiseline prikazani su u poglavlju 4.2.



#### **4.1. REZULTATI PRELIMINARNOG ISTRAŽIVANJA PROIZVODNJE 2,3-BTD-A U TIKVICAMA NA KEMIJSKI DEFINIRANIM PODLOGAMA KOD RAZLIČIH POČETNIH KONCENTRACIJA OCTENE KISELINE**

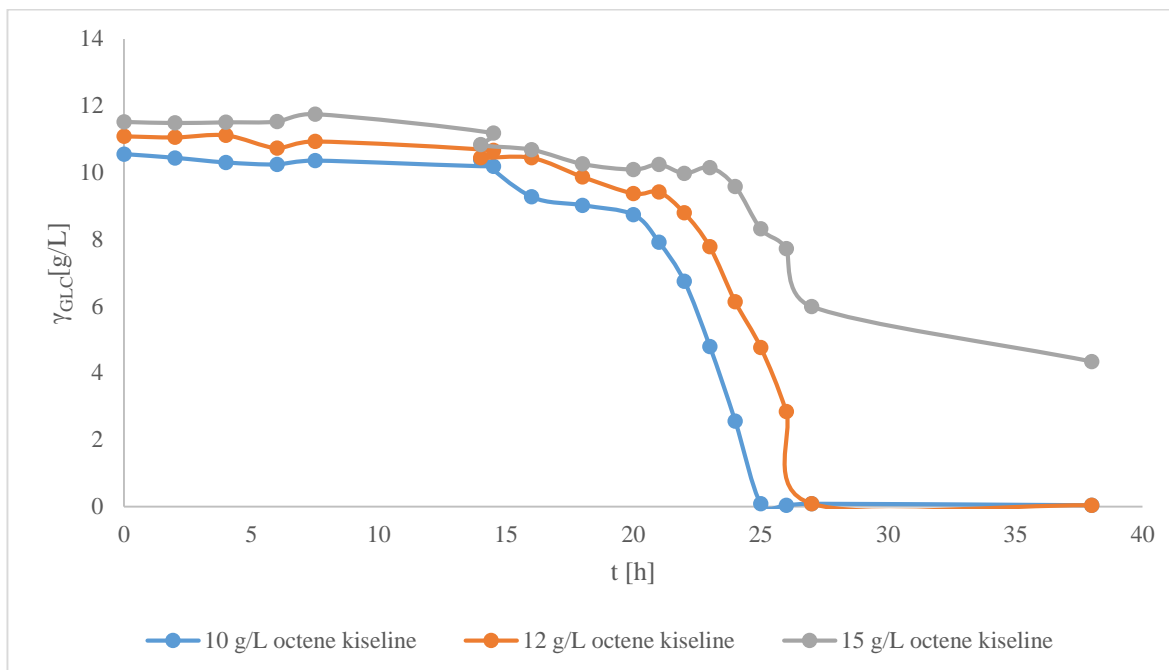
Uzgoj bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 proveden je u mikroaerofilnim uvjetima u Erlenmeyerovim tikvicama na kemijski definiranoj podlozi. Podloga je pripremljena na način opisan u poglavlju 3.2.3. te je početna koncentracija octene kiseline podešena na 10, 12 i 15 g/L kako bi se pratio njen utjecaj na dinamiku odvijanja bioprocasa. Tikvice su termostahirane na tresilici pri 125 o/min i 30 °C, a tijekom uzgoja je praćena promjena optićeke gustoće (OD) pri 600 nm kao indirektni pokazatelj rasta bakterijske biomase u podlozi. Također, tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije izvora ugljika i svih nastalih produkata korištenjem UPLC analitike.





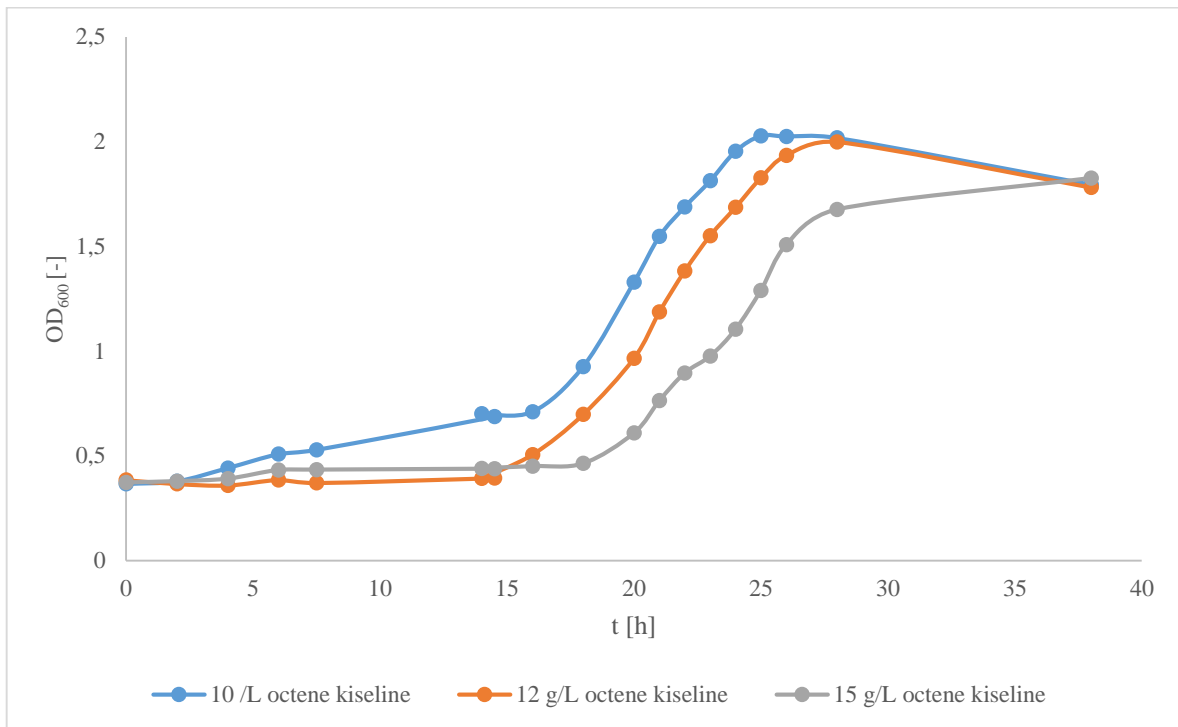
**Slika 6.** Promjena koncentracije supstrata, produkta i OD<sub>600</sub> vrijednosti u vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi: A<sub>1</sub>-s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L, A<sub>2</sub>-s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 12 g/L i A<sub>3</sub>-s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L

U eksperimentima s *P. polymyxa* na kemijski definiranim hranjivim podlogama (slika 6) je utvrđeno da eksponencijalna faza rasta započinje kasnije (oko dvadesetog sata) kada je podlozi inicijalna koncentracija octene kiseline bila 15 g/L. U uzgoju gdje su inicijalne koncentracije octene kiseline podešene na 10 i 12 g/L, eksponencijalna faza nastupa ranije, oko 15. sata uzgoja što pokazuje da povećanje početne koncentracije octene kiseline u podlozi negativno utječe na proizvodni mikroorganizam.



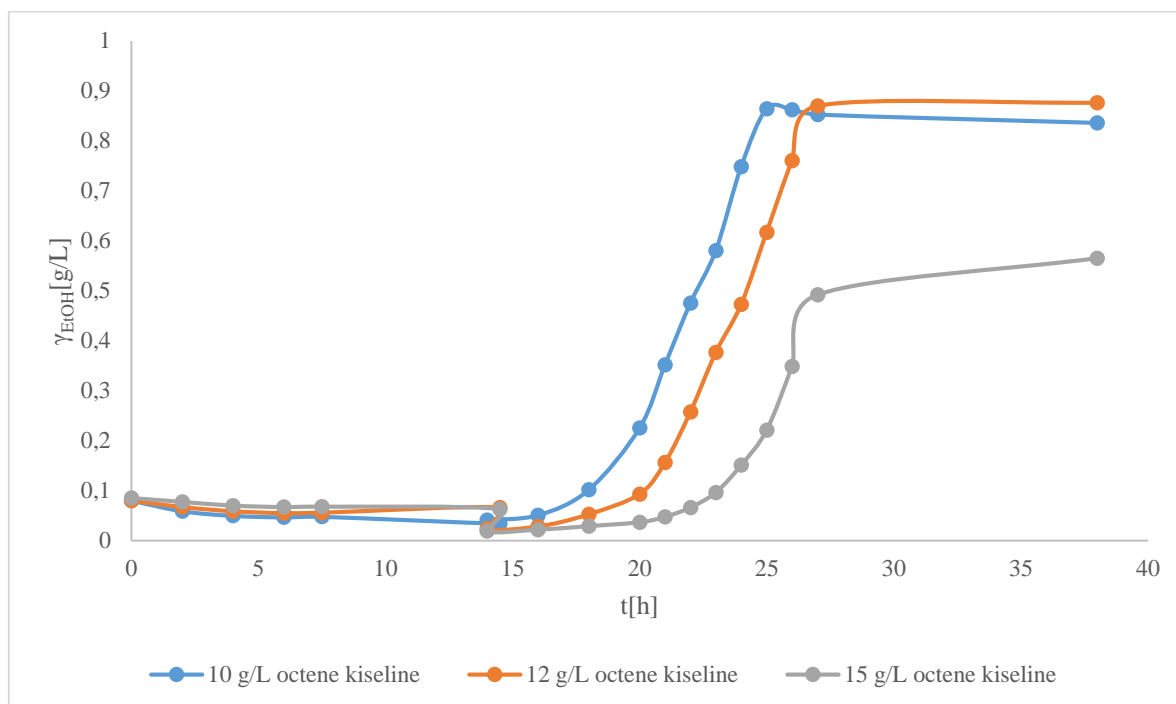
**Slika 7.** Promjena koncentracije supstrata (glukoze) u vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi: s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L, s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 12 g/L i s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L

Što se tiče brzine potrošnje supstrata, gotovo identična dinamika uočena je u prva dva eksperimenta s nižim inicijalnim koncentracijama octene kiseline u podlozi uz sav utrošen supstrat između 25. i 28. sata uzgoja. S obzirom na činjenicu da je najviša koncentracija octene kiseline djelovala negativno na rast i metabolizam stanica, u trećem eksperimentu, glukoza nije bila niti u potpunosti utrošena (slika 7).



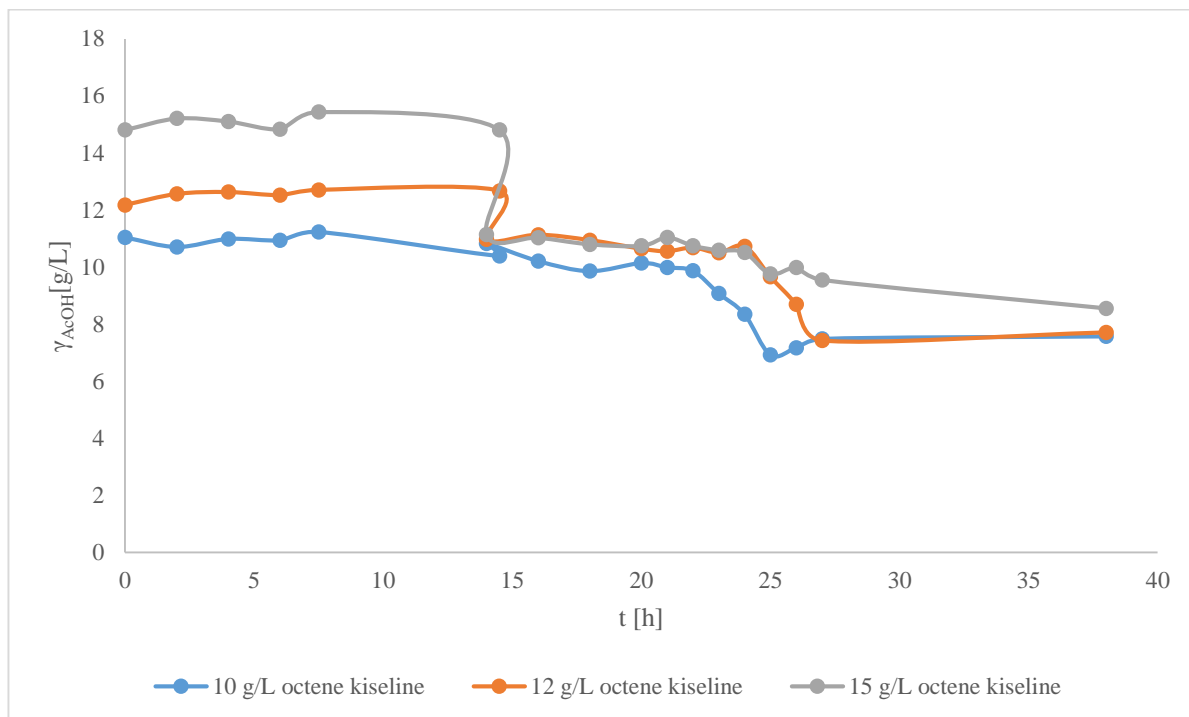
**Slika 8.** Promjena  $OD_{600}$  u vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi: s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L, s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 12 g/L i s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L

Što se tiče promjena optičke gustoće, u sve tri tikvice bila je slična početna koncentracija biomase, međutim osim što je na slici 8 vidljiv pomak odnosno uočen kasniji ulazak stanica u eksponencijalnu fazu, također su zabilježene nešto niže vrijednosti optičke gustoće što je i u skladu s prethodnim rezultatima. Ostvareni rezultati u tikvicama u skladu su s istraživanjem koje su proveli Celinska i Grajek (2009) gdje je došlo do sličnih rezultata. Iz grafa na slici 8 također je vidljivo da porastom koncentracije octene kiseline dolazi do usporavanja rasta kulture, odnosno produženog trajanja *lag* faze kao što je dobiveno u istraživanju koje su proveli Cheng i sur. (2010).



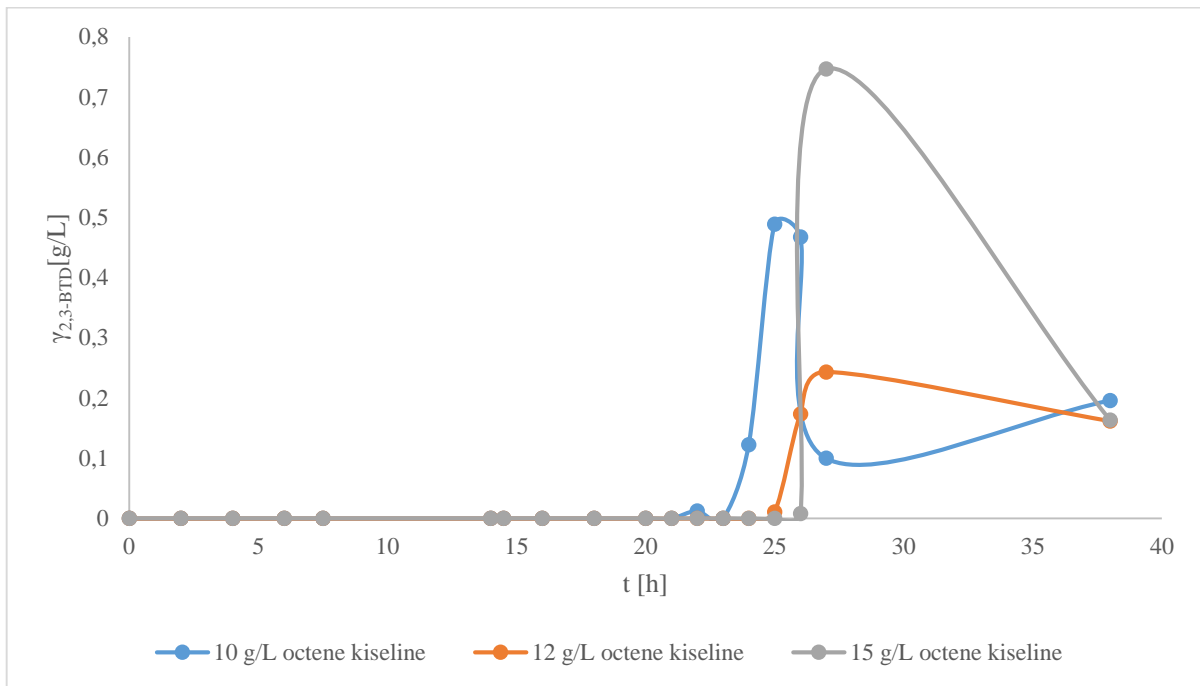
**Slika 9.** Promjena koncentracije etanola u vremenu tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi: s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L, s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 12 g/L i s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L

Generalno gledano, u sva tri eksperimenta u tikvicama ostvareni su niski prinosi proizvedenog etanola te su oni vrlo slični za uzgoj gdje je bila niža inicijalna koncentracija octene kiseline (10 i 12 g/L) te su iznosili 0,8355 i 0,8763 g/L. Najniži prinos ostvaren je u slučaju kada je koncentracija octene kiseline bila najviša ( $Y_P = 0,56490$  g/L, slika 9). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Nakashimade i sur. (2000) koji su također pokazali ustanovili da se povećanjem koncentracije octene kiseline u podlozi smanjuje koncentracija proizvedenog etanola.



**Slika 10.** Promjena koncentracije acetata u vremenu tijekom uzgoja *P.polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi: s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L, s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 12 g/L i s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L

Na slici 10 prikazana je promjena koncentracije octene kiseline u sva tri eksperimenta. Tokom cijelog vremena trajanja uzgoja u tikvicama nije zabilježena značajnija proizvodnja ovog spoja, međutim pad koncentracije, u odnosu na inicijalne vrijednosti, najizraženiji je u slučaju kada stanice ulaze u eksponencijalnu fazu. Naime, pokazano je da je octena kiselina može potaknuti i pospješiti proizvodnju 2,3-BTD-a, a s obzirom da je njegova sinteza vezana uz rast stanica (najviše ga se proizvodi u eksponencijalnoj fazi rasta), dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjima. Koncentracije octene kiseline na kraju uzgoja iznosile su 7,5706 g/L (inicijalno 10 g/L), u uzgoju s početnom koncentracijom 12 g/L je konačna koncentracija iznosila 7,7108 g/L te je u uzgoju s 15 g/L konačna koncentracija iznosila 8,553 g/L.



**Slika 11.** Promjena koncentracije 2,3-BTD-a u vremenu u tijekom uzgoja *P. polymyxa* DSM 742 na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi: s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L, s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 12 g/L i s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L

Konačno, tokom cijelog vremena trajanja eksperimenta u uzorcima je praćena i promjena koncentracije 2,3-BTD-a. Kao što je prethodno navedeno, s obzirom da je njegova proizvodnja vezana uz sam rast bakterijske biomase, značajnije promjene u njegovoj koncentraciji nisu uočene sve dok stanice nisu ušle u eksponencijalnu fazu rasta. Najviša koncentracija ovog produkta zabilježena je u eksperimentu sa najnižom inicijalnom koncentracijom octene kiseline u podlozi, a najniža u tikvici gdje je koncentracija octene kiseline bila najviša. Generalno gledano nisu ostvareni značajniji prinosi što je u skladu s nekim istraživanjima gdje je pokazano da, iako octena kiselina ima pozitivan učinak na proizvodnju 2,3-BTD-a, on je vidljiv samo do neke određene koncentracije (Celińska i Grajek, 2009). Prinosi 2,3-BTD-a redom su iznosili 0,4883 g/L (10 g/L octene kiseline), zatim 0,2433 g/L (12 g/L octene kiseline) te 0,1617 g/L 2,3-BTD-a u eksperimentu s najvišom inicijalnom koncentracijom octene kiseline.

S obzirom na ukupno vrijeme trajanja bioprocesa i količinu proizvedenog 2,3-BTD-a, najveća produktivnost ostvarena je kod najniže koncentracije početno dodane octene kiseline.



Parametri uspješnosti procesa za uzgoj u sve tri tikvice sumarno su prikazani u tablici 7.

**Tablica 7.** Parametri uspješnosti procesa proizvodnje 2,3-BTD-a tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u tikvicama s tri različite početne koncentracije octene kiseline

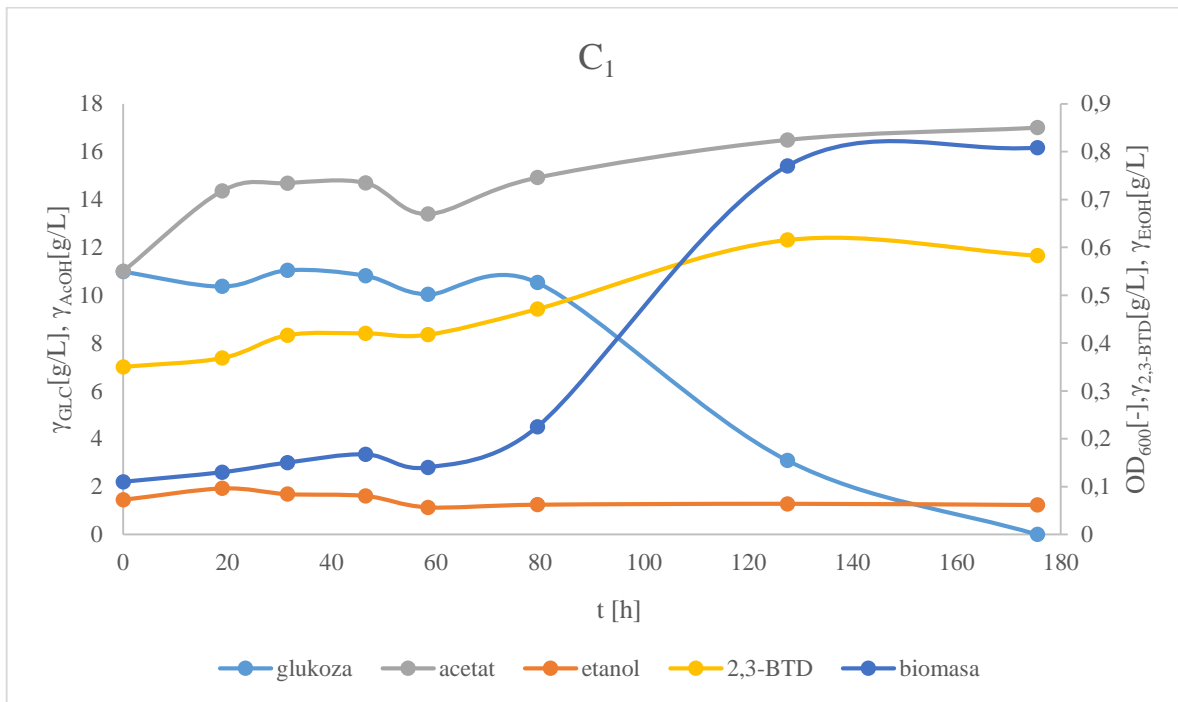
	<b>Y<sub>2,3-BTD</sub></b> <b>[g/L]</b>	<b>Y<sub>EtOH</sub></b> [g/L]	<b>ΔS<sub>AcOH</sub></b> <b>[g/L]</b>	<b>Y<sub>2,3-BTD/GLC</sub></b> <b>[g/g]</b>	<b>ΔS<sub>GLC</sub></b> <b>[g/L]</b>	<b>Pr<sub>2,3-BTD</sub></b> <b>[g/Lh]</b>
<b>A<sub>1</sub></b>	0,48883	0,82981	3,4705	0,03266	14,9690	0,03266
<b>A<sub>2</sub></b>	0,2433	0,85288	4,4673	0,01623	14,9887	0,01623
<b>A<sub>3</sub></b>	0,1617	0,48001	6,2542	0,0108	10,6623	0,01517

Sumarno, u prva dva eksperimenta s nižom početnom koncentracijom octene kiseline, supstrat je u potpunosti utrošen te su prinosi i produktivnost proizvodnje 2,3-BTD-a bili veći u odnosu na najvišu početnu koncentraciju octene kiseline. S obzirom da se radi o višim od optimalnih koncentracija navedene kiseline za proizvodnju 2,3-BTD-a, ukupno gledano ostvareni su navedeno niži pokazatelji uspješnosti bioprocasa.

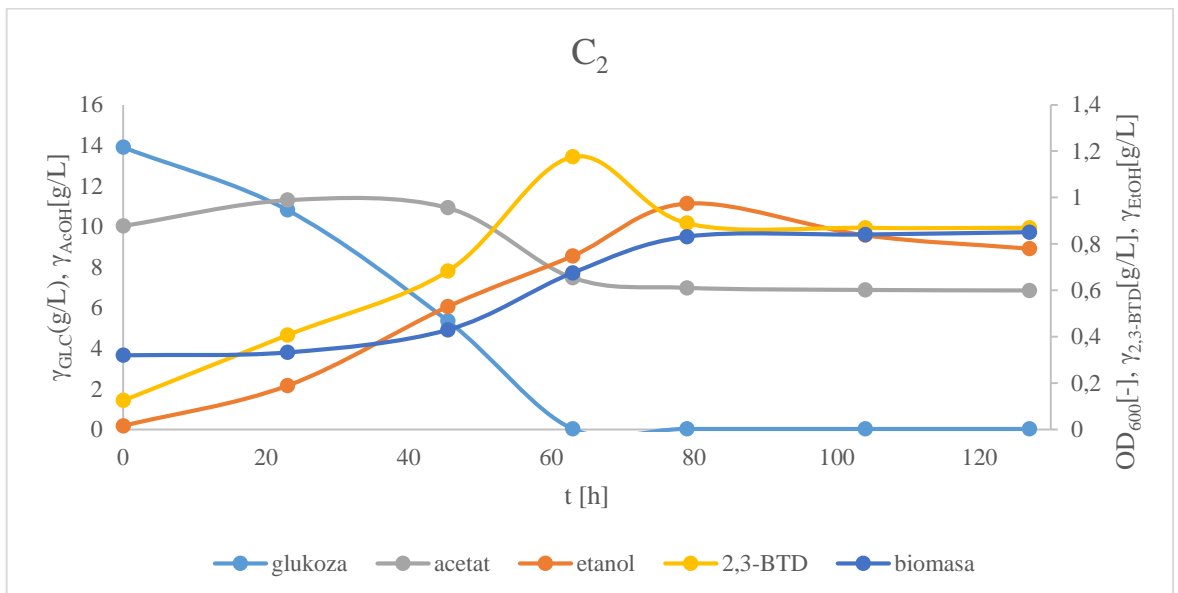
#### **4.2. REZULTATI UZGOJA BAKTERIJE *Paenibacillus polymyxa* U BIOREAKTORU S ČVRSTIM SLOJEM PRI RAZLIČITIM INICIJALNIM KONCENTRACIJAMA OCTENE KISELINE I RAZLIČITIM IMOBILIZACIJSKIM SREDSTVIMA**

Nakon provedenog preliminarnog istraživanja na kemijski definiranim hranjivim podlogama s različitim inicijalnim koncentracijama octene kiseline (10 g/L, 12 g/L i 15 g/L) odlučeno je da će se podloge A1 i A3 koristiti u daljnjem istraživanju kako bi se ispitaio utjecaj imobilizacije stanica na proizvodnju 2,3-BTD-a. U ovom dijelu diplomskog rada je proučavana mogućnost korištenja bioreaktora s čvrstim slojem u proizvodnji 2,3-BTD-a korištenjem aktivnog ugljena i bukovih strugotina kao nosača za radni mikroorganizam. Prvo je provedena imobilizacija stanica i potom se započelo s upumpavanjem čiste podloge kroz kolonu koja je cijelo vrijeme cirkulirala sustavom pomoću peristaltičke pumpe. Temperatura u bioreaktoru održavana je preko

silikonskog crijeva omotanog oko kolone kroz koje je cirkulirala termostatorana voda. Uzgoji su provedeni na kemijski definiranim hranjivim podlogama s inicijalnim koncentracijama octene kiseline od 10 i 15 g/L s ciljem utvrđivanja kako dodatak octene kiseline utječe na dinamiku bioprocasa. Visina kolone je bila ista u sva četiri uzgoja. Rezultati uzgoja prikazani su na slikama 12-15.

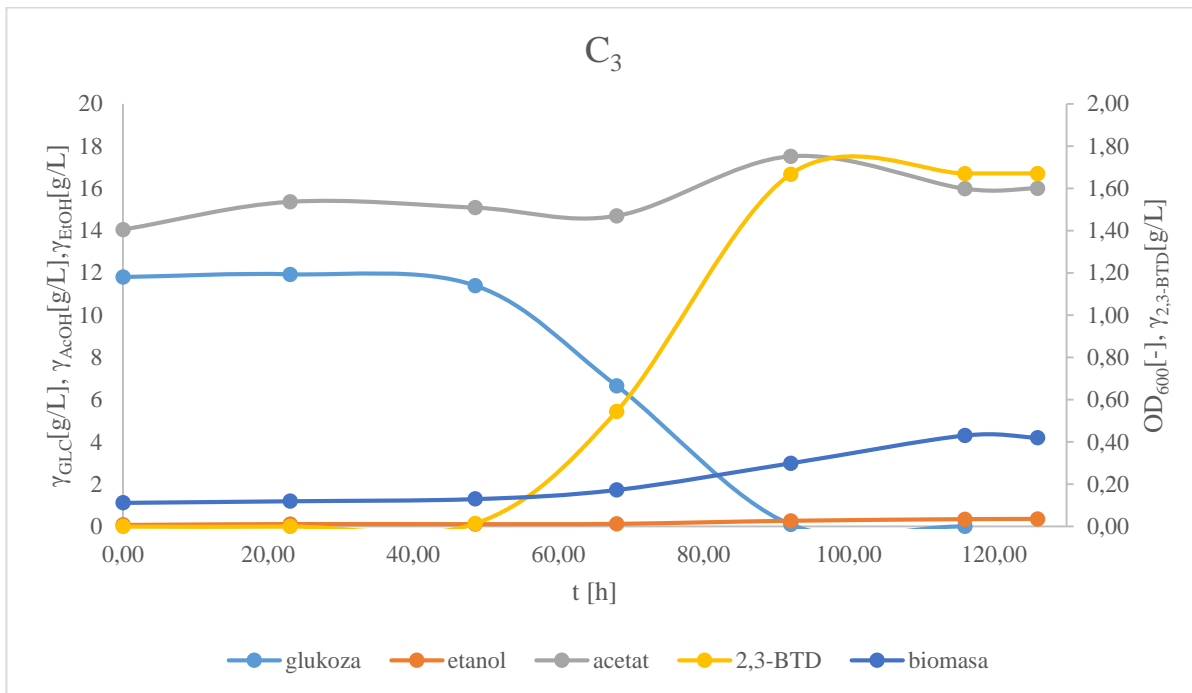


**Slika 12.** Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD<sub>600</sub> o vremenu tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi u koloni s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L na aktivnom ugljenu

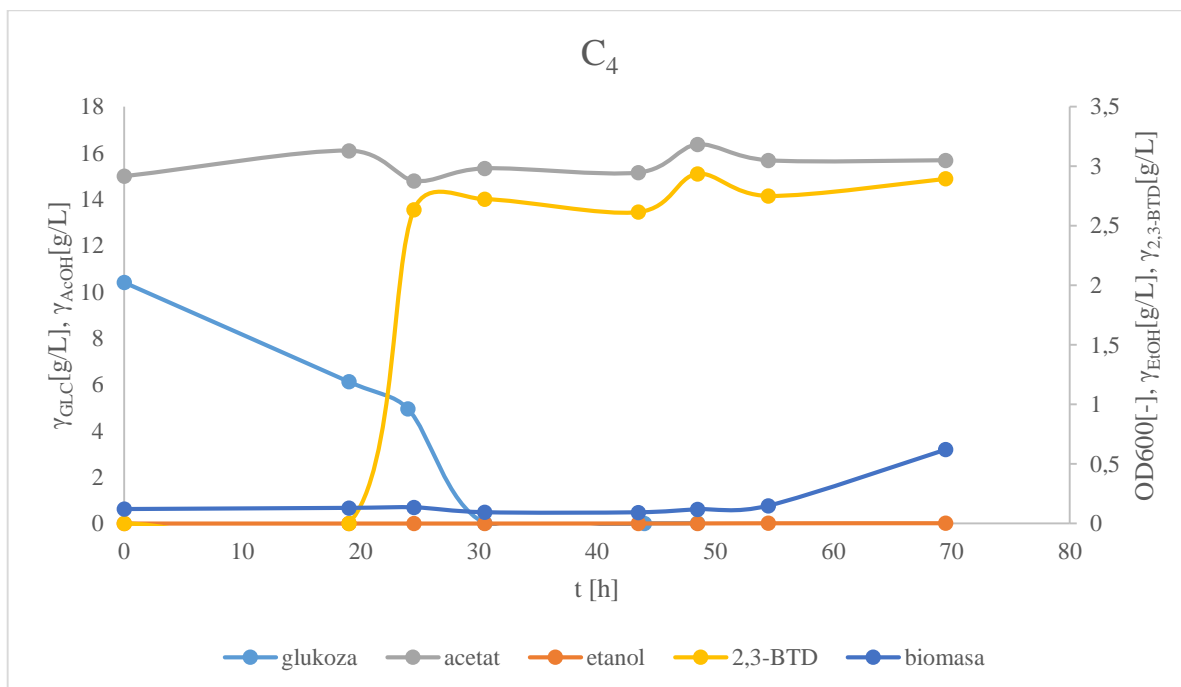


**Slika 13.** Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD<sub>600</sub> o vremenu tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi u koloni s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L na bukovim strugotinama

Rezultati eksperimenata gdje je početna koncentracija octene kiseline bila podešena na 10 g/L i gdje su kao nosači za imobiliziranu biomasu bili aktivni ugljen i bukove strugotine prikazani su na slikama 12 i 13. Kada uspoređujemo ova prva dva eksperimenta vidljivo je da je u slučaju korištenja aktivnog ugljena potrošnja supstrata započela tek nakon 80. sata uzgoja dok je u slučaju korištenja bukovih strugotina potrošnja supstrata započela *de facto* u trenutku kada se započelo s analizom uzoraka. Eksperiment na bukovim strugotinama je dosta ranije završio što znači da je ostvaren bolji kontakt supstrata s proizvodnim mikroorganizmom što je posljedica same strukture bukovih strugotina koje nisu imale veliku nasipnu gustoću. U slučaju aktivnog ugljena supstrat je vrlo vjerojatno teže odnosno sporije dolazio do svih dijelova na kojima je bila imobilizirana biomasa pa je i iz tog razloga zabilježeno i kasnije, ali i sporije trošenje supstrata. Ono što je zabilježeno u istraživanju s aktivnim ugljenom jest da je u tom eksperimentu došlo do povećanja koncentracije octene kiseline u odnosu na početnu vrijednost te je ona u konačnici iznosila oko 17 g/L. Ostvareni su niži prinosi etanola u odnosu na eksperiment s bukovim strugotinama, te je ostvaren niži maksimalni prinos 2,3-butandiola koji je u jednom trenutku oko 1 g/L. Ovi mješoviti rezultati ukazuju na činjenicu da su, s obzirom na laminaran tok podloge tj. nizak protok podloge kroz čvrsti sloj, bili s jedne strane, otežan prijenos mase, a s druge strane nije bilo moguće osigurati homogenost sustava kako je to recimo moguće kod bioreaktora s miješalom. Zbog svega navedenog, to je za posljedicu imalo formiranje lokalnih koncentracija produkata što je rezultiralo podacima prikazanim na slikama 12 i 13. Također, bitno je za napomenuti da se aktivni ugljen često koristi i kao adsorbens za izdvajanje i zadržavanje nekih spojeva, među kojim su i neki od produkata metabolizma bakterije *P. polymyxa*. To potencijalno ukazuje da su koncentracije svih zabilježenih produkata moguće bile i više, međutim zbog adsorpcije na aktivni ugljen određene koncentracije bile su nešto niže.



**Slika 14.** Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD<sub>600</sub> o vremenu tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi u koloni s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L na aktivnom ugljenu



**Slika 15.** Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD<sub>600</sub> o vremenu tijekom uzgoja bakterije *P. polymyxa* na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi u koloni s inicijalnom koncentracijom octene kiseline 15 g/L na bukovim strugotinama

U ovom dijelu istraživanja provedeni su i eksperimenti s imobilizacijom bakterijske biomase na čvrsti nosač i pri uvjetima kada je koncentracija octene kiseline u podlozi bila 15 g/L. Kada se uspoređuju ova dva eksperimenta s eksperimentima gdje je koncentracija octene kiseline bila niža, vidljivije su manje promjene optičke gustoće uzoraka nego u prethodna dva uzgoja. Ovdje je bitno za napomenuti da u svim eksperimentima, osim u prvom eksperimentu s aktivnim ugljenom, promjene u vrijednostima optičke gustoće nisu bile značajnije, međutim s obzirom da je kod uzoraka izuzetih iz kolone s aktivnim ugljenom uočena prisutnost sitnih čestica aktivnog ugljena, moguć je bio njihov negativan utjecaj na analitiku. Kao i u prethodna dva eksperimenta, i ovdje su postignute gotovo identične konačne OD<sub>600</sub> vrijednosti (0,5) što je za 0,3 manja vrijednost nego kada je koncentracija octene kiseline bila niža na početku uzgoja. Nadalje, i u ovom slučaju potrošnja supstrata u slučaju bukovih strugotina započela je gotovo odmah dok je kod aktivnog ugljena zabilježen odmak, doduše nešto kraći nego u prethodnom eksperimentu. Etanol koji je određen u uzorcima u prethodnom dijelu istraživanja, u ova dva gotovo da i nije detektiran što ukazuje na činjenicu da su uvjeti bili nepovoljni za njegovu proizvodnju, ali su s druge strane pozitivno utjecali na proizvodnju 2,3-BTD-a. U slučaju bukovih strugotina ostvaren je gotovo duplo veći prinos kada se usporede rezultate s višim inicijalnim koncentracijama octene kiseline te je također ostvaren značajno bolji rezultat u odnosu na eksperiment s bukovim strugotinama s nižom inicijalnom koncentracijom octene kiseline. Iako je koncentracija octene kiseline bila gotovo 50 % inicijalno viša ona je potencijalno mogla utjecati na bolji prijenos mase kroz granični sloj što je u konačnici moglo potaknuti bolju proizvodnju 2,3-butandiola. Na ovaj način značajnije je skraćeno vrijeme trajanja bioprocasa i svakako su povećani pokazatelji uspješnosti. Uzgoj na aktivnom ugljenu s 15 g/L octene kiseline je trajao 90 sati, a najkraće je trajao uzgoj na bukovim strugotinama s 15 g/L octene kiseline (30 sati). Uzgoj na bukovim strugotinama s 10 g/L je trajao 60 sati, a ukupno gledano najdulje je trajao uzgoj s aktivnim ugljenom i koncentracijom octene kiseline 10 g/L (180 sati). Što se tiče ukupne mase imobilizirane biomase (tablica 9) vidljivo je da je u oba slučaja više biomase vezano upravo na aktivni ugljen što je u skladu s činjenicom da on ima veću nasipnu gustoću te veću aktivnu površinu za imobilizaciju stanica. Vrijednosti mase biomase u slučaju korištenja bukovih strugotina bile su gotovo upola manje. S obzirom na sve navedeno, ukupno gledano bolji prinosi 2,3-BTD-a ostvareni su kod eksperimenata s višim inicijalnim koncentracijama octene kiseline unatoč činjenici da više koncentracije octene kiseline negativno djeluju na njegovu proizvodnju te unatoč činjenici da je u tim eksperimentima bilo manje imobilizirane biomase u

odnosu na druga dva eksperimenta. Imobilizacijom stanica postiže se svojevrsna zaštita stanica od negativnog utjecaja povećane koncentracije bilo supstrata bilo produkata, a to znači i potencijalnih inhibitora što je dokazano i tokom izrade ovog diplomskog rada. S obzirom na vremena trajanja uzgoja i količinu proizvedenog 2,3-BTD-a, najbolja produktivnost je ostvarena u eksperimentu s bukovim strugotinama (inicijalna konc. octene kiseline 15 g/L).

**Tablica 8.** Parametri uspješnosti procesa proizvodnje 2,3-BTD-a tijekom uzgoja bakterije *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 u kolonama na dva različita nosača, s različitim inicijalnim koncentracijama octene kiseline

	<b>Y<sub>2,3-BTD</sub></b> <b>[g/L]</b>	<b>Y<sub>EtOH</sub>[g/L]</b>	<b>Y<sub>2,3-BTD/GLC</sub>[g/g]</b>	<b>ΔS<sub>GLC</sub> [g/L]</b>	<b>Pr<sub>2,3-BTD</sub></b> <b>[g/Lh]</b>
<b>C<sub>1</sub></b>	0,6154	0,0962	0,04103	14,9977	0,003517
<b>C<sub>2</sub></b>	1,0502	0,9581	0,07012	14,9773	0,008269
<b>C<sub>3</sub></b>	1,6667	0,2750	0,11113	14,9977	0,013228
<b>C<sub>4</sub></b>	2,9368	0,00254	0,19591	14,9909	0,042256

**Tablica 9.** Masa imobilizirane biomase na čvrstom sloju

	<b>m<sub>biomasa</sub> [g]</b>
<b>C<sub>1</sub></b>	4,47
<b>C<sub>2</sub></b>	2,56
<b>C<sub>3</sub></b>	3,63
<b>C<sub>4</sub></b>	2,62

## 5. ZAKLJUČAK

1. U preliminarnom dijelu istraživanja najveći ostvareni prinos 2,3-BTD-a iznosio je 0,48883 g/L i on je postignut u tikvici s najmanjom inicijalnom koncentracijom octene kiseline (10 g/L). U tikvici s 12 g/L octene kiseline prinos je bio duplo manji (0,2433 g/L) dok je u tikvici s najvećom inicijalnom koncentracijom octene kiseline (15 g/L) postignuta samo trećina prinosa 2,3-BTD-a u odnosu na tikvicu s najvećim prinosom (0,1617 g/L).

2. Negativan utjecaj povećanja koncentracije octene kiseline na produktivnost i prinos 2,3-BTD-a u skladu je s literaturnim navodima. Također, iako su korištene relativno visoke koncentracije octene kiseline u podlozi, rast biomase nije bio u potpunosti inhibiran te je zabilježena proizvodnja nižih koncentracija 2,3 BTD-a. Što se tiče pokazatelja uspješnosti najveća produktivnost je postignuta u tikvici u kojoj je početna koncentracija octene kiseline 10 g/L i iznosi 0,03266 g/Lh. Najmanja produktivnost je postignuta u tikvici s 15 g/L octene kiseline i iznosi 0,01517 g/Lh. Produktivnost u tikvici s 12 g/L octene kiseline iznosila je 0,01623 g/Lh.

4. Na temelju rezultata dobivenih u tikvicama, u drugom dijelu istraživanja proučavan je utjecaj različitih povećanih inicijalnih koncentracija octene kiseline na dinamiku i mogućnost proizvodnje 2,3-BTD-a u bioreaktoru s čvrstim slojem pri čemu su kao sredstva za imobilizaciju korišteni aktivni ugljen te bukove strugotine.

5. Na temelju rezultata dobivenih u drugom dijelu istraživanja, može se zaključiti kako se oba nosača mogu koristiti za uspješnu imobilizaciju stanica bakterije *Paenybacillus polymyxa* pri čemu je više biomase moguće vezati upravno na aktivni ugljen zbog njegove strukture i velike aktivne površine.

6. Unatoč navedenoj činjenici, ukupno gledano, u eksperimentima s aktivnim ugljenom ostvarene su niže produktivnosti bioprocesa kao rezultat nižih koncentracija proizvedenog 2,3-BTD-a i ukupno dužeg vremena trajanja uzgoja. U uzgoju s početnom koncentracijom octene kiseline 10 g/L prinos je iznosio 0,6154 g/L, a s početnom koncentracijom octene kiseline od 15 g/L, 1,6667 g/L. Tijekom uzgoja na bukovim strugotinama s 10 g/L octene kiseline ostvaren je prinos 2,3-BTD-a od 1,0502 g/L, a s 15 g/L octene kiseline prinos od 2,9368 g/L. Najveća produktivnost procesa postignuta je u uzgoju na bukovim strugotinama s 15 g/L octene kiseline i iznosi 0,042256 g/Lh. Potom slijedi uzgoj na aktivnom ugljenu s 15 g/L octene kiseline i iznosi 0,013228 g/Lh. Najmanja produktivnost je postignuta u uzgoju na aktivnom ugljenu s 10



g/L octene kiseline i iznosi 0,003517 g/Lh. Produktivnost u uzgoju na bukovim strugotinama s 10 g/L octene kiseline iznosi 0,008269 g/Lh.

7. Korištenje bioreaktora s čvrstim slojem u kojem su bile imobilizirane stanice proizvodnog mikroorganizma, pokazao se kao prikladan sustav za proizvodnju 2,3-BTD-a čak i kod viših inicijalnih koncentracija octene kiseline. S obzirom na utjecaj više različitih faktora na pokazatelje uspješnosti bioprocesa potrebno je provesti dodatna istraživanja za daljnju optimizaciju bioprocesa.

## 6. LITERATURA

Atmakidis T, Kenig EY (2014) Numerical investigations of packed bed reactors with irregular particle arrangements. U: 24th European Symposium on Computer Aided Process Engineering, Budimpešta, str. 217–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63456-6.50037-5>

Białkowska AM (2016) Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microb Biot* **32(12)**, 200. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2161-x>

Catalano S, Wozniak S, Kaplan K (2023) Packed bed reactor. Michigan Engineering. <https://encyclopedia.che.engin.umich.edu/packed-bed-reactors/>. Pristupljeno 17.11.2023.

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

Cheng KK, Liu Q, Zhang JA, Li JP, Xu JM, Wang GH (2010) Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochem* **45(4)**, 613–616. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.12.009>

Daud NS, Mohd Din ARJ, Rosli MA, Azam ZM, Othman NZ, Sarmid MR (2019) *Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **18**, 101092. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101092>

Dziewulski DM, Haughney HA, Das K, Nauman EB (1986) Fed-batch with biomass recycle and batch production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus polymyxa*. *J Biotechnol* **4**, 171–180. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(86\)90044-1](http://doi.org/10.1016/0168-1656(86)90044-1)

Garg SK, Jain A (1995) Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresour Technol* **51**, 103-109. [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00136-o](http://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00136-o)

Ge Y, Li K, Li L, Gao C, Zhang L, Ma C, Xu P (2016) Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*. *Green Chem* **18(17)**, 4693–4703. <http://doi.org/10.1039/c6gc01023g>

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. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.047>

Ji XJ, Huang H, Ouyang PK (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* **29(3)**, 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>

Jüntgen H (1986) Activated carbon as catalyst support. *Fuel* **65(10)**, 1436–1446. [http://doi.org/10.1016/0016-2361\(86\)90120-1](http://doi.org/10.1016/0016-2361(86)90120-1)

Langendries S, Goormachtig S (2021) *Paenibacillus polymyxa*, a Jack of all trades. *Environmental Microbiology* **23**, 5659-5669. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.15450>

Maina S, Prabhu AA, Vivek N, Vlysidis A, Koutinas A, Kumar V (2021) Prospects on bio-based 2,3-butanediol and acetoin production: Recent progress and advances. *Biotechnol Adv* **54**, 107783. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107783>

Nakashimada Y, Marwoto B., Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N (2000) Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J Biosci Bioeng* **90**, 661–664. <http://doi.org/10.1263/jbb.90.661>

Padda KP, Puri A, Chanway CP (2017) *Paenibacillus polymyxa*: A prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agriculture. U: Meena V, Mishra P, Bisht J, Pattanayak A (ured.) *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, str. 165-191.

Riitonen T, Eta V, Hyvärinen S, Jönsson LJ, Mikkola JP (2013) Engineering aspects of bioethanol synthesis. *Adv Chem Eng* **42**, 1–73. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-386505-2.00001-8>

Sen P, Nath A, Bhattacharjee C (2017) Packed-Bed Bioreactor and its application in dairy, food, and beverage industry. U: Larroche C, Angeles Sanroman M, Du G, Pandey A (ured) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, str. 235–277.

Song CW, Park JM, Chung SC, Lee SY, Song H (2019) Microbial production of 2,3-butanediol for industrial applications. *J Ind Microbiol Biot* **46(11)**, 1583–1601. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02231-0>

Syu MJ (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biot* **55(1)**, 10–18. <http://doi.org/10.1007/s002530000486>

Tinôco D, Pateraki C, Koutinas AA, Freire DMG (2021) Bioprocess development for 2,3-butanediol production by *Paenibacillus* strains. *Chem Bio Eng Rev* **8(1)**, 44-62. <http://doi.org/10.1002/cben.202000022>

## 7. PRILOZI

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

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
GLC	Glukoza	-
2,3-BTD	2,3-butandiol	-
EtOH	Etanol	-
OD	Optička gustoća	-
X	Biomasa	-
t	Vrijeme uzgoja	h
$\gamma$	Masena koncentracija	g/L
$\gamma_{\text{glukoza}}$	Masena koncentracija glukoze	g/L
$\Delta S_{\text{GLC}}$	Potrošnja glukoze	g/L
$Y_{2,3\text{-BTD}}$	Prinos 2,3-butandiola	g/L
$Y_{\text{EtOH}}$	Prinos etanola	g/L
$Y_{\text{AcOH}}$	Prinos acetata	g/L
$Y_{2,3\text{-BTD/GLC}}$	Koeficijent konverzije glukoze u 2,3-butandiol	g/g
$Pr_{2,3\text{-BTD}}$	Produktivnost proizvodnje 2,3-butandiola	g/Lh

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Anita Galović 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.

Anita Galović

Vlastoručni potpis